



Zentrum für Humangenetik

**Untersuchung zur Rolle von HMGA2 im
Fettgewebe: Mechanismen des Turnovers und der
Hyperplasie**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors in den Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

dem Promotionsausschuss Dr. rer. nat.

im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen

vorgelegt von

Helge Wilhelm Thies

Bremen, im Januar 2014

1. Gutachter: Prof Dr. Jörn Bullerdiek

2. Gutachter: Prof Dr. Andreas Dotzauer

Datum der Disputation: 11. März 2014

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Helge Wilhelm Thies, geboren am 31.10.1975, dass für das Verfassen der vorliegenden Dissertation mit dem Titel „**Untersuchung zur Rolle von HMGA2 im Fettgewebe: Mechanismen des Turnovers und der Hyperplasie**“ folgende drei Aussagen zutreffen:

1. Ich habe die Arbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt.
2. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.
3. Ich habe die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Bremen, 20.01.2014

.....

(Helge Wilhelm Thies)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Gewebeproben	10
2.2 Isolierung und Kultivierung von humanen und caninen ADSCs	10
2.3 Stimulierung von Fettgewebsexplantaten.....	10
2.4 Stimulierung von humanen ASDCs mit FGF1	11
2.5 Western Blot	11
2.6 Immunhistochemische Untersuchung an stimulierten humanen ADSCs.....	11
2.7 Restimulierung von caninen ADSCs mit FGF1	12
2.8 RNA-Interferenz mittels HMGA2 spezifischen siRNAs	12
2.9 RNA-Isolierung	12
2.10 cDNA-Synthese	12
2.11 Quantitative Real-Time PCR.....	13
2.12 Statistische Analyse	14
3 ERGEBNISSE	15
3.1 Publikation I: Permanent Activation of HMGA2 in Lipomas Mimics Its Temporal Physiological Activation Linked to the Gain of Adipose Tissue (Thies et al., 2012):.....	15
3.2 Publikation II: Inverse correlation between PPAR- γ and HMGA2 expression in white adipose tissue of overweight humans (Thies et al., submitted for publication):	29
3.3 Publikation III: HMGA2 expression in white adipose tissue linking cellular senescence with diabetes (Markowski, Thies et al., 2013):	51
4 DISKUSSION	62
5 ZUSAMMENFASSUNG	77
6 SUMMARY	79

7	LITERATURVERZEICHNIS.....	81
8	DANKSAGUNG.....	95
9	PUBLIKATIONSÜBERSICHT	97

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl; µg	Mikroliter; -gramm
6-FAM	6-Carboxy-Fluorescein
6-TAMRA	6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin
ADSCs	Adipose tissue-Derived Stem Cells
aP2	Adipozyten aP2 Gen
BAX	Bcl-2-Associated X
BCA	Bicinchoninic Acid
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serum Albumin
CEBP α	CCAAT/Enhancer Binding Protein α
CD36	Cluster of Differentiation 36
CdK	Cyclin-dependent Kinase
CDKN1A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A; p21
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A; p16 ^{Ink4a} ; p14 ^{Arf}
cDNA	copy DNA
CRE	cAMP Response Element
Ct	Cycle Treshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
E1A	Adenovirus early region 1A Gen
FGF1	Fibroblast Growth Factor 1
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FKS	Fetales Kälberserum
g	Schwerebeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
GusB	Glucuronidase Beta
h	Stunde
HMGA2	High Mobility Group AT-Hook Protein 2
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HSCs	Hematopoietic Stem Cells

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

let-7	microRNA let-7
LHFP	Lipoma HMGIC Fusion Partner
LPL	Lipoprotein Lipase
LPP	LIM Domain Containing Preferred Translocation Partner In Lipoma
M	molar
MAD	Mesenchymal Adipocyte-like Default
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MDM2	Murine Double Minute
mg; ml; mm	Milligramm; -liter; -molar
min	Minute
<i>MKi67</i>	Antigen Ki-67 Gen
M-MLV	Moloney-Murines-Leukemia-Virus
mRNA	messenger RNA
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
NBT/BCIP	Nitroblautetrazoliumchlorid/ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
NCoR-1	Nuclear Receptor co-Repressor 1
NSCs	Neural Stem Cells
OIS	Onkogen-Induzierte Seneszenz
p14 ^{Arf}	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A; p14 ^{Arf}
p16 ^{Ink4a}	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A; p16 ^{Ink4a}
p53	Tumor Protein 53
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDGF-BB	Platelet Derived Growth Factor-BB
PPAR- γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RXR α	Retinoid X Rezeptor α
s	Sekunde
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SOM	Self-organizing Maps
TNF α	Tumornekrosefaktor α

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TP53	Tumor Protein 53 Gen
TZD	Thiazolidindione
UTR	Untranslated Region
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Die zunehmende Verbreitung von Übergewicht und Adipositas stellt weltweit ein wachsendes Gesundheitsproblem dar. Vor allem Adipositas ist assoziiert mit Herz-Kreislauf-Krankheiten (Bogers et al., 2007), einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ II (Wang et al., 2005) und dem Risiko an bestimmten Krebsarten, wie Kolon-, Nieren-, Pankreas-, Brust- und Gebärmutterhalskrebs zu erkranken (Renehan et al., 2008). Eine im Zeitraum von 2008 bis 2011 durchgeführte Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1) zeigte, dass 67,1 % der Männer und 53,0 % der Frauen übergewichtig, bzw. 23,3 % der Männer und 23,9 % der Frauen adipös sind (Mensink et al., 2013). Im Vergleich zu früheren Studien (BGS98 und Nationalen Untersuchungssurvey 1990/92) ist der Anteil der Übergewichtigen unverändert geblieben, wohingegen die Adipositasprävalenz, insbesondere bei Männern, bedeutend zugenommen hat. Definiert werden Übergewicht und Adipositas über den Body-Mass-Index (BMI). Laut WHO-Kriterien liegt Übergewicht bei einem BMI von über 25 kg/m² vor, während ab einem BMI von 30 kg/m² von Adipositas gesprochen wird (WHO Technical Report Series 854, 1995).

Ausgelöst werden Übergewicht und Adipositas, wenn die Energieaufnahme durch die Nahrung den Energieverbrauch über längere Zeit übersteigt. Hierbei wird überschüssige Energie in Form von Triglyzeriden im Fettgewebe gespeichert. Die Zunahme von Fettgewebe im Körper, die zu Übergewicht und Adipositas führen kann, basiert sowohl auf dem Anstieg der Anzahl an Adipozyten (Hyperplasie) als auch auf der Zunahme des Volumens der Adipozyten (Hypertrophie). Die Hypertrophie wird hierbei als initiales Merkmal des beginnenden Übergewichts gesehen (Brook et al., 1972). Da die Adipozyten jedoch nur in einem begrenzten Maße wachsen und Triglyzeride speichern können, ist die Neubildung von Adipozyten zwingend erforderlich. Die Zunahme von Adipozyten während der Expansion von Fettgewebe kann sowohl im Fall von Übergewicht als auch bei der normalen Entstehung von Fettgewebe beobachtet werden (Knittle et al., 1979). Die molekularen Mechanismen zur Regulation der Genese von weißem Fettgewebe sind bis heute nicht genau bekannt. Während der Adipogenese differenziert sich die fibroblastenähnliche Präadipozyte zur lipidspeichernden, Insulin-sensitiven reifen Adipozyte. Dieser Differenzierungsvorgang ist äußerst dynamisch und verläuft über mehrere Entwicklungsstufen, an denen diverse Transkriptionsfaktoren beteiligt sind (Christy et al., 1989; Enerback et al., 1992; Herrera et al., 1989; Tontonoz et al., 1993). Der Ausgangspunkt der Adipogenese ist die mesenchymale

Stammzelle (MSC), welche durch Selbsterneuerung in der Lage ist den Stammzell-Pool konstant zu halten, andererseits nach einem entsprechenden Stimulus, in diverse Gewebetypen differenzieren kann. Tang et al. (2008) konnten diese Vorläuferzellen in der perivaskulären Nische des Fettgewebes nachweisen. Ist die MSC zum determinierten Präadipozyten differenziert, folgt eine Phase der Zellteilung bis zu einem Punkt, an dem die Präadipozyten durch Kontaktinhibition ihr Wachstum einstellen und aus dem Zellzyklus herausgenommen werden. Nach einem hormonellen Stimulus treten die wachstumsarretierten Präadipozyten erneut in den Zellzyklus ein und durchlaufen eine Phase der verstärkten Proliferation, die als mitotische klonale Expansion bezeichnet wird. Nach der klonalen Expansion folgt ein erneuter Zellzyklusarrest der Präadipozyten und die terminale Differenzierung beginnt mit der transkriptionalen Aktivierung von bestimmten Adipozytenspezifischen Genen. Eine Kaskade von Transkriptionsfaktoren wird schrittweise aktiviert und führt zum Insulin-sensitiven reifen Adipozyten. Diese reifen Adipozyten können unter bestimmten Umständen, wie z.B. einer Behandlung mit dem Tumor Nekrose Faktor α ($\text{TNF}\alpha$), dedifferenzieren und somit wieder Präadipozyten-Eigenschaften erlangen (Ron et al., 1992; Kirkland et al., 2002). Diverse Studien belegen, dass die klonale Expansionsphase der Präadipozyten von Bedeutung für die weitere Differenzierung zum reifen Adipozyten ist. Blockiert man den Wiedereintritt der Zellzyklus arretierten Präadipozyten in den Zellzyklus mit „DNA Polymerase Alpha Inhibitor Aphidicolin“ (Reichert et al., 1999) oder Rapamycin (Yeh et al., 1995a), verhindert man die Differenzierung zum reifen Adipozyten. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Wechselwirkung zwischen klonaler Expansionsphase und terminaler Differenzierung existiert und dass diese einen entscheidenden Einfluss auf die Adipogenese hat.

Eng verbunden mit der Adipogenese ist der Turnover der Adipozyten. Unter normalen Bedingungen entwickeln sich Adipozyten aus ihren Vorläuferzellen, um einen korrekten Fettzellen-Turnover zu gewährleisten. So werden jährlich ungefähr 10 % der vorhandenen Adipozyten ersetzt (Spalding et al., 2008). In ihrer Studie zeigten Spalding et al. (2008), dass zu Beginn einer Adipositaserkrankung weder eine erhöhte Apoptose bzw. Nekrose noch eine verstärkte Proliferation der Adipozyten festgestellt werden kann, was für eine strenge Regulation der Adipozytenzahl spricht. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Adipozytensterblichkeit zwischen schlanken und adipösen Individuen beobachtet werden (Spalding et al., 2008). Die Expansion von Fettgewebe kann u.a. auf die vermehrte Einlagerung von Triglyzeriden in voll-differenzierten Adipozyten, was wiederum zu einer Zunahme des Zellvolumens führt, zurückgeführt werden (Bjorntop, 1974; Hirsch und

Batchelor, 1976). Erreicht eine Adipozyte aber ein kritisches Zellvolumen, führt dies zur Sekretion von Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation von Präadipozyten vermitteln (Faust et al., 1978; DiGirolamo et al., 1998; Marques et al., 1998). Eine Analyse des Verhältnisses von Adipozytenvolumen zur Gesamt-Körperfettmasse, sowohl in subkutanem als auch in viszeralem Fettgewebe, ergab eine positive Korrelation, die jedoch keine lineare Beziehung beschreibt (Spalding et al., 2008). Daraus ergibt sich für Spalding, dass die Fettmasse durch die Anzahl und die Größe (Volumen) der Adipozyten bestimmt wird.

Ein bedeutendes Gen im Hinblick auf die Adipogenese ist das High Mobility Group AT-Hook Protein 2 (*HMGA2*), ein Transkriptionsfaktor der die Regulation der Genexpression beeinflusst und zur Gruppe der High Mobility Group A-Proteine (HMGA-Proteine) gehört. Die HMGA-Proteine sind Chromatin-assoziierte, säurelösliche Nicht-Histon-Proteine, die an sequenzunabhängige, spezifische Motive der DNA binden (Goodwin et al. 1973). Als architektonische Transkriptionsfaktoren erhöhen bzw. inhibieren sie über strukturelle Änderungen der Chromatinorganisation die Bindungsfähigkeit weiterer Transkriptionsfaktoren. Das humane *HMGA2*-Gen ist auf Chromosom 12q14~15 lokalisiert und verfügt über fünf Exons, die sich über eine ≥ 160 kb große genomische Ebene erstrecken. Es codiert ein 109 Aminosäuren langes Protein, dessen molekulare Masse 12 kDa beträgt. Das HMGA2-Protein ist durch drei stark konservierte DNA-bindende Domänen, die sogenannten AT-Hooks und eine saure negativ geladene C-terminale Domäne gekennzeichnet (Bustin, 1999; Reeves, 2001; Solomom et al., 1986). Die positiv geladenen AT-Hook-Motive erstrecken sich über neun Aminosäuren und beinhalten die unveränderliche Sequenz von Arg-Gly-Arg-Pro, welche von weiteren positiv geladenen Aminosäuren flankiert wird. Diese AT-Hooks erkennen und binden an AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche der DNA. Dabei werden vielmehr bestimmte Strukturen als eine spezielle Nukleotidabfolge erkannt. In Abhängigkeit von der Anzahl und dem Abstand der AT-reichen Sequenzen binden die AT-Hooks von HMGA2 an die DNA und induzieren somit eine Konformationsänderung der Doppelhelix, die die Bildung eines Enhanceosomkomplexes erlaubt. Dieser Komplex ermöglicht eine Protein-DNA- und Protein-Protein-Interaktion, welche die Genexpression ermöglicht oder inhibiert (Reeves und Beckenbauer, 2001). Über direkte Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren ist es HMGA-Proteinen auch ohne vorherige DNA-Bindung möglich, die Transkription von Genen zu beeinflussen. HMGA2 interagiert beispielsweise mit dem E1A-regulierten Transkriptionsrepressor p120^{E4F}, was wiederum zu einer Unterbrechung der Bindung von p120^{E4F} an das cAMP Response Element (CRE) in der Promotorregion vom zellzyklussteuernden *Cyclin A* führt und somit die Transkription von

Cyclin A aktiviert (Tessari et al., 2003). Die saure negativ geladene C-terminale Domäne moduliert Protein-Protein-Interaktionen (Yie et al., 1997; Noro et al., 2003), verstärkt möglicherweise die Transkriptionsfaktoraktivität (Yie et al., 1997) und ist durch posttranslationale Phosphorylierung an der DNA-Bindungsfähigkeit des HMGA2-Proteins beteiligt (Sgarra et al., 2009). Die Regulation von HMGA2 erfolgt sowohl posttranskriptional als auch posttranslational. Durch multiple Bindestellen im 3'UTR von HMGA2 sind diverse microRNAs (miRNAs) der let-7 Familie in der Lage die Genexpression von *HMGA2* posttranskriptional negativ zu regulieren (Lee et al., 2007; Mayr et al. 2007). Eine ektopische Expression von let-7 reduziert die HMGA2-Expression durch die Degradierung der *HMGA2*-mRNA (Mayr et al., 2007). Weitere Beispiele für die Inhibition von *HMGA2* durch miRNAs konnten in Mausmodellen (Mayr et al., 2007), an Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs (Hebert et al., 2007) und an uterinen Leiomyomen (Wang et al., 2007) gezeigt werden. Posttranslationale Modifikationen des HMGA2-Proteins wie z.B. Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung (Schwanbeck et al., 2000; Goodwin, 1998; Di Agostino et al., 2004), ändern seine Bindungsaffinität an DNA sowie an Proteine und beeinflussen die biologische Aktivität des HMGA2-Proteins.

Das HMGA2-Protein spielt eine bedeutende Rolle in einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Wachstum, Proliferation und Differenzierung. Während der murinen Embryonalentwicklung konnten bis zum Tag 9,5 post Conceptionem hohe *Hmga2*-Expressionen in nahezu allen Geweben ermittelt werden (Hirning-Folz et al., 1998). Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung beschränkt sich die Expression auf spezifische Organe und Gewebe, wobei die *Hmga2*-Expression hauptsächlich auf das aus dem Mesoderm abgeleitete Gewebe begrenzt ist. In adultem Gewebe ist die *HMGA2*-Expression nicht oder nur in geringem Maße detektierbar (Rogalla et al., 1996; Gattas et al., 1999). Wichtige Hinweise zur Bedeutung von HMGA2 in Bezug auf das Wachstum eines Organismus gaben klassische genetische Studien am Mausmodell. Zhou et al. konnten 1995 an einem Mausstamm mit einem Pygmy-Phänotyp, welcher aufgrund einer spontanen Mutation einem Wachstumsstopp unterworfen war und somit einen Zwergwuchs bei den Mäusen bedingt, zeigen, dass diese Mutation das *Hmga2*-Gen betraf. Untersuchungen an *Hmga2* Knock-out Mäusen konnten eine Beteiligung anderer Gene für die Ausprägung des Pygmy-Phänotyps ausschließen. Homozygote *Hmga2*^{-/-} Mäuse zeigen klassische Merkmale des Pygmy-Phänotyps wie geringes Geburtsgewicht, kraniofaziale Defekte und ein deutlich reduziertes adultes Körpergewicht (nur 40 % des Wildtypgewichts) (Zhou et al., 1995; Benson und Chada, 1994). Heterozygote *Hmga2*^{+/-} Mäuse exprimieren etwa 50 % des *Hmga2*-Levels des Wildtyps und die adulten Tiere

erreichen knapp 80 % des Wildtyp-Körpergewichts (Zhou et al., 1995). Füttert man die *Hmga2*^{-/-} bzw. *Hmga2*^{+/-} Mäuse über mehrere Wochen mit einer fettreichen Diät, was bei der Wildtypmaus zu Fettleibigkeit führt, zeigen die *Hmga2*-defizienten Mäuse keine signifikante Gewichtszunahme (Anand und Chada, 2000). Bei Fütterung einer Standarddiät konnte hingegen kein Unterschied zwischen dem Gewicht der *Hmga2*^{+/-} Maus und dem Wildtyp festgestellt werden. In ihrer Studie verglichen Anand und Chada (2000) nun das Körpergewicht von *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} Mäusen mit dem von *Hmga2*^{-/-}, *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} Mäusen. Die *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} Maus zeigt aufgrund eines Leptindefizits u.a. folgende Symptome: Adipositas, Hyperphagie, ein Diabetes-ähnliches Syndrom der Hyperglykämie und eine Glukoseintoleranz. Die Fettleibigkeit der *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} Maus ist von der Zunahme des Zellvolumens und der Anzahl der Adipozyten geprägt. Obwohl die Hyperphagie zur Fettleibigkeit beiträgt, weisen homozygote *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} Mäuse bei einer Diät, die bei Wildtypmäusen gerade zur Aufrechterhaltung des normalen Körpergewichts reicht, zudem einen enormen Zuwachs an Gewicht und Fettgewebe auf (Herberg und Coleman, 1977). Interessanterweise zeigte sich, dass die *Hmga2*^{-/-}, *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} Maus nur 27 % des Gewichts der *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} Maus aufweist. Dieses geringere Gewicht der *Hmga2*^{-/-}, *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} Maus basiert im Vergleich zur *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} Maus auf der geringeren Zellzahl im Fettgewebe (Anand und Chada, 2000).

Im Gegensatz zu den *Hmga2* Knock-out Mäusen weisen transgene *Hmga2* Mäuse, die ein trunkiertes *Hmga2*-Protein translatieren, einen Riesenwuchs und einen enormen Zuwachs an retroperitonealem und subkutanem weißem Fettgewebe, sowie eine Lipomatose im Bereich des Beckens und des Abdomens auf (Battista et al., 1999). Die transgenen *Hmga2* Mäuse sind im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern im Schnitt 15 % größer und ihr Körpergewicht ist knapp 36 % höher. Weitere große Fettdepots konnten mittels Magnetresonanztomographie bei den transgenen *Hmga2* Mäusen im Becken- und Nebenhodenbereich ausgemacht werden. Zudem besitzen sie große Fettpolster an den Nieren, am Mediastinum und im Bereich des Herzens. Histologische Untersuchungen des subkutanen Fettgewebes der Mäuse wiesen keinen Unterschied im Vergleich zu normalem Fettgewebe auf. Expressionsanalysen von Adipozyten-Differenzierungsmarkern, wie Adipozyten aP2 Gen (aP2), Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ (PPAR- γ), Lipoprotein Lipase (LPL) und Leptin, an lipomatösem Gewebe zeigten keine Veränderungen im Differenzierungsstand im Vergleich zu Fettgewebe, das nicht von der Expression des trunkierten *Hmga2*-Gens beeinflusst war. Weitere Studien an transgenen *Hmga2* Mäusen, die ebenfalls ein trunkiertes HMGA2-Protein translatieren, zeigten, neben der von Battista et al. (1999) beschriebenen Zunahme von subkutanem weißem Fettgewebe, eine Entzündung des Fettgewebes und eine

verstärkte Inzidenz von Lipomen (Arlotta et al., 2000). Die an Mausmodellen gewonnenen Erkenntnisse zur Bedeutung von *HMGA2* während des Wachstums und der Differenzierung konnten 2005 auch bei einem humanen Patienten bestätigt werden. Ligon et al. berichteten von einem acht Jahre alten Jungen, der eine perizentrische Inversion des Chromosoms 12 mit den Bruchpunkten p11.22 und q14.3 aufweist, welche zu einer verstärkten Expression eines trunkierten *HMGA2*-Gens führt (Ligon et al., 2005). Phänotypisch zeigte sich ein übermäßiges Wachstum in Bezug auf Größe und Gewicht, eine fortgeschrittene endochondrale Ossifikation, ein zerebellarer Tumor und multiple Lipome. Während beim Menschen Lipome verbreitet vorkommende Tumoren mesenchymalen Ursprungs sind, kommt es bei Mäusen äußerst selten zu diesen spontanen Läsionen. Eine Veränderung, die häufig bei humanen Lipomen auftritt, ist eine Rearrangierung der Chromosomenregion 12q13~15, die mit einer Aktivierung der sonst inaktivierten *HMGA2*-Allele assoziiert ist (Ashar et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995). Diese Aktivierung resultiert in einer verstärkten transkriptionellen Hochregulation des *HMGA2*-Gens (Tallini et al., 1997; Bartuma et al., 2009), welche maßgeblich zur Tumorbildung beiträgt. Häufig führen bei Lipomen und anderen mesenchymalen Tumoren Brüche in der Region 12q13~15 zu Translokationen, bei denen durch Fusion der Exons 1-3 des *HMGA2*-Gens mit einem neuen Open Reading Frame (ORF) des Translokationspartners Fusionsgene und chimäre Transkripte entstehen (Ashar et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995; Petit et al., 1999). Häufige Translokationspartner sind u. a. das LIM Domain Containing Preferred Translocation Partner In Lipoma (*LPP*) Gen, welches auf Chromosom 3q27-28 lokalisiert ist (Petit et al., 1996; Petit et al., 1998) und das Lipoma HMGIC Fusion Partner (*LHFP*) Gen, das auf dem langen Arm von Chromosom 13 liegt. Diese Translokationspartner bringen eine transkriptionelle Ko-Aktivator Domäne bzw. eine Protein-Protein Interaktionsdomäne in das Fusionsprotein ein und stellen somit einen ‚Gain-of-Function‘ für das neue Fusionsprotein dar. Eine Studie an einer primären Zellkultur eines Lipoms mit dem Karyotyp 46,XX,t(12;13)(q14~q22;q21~q32) zeigte die Expression eines trunkierten *HMGA2*-Proteins ohne zusätzliche fusionierte funktionelle Domäne (Ashar et al., 2003). Dieses Lipom exprimiert zusätzlich zum trunkierten *HMGA2* auch das nicht veränderte *HMGA2* vom Wildtyp-Allel, es konnte also eine diallelische Expression von *HMGA2* festgestellt werden. Ashar et al. (2003) postulierten daraufhin ein Modell zur Pathogenese von mesenchymalen Tumoren, bei denen es durch Rearrangierungen von *HMGA2* nicht zu einer ‚Gain-of-Function‘ im chimären *HMGA2*-Protein kommt und dadurch die Expression des Wildtyp-Allels von *HMGA2* ausschlaggebend für die Tumorbildung ist. Neben der transkriptionellen Aktivierung des *HMGA2*-Gens durch Rearrangierungen der

Chromosomenregion 12q14~15 in Tumoren mesenchymalen Ursprungs konnte Ayoubi et al. die *Hmga2*-Expression in ruhenden 3T3-L1 Zellen mittels Serum und Wachstumsfaktoren induzieren. Die murine Präadipozyten-Zelllinie 3T3-L1 ist ein gut charakterisiertes Differenzierungsmodell embryonalen Ursprungs, welches nach hormoneller Stimulation zu Adipozyten differenziert (Smas und Sul, 1995). Bei diesem Differenzierungsvorgang verlieren die Präadipozyten ihre fibroblastenähnliche Erscheinung, durchlaufen ein bis zwei Mitosezyklen und erlangen anschließend den morphologischen und biochemischen Phänotyp von Adipozyten. Exponentiell wachsende 3T3-L1 Präadipozyten exprimieren auf einem hohen Niveau *Hmga2*-mRNA. Induziert man die Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten durch Zugabe eines Differenzierungsmediums, welches 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin, Dexamethason und Insulin enthält, nimmt die *Hmga2*-mRNA Expression stark ab (Ayoubi et al., 1999). Eine kinetische Analyse der Expression von *Hmga2* während der Differenzierung von Präadipozyte zur Adipozyte zeigte die Charakteristiken eines Delayed-Early-Response Gens. Stimuliert man ruhende, synchronisierte 3T3-L1 Präadipozyten mit fetalem Kälberserum (FKS), induziert dies eine starke *Hmga2*-Expression, deren Peak zwischen sechs und neun Stunden nach Serumzugabe mit dem Mittelpunkt der G1-Phase des Zellzyklus korreliert und die signifikante Abnahme der *Hmga2*-Expression nach 15 Stunden mit dem Anfang der S-Phase und der DNA-Synthese zusammenfällt (Ayoubi et al., 1999). Die zeitliche Koordinierung der *Hmga2*-Expression während des Differenzierungsprozesses zeigt die bedeutende Rolle von HMGA2 in dem vorgeschalteten und notwendigen Proliferationsschritt für die späteren Phasen der Adipozytendifferenzierung. Neben FKS können auch Wachstumsfaktoren wie Fibroblast Growth Factor 1 (FGF-1) und Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) die *HMGA2*-Expression in 3T3-L1 Präadipozyten induzieren, wobei hier die Expression länger anhält (Ayoubi et al., 1999). Diverse Studien konnten FGF-1 als einen Schlüsselregulator bei der Proliferation und Differenzierung von humanen Präadipozyten identifizieren (Hutley et al., 2004; Newell et al., 2006; Widberg et al., 2009). FGF-1 beinhaltet eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, mit der es an Transmembranrezeptoren bindet (Burgess und Maciag, 1989). Diese Bindung von FGF-1 induziert die Phosphorylierung verschiedener intrazellulärer Proteine und damit eine Aktivierung der Phospholipase C γ und der MAP-Kinase (Burgess und Maciag, 1989). Der MAP-Kinase-Signalweg ist u. a. an der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt.

Eine weitere eminente Rolle spielt HMGA2 bei der Selbsterneuerung von Stammzellen. Verschiedene Studien konnten einen Rückgang der *HMGA2*-Expression, sowohl in jungen

adulten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) im Vergleich zu fetalen HSCs (Kiel et al., 2005), als auch in neuronalen Stammzellen (NSC) im Vergleich zu ihren Progenitoren (Nishino et al., 2008) nachweisen. Ein reduziertes Selbsterneuerungspotential von NSCs konnte an *Hmga2*-defizienten Mäusen während der Embryonalentwicklung und während des jungen Erwachsenenalters gezeigt werden. Dies verringert die Stammzellichte bei der Geburt und im fortgeschrittenen Erwachsenenalter. Mit dem verringerten Selbsterneuerungspotential war eine signifikante Reduzierung der Proliferation innerhalb der Stammzell-Kolonie assoziiert. Eine induzierte *HMGA2*-Überexpression konnte den Selbsterneuerungsdefekt in *HMGA2*-defizienten NSCs wiederum aufheben (Nishino et al., 2008). Die Abnahme der *HMGA2*-Expression mit fortschreitendem Alter geht mit einer erhöhten Expression von *p16^{Ink4a}*, *p14^{Arf}* und der miRNA *let-7b* (Nishino et al., 2008) einher. *p16^{Ink4a}* und *p14^{Arf}*, (ein vorgelagerter Agonist von p53) sind Zellzyklusinhibitoren und werden im *CDKN2A*-Lokus kodiert. Die Expression dieses Lokus führt zu einem Zellzyklusarrest, der letztendlich zur zellulären Seneszenz führt oder Apoptose induziert (Lowe und Sherr, 2003). Die tumorsuppressiven Eigenschaften von *p16^{Ink4a}* und *p14^{Arf}* stellen einen Schutzmechanismus bei einer Überexpression von *HMGA2* dar, um eine unkontrollierte Zellerneuerung zu verhindern (Nishino et al., 2008, Markowski et al., 2011a). Die Zunahme von seneszenten Zellen ist generell mit altersbedingten Erkrankungen assoziiert. Bei A^y-Mäusen, die durch exzessive Kalorienaufnahme unter Fettleibigkeit und einer Diabetes Typ II-ähnlichen Erkrankung leiden, kann eine Seneszenz-assoziierte Zunahme der β -Galaktosidase-Aktivität, eine erhöhte Expression von *p53* und eine verstärkte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen im Fettgewebe festgestellt werden. Letzteres führt zu einer Insulinresistenz (Minamino et al., 2009). Untersuchungen an Fettgewebe von Individuen mit Diabetes zeigten eine verstärkte β -Galaktosidase-Aktivität sowie eine erhöhte Expression von *p53* und *CDKN1A*-mRNA (*p21*) im Vergleich zu Nicht-Diabetikern. Zudem ließ sich eine signifikante Erhöhung von inflammatorischen Zytokinen feststellen, was vermuten lässt, dass die Seneszenz von Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Diabetes spielt (Minamino et al., 2009). Neuere Studien konnten zudem eine Verbindung zwischen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) im *HMGA2*-Lokus und dem Risiko an Diabetes Typ II zu erkranken feststellen (Ohshigo et al., 2011; Voight et al., 2010; Dayeh et al., 2013).

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zur Adipogenese beitragen ist im Hinblick auf die steigende Adipositasprävalenz in der Bevölkerung von zunehmender Bedeutung. Dem *HMGA2*-Gen kommt bezüglich der Hyperplasie im Fettgewebe und dem Turnover der Adipozyten eine tragende Rolle zu. Der Großteil der gewonnenen Erkenntnisse

über die Wirkungsmechanismen von *HMGA2* in Adipozyten wurde am Mausmodell bzw. in Zellkulturversuchen gewonnen. *In vivo* Studien an Tieren (wie z. B. Hunden), deren Genom höhere Homologien zum menschlichen Genom aufweist und am Menschen selbst sind hingegen kaum zu finden. Ein besseres Verständnis der *HMGA2*-Funktion im humanen Fettgewebe könnte neue Therapieansätze und diagnostische Biomarker hervorbringen, die bei der nachhaltigen Behandlung von Übergewicht und Adipositas helfen könnten. Die heutigen Methoden zur Bekämpfung von Adipositas mittels nicht invasiver Hilfsmittel, wie medikamentöser Appetitzügler oder Medikamente (z.B. Orlistat), die die Fettaufnahme verringern, sind nicht nachhaltig, wohingegen chirurgische Eingriffe, bei denen der Magen verkleinert (Resektion, Shunt) oder das Magenvolumen mittels Magenballon oder -ring verringert wird, stark Risiko behaftet sind. In der vorliegenden Arbeit sollten Expressionsmuster von *HMGA2*, *p14^{Arf}* und *CDKN1A* an humanem und caninem subkutanem abdominalem weißem Fettgewebe, Lipomen sowie an aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen (ADSC) im Zusammenhang mit der Hyperplasie von Fettgewebe und dem Turnover von Adipozyten analysiert werden. Zudem sollte eine mögliche Verbindung zwischen der Diabetes Typ II Erkrankung und der *HMGA2*-Expression untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebeproben

Die Gewebeproben der verwendeten humanen Lipome (Publikation I) wurden von Prof. Dr. F. Mertens vom Universitätsklinikum Skåne, Universität Lund und das humane subkutane abdominale Fettgewebe (Publikation I, II und III) wurden von Prof. Dr. H. Wenk vom Klinikum Bremen-Nord bereitgestellt. Die caninen subkutanen Fettgewebe (Publikation I) stammten von der Kleintierklinik der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Prof. Dr. I. Nolte). Für die Erstellung von Primärkulturen (Publikation I) wurden die entnommenen Gewebeproben während der Operation in steriles Hanks-Medium überführt. Weitere Gewebeproben (Publikation I, II und III) wurden für die RNA-Isolierung während oder direkt nach der Operation in flüssigem Stickstoff gelagert. Für alle verwendeten humanen Gewebeproben wurden die Forderungen der Deklaration von Helsinki erfüllt. Eine schriftliche Einverständniserklärung für die Verwendung der Gewebeproben wurde von den Patienten gegeben.

2.2 Isolierung und Kultivierung von humanen und caninen ADSCs

Subkutanes canines und humanes weißes Fettgewebe wurde für die Erstellung von Primärkulturen (Publikation I) mechanisch in kleine Stücke zerkleinert und anschließend mit 0,26 % (200 U/ml) Collagenase behandelt. Die Isolierung der ADSCs aus diesen Proben erfolgte nach dem Protokoll von Planat-Bénard (2003). Die weitere Kultivierung erfolgte mit Medium 199 + 10 % FKS bei 37 °C und einer wassergesättigten 5 %-igen CO₂-Atmosphäre im Brutschrank. Nach jeweils drei Tagen erfolgte der Austausch des Mediums und bei konfluenten Zellrasen erfolgte das Passagieren der Zellkultur unter Verwendung von TrypLE.

2.3 Stimulierung von Fettgewebsexplantaten

Kleine Fettgewebstücke wurden für die Stimulierung mit FGF1 (Publikation I) in eine 6-Well-Platte mit Medium 199 + 1 % FKS überführt. Nach 24-stündiger Stimulation wurden die Explantate für die folgende RNA-Isolierung geerntet. Als Kontrollansätze dienten nicht-stimulierte Fettgewebsexplantate, die 24 h nach dem Aussäen geerntet wurden.

2.4 Stimulierung von humanen ADSCs mit FGF1

Bei der Stimulation von humanen ADSCs mit FGF1 (Publikation I) wurden 300.000 ADSCs pro 9,6 cm² Schale ausgesät. Nach 24 h wurde die Serumkonzentration auf 1 % FKS reduziert und nach weiteren 24 h wurde das Medium durch serumfreies Medium ergänzt mit 25 ng/ml humanem rekombinatem FGF1 ersetzt. Nach 24-stündiger Stimulation wurden die Zellen für eine RNA-Isolierung geerntet. Als Kontrollansatz dienten ADSCs die mit Medium 199 + 1 % FKS kultiviert wurden. Für den Western Blot Ansatz (Publikation I) wurden 35.000 ADSCs pro 9,6 cm² Schale ausgesät und für 72 h bzw. 120 h mit 25 ng/ml FGF1 stimuliert. Als Kontrollansatz dienten ADSCs die nicht mit FGF1 stimuliert wurden. Für die immunhistochemische Untersuchung (Publikation I) wurden humane ADSCs mit einer Dichte von 200.000 Zellen pro 76 x 26 mm Objektträger ausgesät. Nach 72 h wurde die Serumkonzentration auf 1 % FKS 24 h vor der Stimulierung mit FGF1 reduziert. Anschließend wurde das Medium durch serumfreies Medium mit 25 ng/ml bzw. 50 ng/ml FGF1 ausgetauscht. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit Medium 199 + 1 % FKS ohne FGF1 kultiviert. Nach 48 h bzw. 72 h nach der Stimulierung mit dem Wachstumsfaktor wurde das Medium entfernt und die Zellen in 96 % Ethanol auf dem Objektträger fixiert.

2.5 Western Blot

Für die Bestimmung der HMGA2-Proteinkonzentration nach Stimulierung mit FGF1 (Publikation I) mittels Western Blot wurde die Extraktion der Proteine mit RIPA-Puffer durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Pierce BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben bestimmt. 4,5 µg Gesamtprotein wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde dann mit HMGA2- und Beta-Actin-Antikörper inkubiert und die Proteinbanden wurden mittels NBT/BCIP-Substrat visualisiert. Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte mit dem Programm ImageJ.

2.6 Immunhistochemische Untersuchung an stimulierten humanen ADSCs

Der immunhistochemische Nachweis von HMGA2-Proteine (Publikation I) in stimulierten humanen ADSCs wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Helmke vom Institut für Pathologie des Elbeklinikums Stade mittels eines DAKO ChemMate Detektions-Kits und eines halbautomatischen DAKO TechMate Färbeautomaten nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Antigendemaskierung wurden die Objektträger anschließend in einem PT Link Modul

mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution behandelt. Der verwendete HMGA2-Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1 zu 100 verdünnt.

2.7 Restimulierung von caninen ADSCs mit FGF1

Für die Restimulierungsexperimente mit FGF1 (Publikation I) wurden canine ADSCs wie unter 2.4 beschrieben ausgesät und kultiviert. Anstatt die ADSCs nach 24 h nach der FGF1 Stimulation zu ernten, wurde der Ansatz nach 72 h erneut mit 25 ng/ml FGF1 restimuliert. Als Kontrolle dienten ADSCs kultiviert in Medium 199 + 1 % FKS ohne FGF1. Nach 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 84 h und 96 h wurden die jeweiligen Zellansätze geerntet und eine RNA-Isolierung durchgeführt.

2.8 RNA-Interferenz mittels HMGA2 spezifischen siRNAs

Humane ADSCs wurden mit 4 HMGA2-spezifischen siRNAs mittels SureFECT transfection reagent transfiziert. Am Tag vor der Transfektion wurden in einer 6-Well-Platte humane ADSCs mit einer Dichte von 200.000 Zellen pro 9.6 cm² Schale mit Medium 199 + 20 % FKS und Antibiotika ausgesät. Für die Transfektion wurde das Medium durch 2 ml Medium 199 + 1 % FKS ergänzt mit 25 ng/ml FGF1 ersetzt, die Zellen wurden dann mit 2 µM der jeweiligen HMGA2-spezifischen siRNA mittels 6 µl Transfektion-Reagenz transfiziert. Als Negativ-Kontrolle wurde nicht-spezifische siRNA zu humanen ADSCs gegeben. Die Zellen wurden unter normalen Kulturbedingungen gehalten und nach 24 h nach der Transfektion für die qRT-PCR Analyse geerntet.

2.9 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung (Publikation I, II und III) wurde nach Herstellerangaben mittels RNeasy Mini Kit auf einem QIAcube durchgeführt. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Qiazol Lysis Reagenz und die RNA wurde auf miRNeasy Säulen aufgereinigt. Auf der Säule fand ein DNA-Verdau mittels DNase während der RNA-Isolierung statt.

2.10 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese (Publikation I, II und III) wurde 250 ng RNA mittels 200 U M-MLV Reverse Transkriptase, RNase Out und 150 ng Random Hexamer nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die RNA wurde bei 65 °C für 5 min denaturiert und anschließend mindestens 1 min auf Eis gelagert. Nach der Zugabe des Enzyms wurde für das Annealing der

Random Hexamere an die RNA der Mix für 10 min bei 25 °C inkubiert. Die anschließende Reverse Transkription wurde bei 37 °C für 50 min durchgeführt, gefolgt von einer 15 min Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70 °C. Die cDNA Synthese für die absolute quantitative Real-Time PCR (Publikation I) wurde wie oben beschrieben durchgeführt mit einer Ausnahme. Anstelle der Random Hexamere wurden canine HMGA2 reverse Primer benutzt, zudem entfiel der Annealing Schritt bei 25 °C für 10 min.

2.11 Quantitative Real-Time PCR

Die relative Quantifizierung der Genexpression wurde mittels Real-Time PCR auf dem Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System durchgeführt. Kommerziell erhältliche Genexpressions-Assays wurden zur Quantifizierung der mRNA-Level von *p14^{Arf}*, *CDKN1A*, *HMGA2*, *PPAR-γ* und *MKi67* verwendet. Als endogene Kontrolle für die humanen Zellen wurde, wie von Markowski et al. (2010) beschrieben, *HPRT* genutzt. Für die Amplifizierung des caninen *HMGA2* wurden folgende Primer 5'-AGT CCC TCC AAA GCA GCT CAA AAG-3' (forward), 5'-GCC ATT TCC TAG GTC TGC CTC-3' (reverse) und als Sonde 5'-6-FAM- GAA GCC ACT GGA GAA AAA CGG CCA-TAMRA-3' verwendet. Bei den caninen Zellen diente das Housekeeping Gen *GUSB* (Beta-Glucuronidase) als Referenz für die relative Quantifizierung der Gene. Folgende Primer/Sonde wurde für die Vervielfältigung der *GUSB* mRNA benutzt: 5'- TGG TGC TGA GGA TTG GCA-3' (forward), 5'- CTG CCA CAT GGA CCC CAT TC-3' (reverse) und 5'-6-FAM-CGC CCA CTA CTA TGC CAT CGT GTG T-TAMRA-3' (Sonde). Alle gemessenen Proben wurden dreifach bestimmt. Die Quantifizierung der Genexpression wurde in 96-Well Platten mit der zu untersuchenden cDNA des jeweiligen genspezifischen Assays und des Universal-PCR-Mastermixes durchgeführt. Das Temperaturprofil der Real-Time PCR Reaktion folgte den Herstellerangaben: Bei 50 °C erfolgt eine 2-minütige Inkubation mit Uracil-N-Glykosylase, gefolgt von der Deaktivierung von Uracil-N-Glykosylase und gleichzeitiger Denaturierung des Templates bei 95 °C für 10 min. Anschließend folgte die Amplifikation in 50 Zyklen beginnend mit der Denaturierung für 15 sec bei 95 °C und der Kombination aus Annealing/Elongation für 60 sec bei 60 °C. Die erhaltenen Daten wurden mittels vergleichender C_T-Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode) ausgewertet.

Die absolute Quantitative Real-Time PCR (Publikation I) wurde mit den oben beschriebenen caninen *HMGA2* Primern/Sonde durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Kalibrierungskurve mit

bekannten Konzentrationen von HMGA2dog Standard Oligonucleotiden erstellt und die gemessenen Signale wurden der Kalibrierungskurve zugeordnet.

2.12 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten, sowie die Erstellung der Selbstorganisierten Karten (Publikation III) wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Manfred Wischnewsky vom eScience Lab der Universität Bremen mittels Levene-Test, Kolgomorov-Smirnov-Test, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test und Kendalls-Tau-b-Test (Publikation II und III) durchgeführt. Die statistischen Analysen in der Publikation I wurden mit Hilfe des t-Tests vorgenommen.

3 Ergebnisse

Eine Zunahme von Fettgewebe kann sowohl während der Ontogenese als auch bei der Entstehung von Übergewicht bzw. Adipositas beobachtet werden. Hypertrophie ist vermutlich das initiale Ereignis auf dem Weg zum Übergewicht. Die Adipozyten erreichen jedoch irgendwann eine Größe bei der Diffusionsprozesse, die für die Einlagerung neuer Triglyzeride notwendig sind, nicht mehr schnell genug ablaufen können (Faust et al., 1978; DiGirolamo et al., 1998; Marques et al., 1998). Um den Bedarf an neuem Speicherplatz für Triglyzeride zu decken, müssen daher neue Präadipozyten rekrutiert werden. Ein Gen, welches an den hierzu notwendigen Prozessen der Zellproliferation und –differenzierung maßgeblich beteiligt ist, ist *HMGA2*. *Hmga2* Knock-out-Mäuse zeigen ein geringeres Geburtsgewicht und erlangen nur etwa 40 % des adulten Körpergewichts des Wildtyps (Zhou et al., 1995), während transgene *Hmga2* Mäuse hingegen ein um etwa ein Drittel höheres Körpergewicht als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister aufweisen (Battista et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Rolle von HMGA2 im Bezug auf den Turnover von Adipozyten und die Hyperplasie in weißem subkutanen Fettgewebe untersucht.

3.1 Publikation I: Permanent Activation of HMGA2 in Lipomas Mimics Its Temporal Physiological Activation Linked to the Gain of Adipose Tissue (Thies et al., 2012):

Zhou et al. (1995) entwickelten eine Hypothese die besagt, dass *Hmga2* für die proliferative Expansion von Präadipozyten notwendig ist. *Hmga2* Knock-out-Mäuse haben aus diesem Grund eine eingeschränkte Fähigkeit zur Expansion von Präadipozyten, was wiederum zu einer geringen Anzahl von reifen Adipozyten führt (Anand und Chada, 2000). Im Gegensatz dazu steht die permanente HMGA2-Überexpression in differenzierten mesenchymalen Zellen, wie z. B. in Lipomen mit 12q14~15-Rearrangierung und anderen differenzierten mesenchymalen Tumoren (Ashar et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995). In dieser Studie sollten mögliche Gemeinsamkeiten zwischen der Aktivierung von *HMGA2* durch Stimulation von ADSCs mit FGF1 und der Überexpression von *HMGA2* in Lipomen untersucht werden. Des Weiteren wurden *HMGA2*-Expressionsanalysen an caninem subkutanem Fettgewebe durchgeführt.

In Zellkulturversuchen konnte belegt werden, dass FGF1 die *HMGA2*-Expression sowohl in der murinen immortalisierten Präadipozytenzelllinie 3T3-L1 (Ayuobi et al., 1999) als auch in

humanen Adipose Tissue-Derived Stem Cells (ADSCs) (Markowski et al., 2011a) aktiviert. Es ist bekannt, dass adultes Gewebe kaum bzw. kein *HMGA2* exprimiert (Rogalla et al., 1996). Trotzdem wäre denkbar, dass einige Zellen in diesen Geweben in der Lage sind, nach einem geeigneten Stimulus eine *HMGA2*-Antwort auszuführen. Um dies zu überprüfen, wurde ein humanes Fettgewebsexplantat mittels FGF1 stimuliert und anschließend die *HMGA2*-Expression gemessen. 24 Stunden nach der Stimulation mit FGF1 konnte eine höchstsignifikante ($p < 0,001$) Hochregulierung von *HMGA2* beobachtet werden. Stimuliert man nun natives Fettgewebe sowie ADSCs, die aus diesen nativen Fettgeweben gewonnen wurden, mit FGF1, zeigt sich, dass die *HMGA2*-Expressionen der ADSC-Zellkulturen signifikant ($p < 0,001$) stärker zunehmen als die Expressionen der nativen Fettgewebsexplantate. Zudem konnte ein höchst signifikanter Anstieg ($p < 0,001$) der Expressionen von *p14^{Arf}* und *CDKN1A* in den kultivierten ADSCs im Vergleich zu den Geweben beobachtet werden. Dass die Hochregulierung von *HMGA2* auch auf Proteinebene festzustellen ist, zeigen der Western-Blot und die immunhistochemische Analyse der FGF1-stimulierten ADSCs. 72 Stunden nach Stimulierung der ADSCs mit 25 ng/ml FGF1 konnte ein 46,1 %iger Anstieg des *HMGA2*-Proteins gegenüber der nicht stimulierten ADSC-Kontrolle festgestellt werden. Nach 120 Stunden konnte lediglich noch eine sehr geringe *HMGA2*-Proteinkonzentration in beiden Ansätzen nachgewiesen werden. Eine Restimulierung der ADSCs mit FGF1, 72 Stunden nach der initialen Stimulierung, zeigte einen erneuten *HMGA2*-Anstieg.

Die Proliferation von ADSCs wird folglich durch FGF1 reguliert. Um eine Beteiligung von *HMGA2* an der Proliferation zu untersuchen, wurden ADSCs mit FGF1 stimuliert und gleichzeitig mit siRNAs gegen *HMGA2*-mRNA transfiziert. Sowohl die Expression von *HMGA2* als auch die des Proliferationsmarkers *MKi67* zeigten eine höchst signifikante Abnahme im Vergleich zu den mit unspezifischen siRNAs transfizierten ADSCs.

Der gleichzeitige Anstieg der *HMGA2*- und *p14^{Arf}*-Expression in ADSCs konnte auch in MSCs und in *HMGA2*-rearrangierten uterinen Leiomyomen (Markowski et al., 2011a) festgestellt werden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den beiden Genexpressionen auch in Lipomen nachzuweisen, wurden 19 Lipome analysiert, wobei eine höchst signifikante Korrelation der beiden Gene festgestellt werden konnte.

Um eine Reaktivierung der *HMGA2*-Expression auch *in vivo* nachzuweisen, wurde abdominales subkutanes Fettgewebe von Hunden ($n = 71$) untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von *PPAR- γ* in diesem Fettgewebe analysiert. In *PPAR- γ* -defizienten Mäusen

konnte das komplette Fehlen von weißem und braunem Fettgewebe beobachtet werden (Barak et al. 1999). Zudem ist die Größe der Adipozyten in Mäusen, die eine fettreiche Diät erhielten, positiv mit der Expression von *PPAR-γ* korreliert (Kubota et al., 1999). Somit stellt *PPAR-γ* einen Marker für die fortschreitende Adipogenese dar.

Die Expression der *HMGA2*-Transkripte variierte zwischen 378,14 und 52697,85 Transkripten. Anschließend wurden ausgewachsene reinrassige Hunde (n = 23) in eine normal- und eine übergewichtige Gruppe unterteilt. Eine fünffache höhere *HMGA2*-Expression konnte in der Gruppe übergewichtiger Hunde (14757,49 *HMGA2*-Transkripte) ausgemacht werden ($p < 0,05$). Die Zahl der *HMGA2*-Transkripte lag bei den normalgewichtigen Hunden bei 2954,59. Zudem zeigten diese eine 1,5-mal so hohe Expression von *PPAR-γ* im Vergleich zu den übergewichtigen Hunden. Die *PPAR-γ*-Expression nahm signifikant mit dem Anstieg der *HMGA2*-Transkripte ab. Im Gegensatz zur normalgewichtigen Gruppe konnte mit zunehmendem Alter der übergewichtigen Hunde ein signifikanter Anstieg der *HMGA2*-Transkripte beobachtet werden.

I

Permanent Activation of HMGA2 in Lipomas Mimics Its Temporal Physiological Activation Linked to the Gain of Adipose Tissue

Helge Wilhelm Thies, Ingo Nolte, Heiner Wenk, Fredrik Mertens, Jörn Bullerdiek,
Dominique Nadine Markowski

(Obesity DOI: 10.1002/oby.20137)

Permanent Activation of HMGA2 in Lipomas Mimics Its Temporal Physiological Activation Linked to the Gain of Adipose Tissue

Helge W. Thies¹, Ingo Nolte², Heiner Wenk³, Fredrik Mertens⁴, Jörn Bullerdiek^{1,2} and Dominique N. Markowski¹

Objective: In this study the activation of *HMGA2* and overexpression by FGF1-driven stimulation of adipose tissue derived stem cells (ADSCs) in adipose tissue tumors were analyzed. In addition, the expression of *HMGA2* and *PPAR-gamma* mRNA were quantified in canine subcutaneous abdominal adipose tissue from normal and overweight purebred dogs.

Design and Methods: ADSCs and adipose tissue explants stimulated with FGF1 followed by gene expression analyses of *HMGA2* and *p14^{Arf}* using Western-blot and qRT-PCR. Furthermore, canine subcutaneous white adipose tissue (WAT) were analyzed by qRT-PCR for their expression of *HMGA2* and *PPAR-gamma*.

Results: ADSCs and adipose tissue explants are able to execute a *HMGA2* response upon FGF1 stimulation. FGF1 enhances proliferation of ADSCs by a *HMGA2*-dependent mechanism. In lipomas increase of *HMGA2* is accompanied by increased expression of *p14^{Arf}*. Furthermore, a significantly elevated level of *HMGA2* in overweight dogs and a negative correlation between the expression of *HMGA2* and *PPAR-gamma* in subcutaneous cWAT were noted.

Conclusions: These results suggest that WAT contains cells that as essential part of adipogenesis up-regulate *HMGA2* resulting from growth factor stimulation. In subgroups of lipoma, constitutive activation of *HMGA2* due to rearrangements replaces the temporal response triggered by growth factors.

Obesity (2012) **00**, 0000-0000. doi:10.1002/oby.20137

Introduction

The gene locus encoding high mobility group protein AT-hook 2 (*HMGA2*) is rearranged in a variety of tumors mostly of mesenchymal origin, including lipomas (1,2). This results in a strong transcriptional upregulation of *HMGA2* (3,4), likely contributing to tumorigenesis. There are strong experimental data linking *HMGA2* with hyperplasia of white adipose tissue (WAT). Transgenic mice expressing a truncated *Hmga2* still retaining the three AT-hook domains present a giant phenotype with hyperplasia of WAT (5). Vice versa, *Hmga2* knockout mice show a pygmy phenotype with hypoplasia of WAT (6). Likewise, a lack of *HMGA2* impairs lineage commitment of stem cells toward pre-adipocytes (7). Although *HMGA2* was identified as the target gene of 12q14-15 rearrangements in lipomas more than 15 years ago (1,2), the exact mechanism by which *HMGA2* overexpression drives benign tumorigenesis in a target cell is still widely unknown. Moreover, the target cell has not yet been identified unambiguously.

Rare cases of multilineage differentiation, e.g., giving rise to chondro-lipomas suggest an origin from multipotent stem cells as hypothesized by Rogalla et al. (8). In WAT, new fat cells develop from their progenitors to keep homeostasis (9) or as a result of overnutrition resulting in a net increase of body fat in part due to hyperplasia. In both cases, stem and/or progenitor cells are targeted by appropriate stimuli to initiate proliferation and proper differentiation. Evidence has been presented that the growth factor FGF1 is a key mediator of adipogenesis (10-12). Herein, we have performed a series of experiments addressing possible similarities between the activation of *HMGA2* by FGF1-driven stimulation of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) and its overexpression in lipomas. The results suggest that the permanent overexpression of *HMGA2* due to chromosomal rearrangements in lipomas mimics its temporal activation by growth factors. Accordingly, the induction of hyperplasia by activation of *HMGA2* may be a mechanism relevant for the gain of adipose tissue resulting from overnutrition during adult life. If this hypothesis holds

¹ Center of Human Genetics, University of Bremen, Leobener Strasse ZHG, D-28359 Bremen, Germany. Correspondence: Dominique N. Markowski (dominique.markowski@uni-bremen.de) ² Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine, Bünteweg 9, D-30559 Hannover, Germany ³ Department of General and Vascular Surgery, Clinical Center Bremen-Nord, Hammersbecker Str. 228, D-28277 Bremen, Germany ⁴ Department of Clinical Genetics, University and Regional Laboratories, Skåne University Hospital, Lund University, Lund, Sweden

Disclosure: The authors declared no conflict of interest.

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: Nothing to report. Full financial disclosures and author notes may be found in the online version of this article. Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Received: 5 March 2012 **Accepted:** 16 October 2012 **Published online** 6 November 2012. doi:10.1002/oby.20137

true, one would expect to identify a higher expression of *HMGA2* in overweight individuals than in those with a body weight in the normal range. Thus, we have additionally investigated biopsies from canine donors of both groups for possible differences in their *HMGA2* expression. We choose the canine model because dogs and humans share the same environment, have a similar nutrition, and the genomes of humans and dogs show a higher nucleotide consensus than human and mouse (13). Overall, the results of a series of experiments suggest that WAT contains cells that as an essential part of adipogenesis upregulate *HMGA2* as a result of growth factor stimulation. In subgroups of lipoma, constitutive activation of *HMGA2* due to rearrangements replaces the temporal response triggered by growth factor.

Methods and Procedures

Tissue samples

Human lipomas, normal human subcutaneous abdominal WAT (hWAT), and canine WAT (cWAT) used in this study were taken during surgery and immediately frozen in liquid nitrogen. Before surgery, informed consent was obtained from all patients. As for the use of cWAT, a general permission was given by the responsible national agency (Lower Saxony state office for consumer protection and food safety, no. 07A512).

Isolation and culture of canine and human ADSC

Subcutaneous cWAT as well as hWAT were taken during surgery and transferred into sterile Hank's solution. For cell culturing, samples were minced into small pieces followed by treatment with 0.26% (200 U/ml) collagenase 8 (Serva, Heidelberg, Germany). From these samples, ADSCs were isolated as described (14). Cells were subcultured in medium 199 (Gibco, Karlsruhe, Germany) with 10% fetal bovine serum (FCS; Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and antibiotics.

Stimulation of tissue explants by FGF1

For stimulation with FGF1 (25 ng/ml human recombinant FGF1; Jena Bioscience, Jena, Germany), small pieces of adipose tissue were plated in six-well plates containing medium 199 supplemented with 1% FCS. After stimulation for 24 h, explants were harvested for total RNA extraction. As controls, nonstimulated explants were harvested 24 h after plating.

Stimulation of human stem cells by FGF1

For stimulation with FGF1, human ADSCs were plated at a density of 300,000 cells/9.6-cm² dish. After 24 h, serum concentration was reduced to 1%, and after a further 24 h, the medium was replaced by serum-free medium supplemented with 25 ng/ml of human recombinant FGF1 (Jena Bioscience). After stimulation for 24 h, cells were harvested and total RNA was extracted. As controls, ADSCs were cultured in medium 199 supplemented with 1% FCS without FGF1.

For western blot analysis, human ADSCs were plated at a density of 35,000 cells/9.6-cm² dish and were stimulated with 25 ng/ml FGF1 (Jena Bioscience) for 72 and 120 h. As control, proteins were harvested from cultures without prior stimulation of the cells.

For immunohistochemical studies, human ADSCs were plated at a density of 200,000 cells/76 × 26-mm slide. After 72 h, serum concentration was reduced to 1% 24 h before stimulation. Subsequently, medium was replaced by serum-free medium supplemented with 25

ng/ml and 50 ng/ml FGF1 (Jena Bioscience). As controls, cells were cultured in medium 199 supplemented with 1% FCS without FGF1. Forty-eight as well as 72 h after growth factor addition, medium was removed and cells were fixated with 96% ethanol.

Western-blot analysis

Protein extracts were obtained using RIPA buffer and concentrations were determined using a BCA protein assay (Thermo Scientific, Rockford, USA) according to the manufacturer's instructions. Total protein (4.5 µg per lane) was separated using a SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. Novex Sharp Protein Standard (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used as marker. The membranes were incubated with primary anti-HMGA2-P1 (rabbit, polyclonal, 1:1,500; Biocheck, CA) and anti-beta-actin (mouse, 1:15,000; Novus Biologicals, Cambridge, USA) followed by incubation with the corresponding secondary antibody [Bovine anti-rabbit IgG alkaline phosphatase-conjugated (1:5,000) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and Goat anti-mouse IgG (H+L) alkaline phosphatase-conjugated (1:5,000) (Life Technologies, Darmstadt, Germany)]. The bands were visualized by incubating the membrane with NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Immunoblots were scanned using a flatbed scanner and image analysis was performed with the ImageJ gel analysis algorithm.

Immunohistochemical studies of human ADSCs

The immunohistochemical staining for the HMGA2 protein (anti-HMGA2-P1, rabbit, polyclonal; Biocheck, CA) was performed using a detection kit (DAKO ChemMate, DAKO, Glostrup, Denmark) and a semi-automated stainer (DAKO TechMate, DAKO, Glostrup, Denmark) according to the specifications of the manufacturer. For antigen retrieval, the slides were treated in a PT Link module (DAKO, Glostrup, Denmark) using the EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (DAKO, Glostrup, Denmark). The antibody dilution was 1:100.

Restimulation of canine stem cells by FGF1

For restimulation experiments with FGF1, canine ADSCs were plated and cultured as described above. After 72 h, cells were restimulated with 25 ng/ml FGF1. As controls, cells were cultured in medium 199 supplemented with 1% FCS without FGF1. Cells were harvested and total RNA was extracted 6, 12, 24, 48, 72, 84, and 96 h after first growth factor addition.

RNA-interference

Human ADSCs were transfected with four *HMGA2*-specific siRNAs (SI03074302, SI03077963, SI03029929, and SI03067393 (QIAGEN, Hilden, Germany)) by SureFECT transfection reagent (SABiosciences, Frederick, USA) by forward transfection. The day before transfection cells were plated at a density of 200,000 cells/9.6-cm dish in six-well plates containing medium 199, supplemented with 20% FCS and antibiotics, and kept under normal culture conditions. On the day of transfection, medium was replaced by 2 ml medium 199 supplemented with 1% FCS, 25 ng/ml FGF1, and antibiotics. Cells were transfected with 2 µM of each of the four *HMGA2*-specific siRNAs using 6 µl transfection reagent. Nonspecific siRNA (AllStars Negative Control siRNA, QIAGEN) was used as negative control. Cells were kept under normal culture conditions and harvested 24 h after transfection for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis.

RNA isolation

Total RNA was isolated using an RNeasy mini kit (Qiagen) in a QIAcube (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and DNase I digestion was performed. For RNA isolation, 700 μ l Qiazol Lysis Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) were added to 100 mg subcutaneous cWAT. Total RNA was isolated with Qiazol Lysis Reagent (Invitrogen) and purified on a Qiagen miRNeasy column (Qiagen). DNase digestion was carried out in the column during RNA extraction (RNase-free DNase Set, Qiagen).

cDNA-synthesis

About 250 ng of total RNA were reverse transcribed with 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen), RNase Out and 150 ng random hexamers according to the manufacturer's instructions. RNA was denatured at 65°C for 5 min and subsequently kept on ice for 1 min. After adding the enzyme to the RNA primer mixes, samples were incubated for 10 min at 25°C to allow annealing of the random hexamers. Reverse transcription was performed at 37°C for 50 min followed by inactivation of the reverse transcriptase at 70°C for 15 min.

cDNA synthesis for the use in quantitative real-time polymerase chain reaction

A total of 250 ng of total RNA was reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen), RNase Out (Invitrogen), canine *HMGA2* reverse primer (Biomers.net, Ulm, Germany), and dNTPs according to the manufacturer's instructions. RNA was denatured at 65°C for 5 min and subsequently kept on ice for 1 min. After adding the enzyme to the RNA primer mixes, reverse transcription was performed at 37°C for 50 min followed by inactivation of the reverse transcriptase at 70°C for 15 min.

Quantitative real-time PCR

Relative quantification of transcription levels was carried out by real-time PCR analyses using the Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Commercially available gene expression assays (Applied Biosystems) were used for quantification of mRNA of *p14^{Arf}* (Hs00924091), *CDKN1A* (Hs99999142), *MKI67* (Hs00606991_m1), and *HMGA2* (Hs00171569). *HPRT* served as endogenous control as described before (15).

Primers and probe used to amplify canine *HMGA2* were 5'-AGT CCC TCC AAA GCA GCT CAA AAG-3' (forward), 5'-GCC ATT TCC TAG GTC TGC CTC-3' (reverse), and 5'-6-FAM-GAA GCC ACT GGA GAA AAA CGG CCA-TAMRA-3' (probe). Primers and probe used to amplify canine *PPAR-gamma* were 5'-AGG CCA AGG ATT CAT GAC AAG GGA-3' (forward), 5'-CAC AGC AAA CTC AAA CTT TGG CTC C-3' (reverse), and 5'-6-FAM-AGC CTG AGA AAG CCC TTT GGT GAC TT-TAMRA-3' (probe). For canine cells, the housekeeping gene beta-glucuronidase (*GUSB*) served as the reference for relative quantification because in contrast to some other housekeeping genes its expression turned out not to increase in serum starved ADSCs when induced by fetal serum in our own experiments. Moreover, in a paper by Gorzelnik et al. (16), it was shown that in preadipocytes *GUSB* mRNA remained relatively constant when they were not subjected to differentiation toward mature adipocytes. To amplify the *GUSB* mRNA, the primers 5'-TGG TGC TGA GGA TTG GCA-3' (forward), 5'-CTG CCA CAT GGA CCC CAT TC-3' (reverse), and probe 5'-6-FAM-CGC

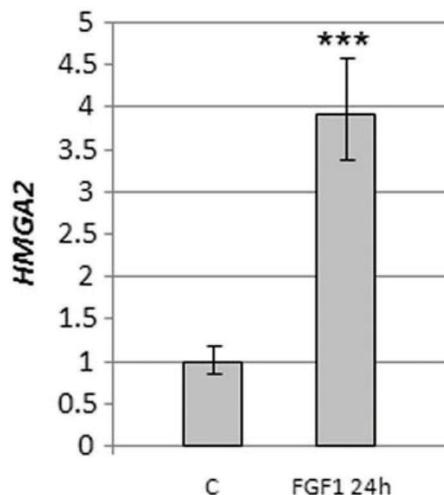


FIGURE 1 FGF1 stimulates an HMGA2 response of explants of human white adipose tissue (hWAT). Ordinate: relative expression of *HMGA2* mRNA in a control (WAT explants cultured for 24 h in medium 199 supplemented with 1% FCS) and a sample treated with FGF1 in the same medium; ****P* < 0.001.

CCA CTA CTA TGC CAT CGT GTG T-TAMRA-3' were used. All qRT-PCR experiments were done in triplicate.

Absolute quantitative real-time polymerase chain reaction

Absolute qRT-PCR was performed using 25 ng of total cDNA from independent samples, using a primer set specific for the canine *HMGA2* gene (forward primer: 5'-AGT CCC TCC AAA GCA GCT CAA AAG-3', reverse primer: 5'-GCC ATT TCC TAG GTC TGC CTC-3', and probe: 5'-6-Fam- GAA GCC ACT GGA GAA AAA CGG CCA-TAMRA-3'). Absolute quantification of transcription levels was carried out by real-time PCR analyses using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), with TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems). Assays were run in triplicates. The calibration curve used in absolute quantification was based on known concentrations of *HMGA2* dog standard oligonucleotides. The raw data (*C_t*, threshold cycle) were obtained with Applied Biosystems software.

Definition of overweight

Dogs were scaled before surgery. For the different breeds, the classification of the dogs into the normal weight group and the overweight group was done according to the data by Schmitz (17). Dogs within the given weight range were put into normal weight group. Dogs exceeding the weight range were put into the overweight group. Only for dogs older than 1,000 days, it was distinguished between the normal weight and the overweight group.

Statistical analyses

The statistical significance of differences was assessed by the student's *t* test. In all comparisons, *P* < 0.05 was considered being statistically significant.

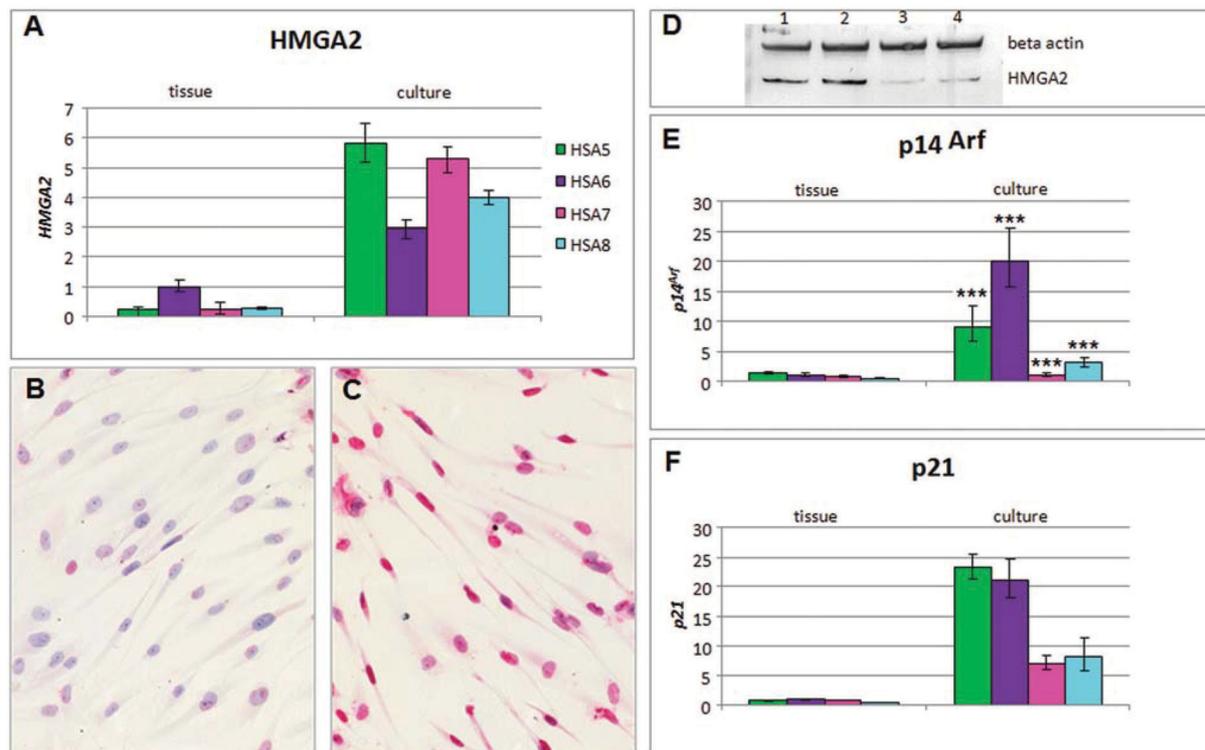


FIGURE 2 When compared with native tissue, the expression of *HMGA2*, *p14^{Arf}*, and *p21* in cultures of mesenchymal stem cells derived from hWAT samples of four different donors (hWAT 5-8) significantly exceeds that of the matching native tissue. **(A)**: Relative expression of *HMGA2* mRNA and **(B)** immunohistochemical staining of unstimulated hADSCs after 72 h for HMGA2 protein. Positive cells are red, **(C)** immunohistochemical staining for HMGA2 protein of hADSCs stimulated with 50 ng/ml FGF1 after 72 h. Positive cells are red, **(D)** Western blot analysis of HMGA2 protein abundance in hADSCs stimulated with FGF1. Lane 1: 72 h control (100%), Lane 2: 72 h 25 ng/ml FGF1 (146.7%), Lane 3: 120 h Control (13.5%), Lane 4: 120 h 25 ng/ml FGF1 (27.1%), **(E)** relative expression of *p14^{Arf}* mRNA and **(F)** relative expression of *p21* mRNA. For all measurements, native hWAT 6 served as the calibrator (expression = 1). ****P* < 0.001.

Results

Normal adipose tissue contains cells that are able to execute a HMGA2 response after growth-factor stimulation

While a low and sometimes even absent expression of *HMGA2* characterizes most adult tissues (8), these tissues may contain a few cells that are able to execute a HMGA2 response upon appropriate stimulation. To test this hypothesis, we have stimulated adipose tissue explants by FGF1, a key regulator of mammalian adipogenesis known to activate HMGA2 in the murine immortalized preadipocyte cell line 3T3-L1 (18) as well as in human ADSC (19). Stimulation of explants of human adipose tissue from four donors for 24 h resulted in a highly significant upregulation of *HMGA2* (Figure 1). Then, we have compared the *HMGA2* expression in samples of native human adipose tissue and ADSC cultures derived from the same samples. To avoid additional effects of fresh serum, the ADSCs were measured 72 h after adding fresh medium. In all cases, tested a highly significant increase of *HMGA2* expression in the culture compared with the explants was noted which at least in part is likely to result from the isolation/enrichment of responsive ADSC (Figure 2A). To verify the increase of HMGA2 expression on protein level, we stimulated ADSCs with FGF1 and performed an

immunohistochemical study. The analysis showed a higher expression of HMGA2 at protein level in stimulated ADSCs after 48 h (data not shown) and 72 h (Figure 2B and 2C) than in unstimulated. After 72 h stimulation with 25 ng/ml FGF1, western-blot analysis showed an increase of HMGA2 protein (146.7%) compared with the unstimulated ADSCs control (100%). After 120 h, the HMGA2 protein level had decreased again (Figure 2D). Simultaneously, the increase of HMGA2 in cell cultures compared with native tissue was accompanied by a simultaneous increase of the expression of *p14^{Arf}* and the *p53* target *p21* (Figure 2E and 2F). Of note, the activated expression of these genes is supposed to be a downstream effect of HMGA2 stimulation, persisting much longer than the transcriptional activation of HMGA2 as exemplified herein for *p14^{Arf}* (Figure 3).

The HMGA2 response after restimulation basically followed the same kinetics as the first stimulation

It has been suggested that after stimulation the decrease of the HMGA2 response results from active termination (18). We have thus tried to restimulate the expression of *HMGA2* mRNA by giving a second pulse of FGF1 72 h after initial stimulation. The kinetics of the response were similar to those seen after the initial

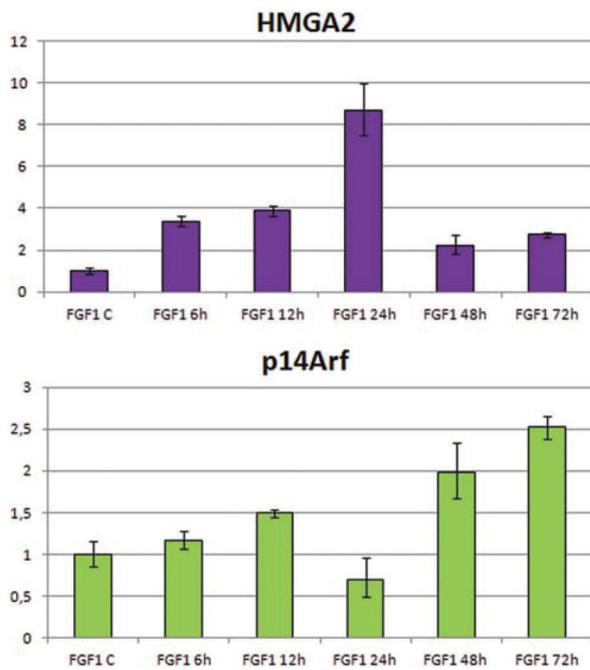


FIGURE 3 FGF1 stimulation leads to a *HMGA2* response as well as to the activation of *p14^{Arf}*. Serum starved cultures were stimulated with 25 ng/ml FGF1 resulting in a peak of *HMGA2* expression after 24 h with a following decrease. *p14^{Arf}* expression increased after 48 h due to the stimulation by *HMGA2*.

stimulation (Figure 4A), suggesting that the termination of the response largely results from a fading signal of the growth factor rather than from an intrinsic termination.

FGF1 enhances proliferation of ADSC by a *HMGA2*-dependent mechanism

FGF1 has been identified as a key regulator of the proliferation of ADSC and progenitors. To see if this effect at least in part is due to the increase of *HMGA2* transcription, we used human ADSC treated with FGF1 to study whether knock-down of *HMGA2* can influence the proliferation of the ADSC. When compared with the control taken before adding FGF1 after 24 h, the expression of *Ki67* was significantly increased. Subsequently, we transfected the cells with siRNA against *HMGA2*, along with stimulation with FGF1. This resulted in a significant reduction of *HMGA2* mRNA (Figure 4B) known to correlate with a decrease of *HMGA2* protein (7). Simultaneously, a highly significant decrease of the expression of *Ki67* was noted (Figure 4C).

In lipomas, the increase of *HMGA2* due to 12q14-15 chromosomal rearrangements is accompanied by an increased expression of *p14^{Arf}*

Also uterine leiomyomas show frequent *HMGA2* rearrangements, resulting in elevated expression. In MSC, as well as in uterine leiomyomas, the increase of *HMGA2* was found to be accompanied by an increased expression of *p14^{Arf}* (19).

To study whether lipomas resemble their possible cells of origin, i.e., ADSC, also in this aspect, we analyzed 19 lipomas (Table 1) (21) for possible correlations between the expression levels of the two genes. A highly significant correlation between the expression of both genes was noted (Figure 5).

Expression of *HMGA2* in subcutaneous cWAT varies strongly

To assess whether residential stem cells located in WAT are able to reactivate the expression of *HMGA2 in vivo* as well we quantified the expression of *HMGA2* mRNA in cWAT from 71 dogs. Their mean age was 5.7 years (range, 0.2-15.2 years), 43.7% were males (28.2% entire and 15.5% neutered), and 56.3% were females (46.5% entire and 9.8% neutered). A strong variation of the expression among the 71 samples was noted confirming the idea that environmental factors, in particular nutrition, lead to an activation of *HMGA2* transcription. Expression of *HMGA2* transcripts varied from 378.14 to 52,697.85 (average: 9,428.03) (Supporting Information Figure 1) indicating a different stimulation of cells in these tissue and compatible with the idea that adult WAT contains cells able to execute a *HMGA2* response.

A significantly elevated level of *HMGA2* transcripts in the canine overweight group

To further address the possible reactivation of *HMGA2* expression in WAT, we compared the expression in normal weight and overweight dogs. Only adult purebred animals ($\geq 1,000$ days) were included to exclude effects of ongoing growth. In this part of the study, samples of 23 dogs were analyzed by absolute qRT-PCR for their expression of *HMGA2* mRNA (Supporting Information Table 1). The mean age of the dogs in this cohort was 9.2 years (range, 4.2-15.2 years), 56.5% were males (17.4% entire, 39.1% neutered), and 43.5% were females (26.1% entire, 17.4% neutered). The group was divided into a normal weight and an overweight subgroup. Among the dogs classified as overweight, 53.8% were males (7.6% entire, 46.2% neutered) and 46.2% were females (30.8% entire, 15.4% neutered). The dogs with normal body weight consisted of 60% males (30% entire, 30% neutered) and 40% females (20% entire, 20% neutered). The *HMGA2* expression in the overweight group significantly exceeded that in the normal weight group by close to fivefold: average amount of *HMGA2* transcripts of 14,757.49 (range, 929.68-35,168.27) versus 2,954.59 (range: 472.52-5,901.07) ($P < 0.01$; Figure 6A). Also, the *HMGA2* expression in the overweight group varied over a broader range than in the normal weight group. Next, we tested if the *HMGA2* expression depends on age. Whereas an increase as well as an increasing variation with age was noted in the overweight group, almost no changes with age were seen in the normal weight group (Figure 6B). As the most likely explanation, the elevated level of *HMGA2* mRNA as determined in obese dogs indicates an ongoing gain of new fat cells and their precursors, respectively. If this assumption holds true, one would expect a concomitantly elevated amount of not yet fully differentiated cells.

A negative correlation between the expression of *HMGA2* and *PPAR-gamma* in subcutaneous cWAT

To study whether the level of *HMGA2* expression reflects an ongoing gain of not yet fully differentiated preadipocytes, we

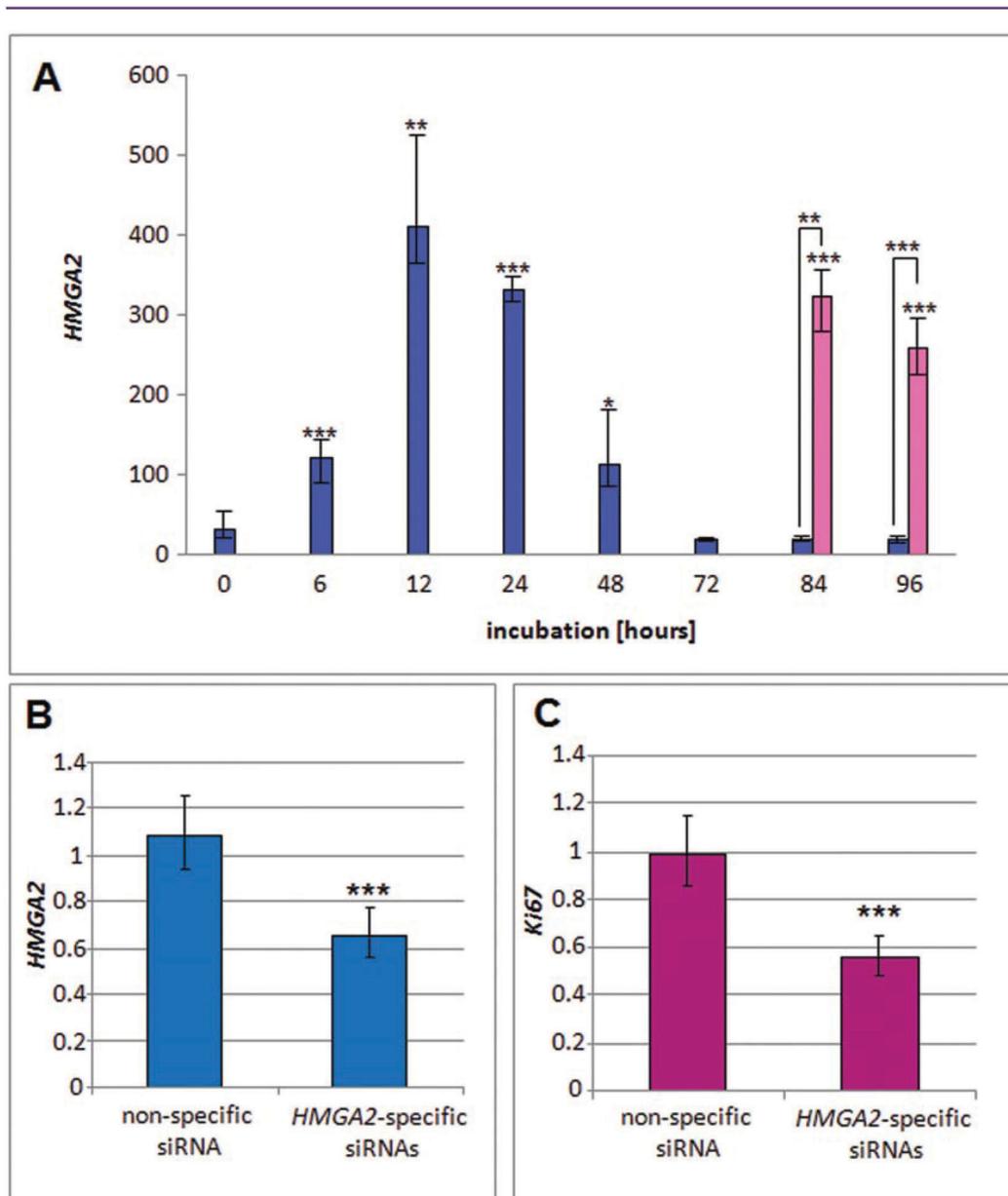


FIGURE 4 After stimulation by FGF1 cWAT-derived mesenchymal stem cells execute a HMGA2 response linked to cellular proliferation. **A:** Repeated stimulation of ADSCs by FGF1: Serum starved cultures (incubation-time: 0 h) were stimulated with 25 ng/ml FGF1 resulting in a peak of HMGA2 expression after 12 h with a following decrease (blue columns). Cultures treated in the same manner were given a second pulse of FGF1 after 72 h again resulting in a HMGA2 response (pink columns). If not indicated by lines, all the statistical differences refer to the 0 h control of serum-starved canine MSCs. Additionally, statistical differences of the HMGA2 expression between the cells restimulated after 72 h and the cells without a second FGF1 pulse are given. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Silencing of HMGA2 by specific siRNAs reduces the increased proliferation induced by FGF1. **B:** After treatment with one pulse of 25 ng/ml FGF1 for 24 h. When compared with a control with nonspecific siRNAs, HMGA2-specific siRNAs clearly reduced the amount of HMGA2 mRNA. **C:** In the same cell cultures, HMGA2-specific siRNAs lead to a clear decrease of the expression of Ki67 mRNA. *** $P < 0.001$.

determined the expression of *PPAR-gamma* mRNA and its correlation with *HMGA2* (Figure 6D). A subgroup of 22 purebred adult ($\geq 1,000$ days) dogs was analyzed by relative qRT-PCR for the expression of *PPAR-gamma* mRNA. The results showed a highly significant inverse correlation ($P < 0.001$) between the expression

of *PPAR-gamma* and *HMGA2* in both the normal and the overweight groups, fitting the hypothesis of a lower average differentiation level in the cWAT of overweight dogs. The *PPAR-gamma* expression significantly declined ($P < 0.05$) with the increase of *HMGA2* transcripts. Furthermore, the relative *PPAR-gamma*

TABLE 1 Karyotype (21), *HMGA2* and *p14^{Arf}* expression of 19 analyzed lipomas

Case no.	Karyotype	<i>HMGA2</i> [log]	<i>p14^{Arf}</i> [log]
Lip 10	46,XX,t(5;12)(q33;q14)	-0.28	-2.70
Lip 12	46,XY,t(2;12)(q37;q14)	-0.04	-1.04
Lip 20	46,XX,inv(3)(p21q29)	-4.04	-5.51
Lip 21	46,XX,t(3;6)(q24;p22)	0.09	-0.75
Lip 22	46,XY,t(3;6;12)(q27;p21;q22)/46,idem,inv(9)(p13q34)	-3.23	-0.93
Lip 23	46,XY,t(1;6)(p32;p21)	-3.00	-1.10
Lip 24	46,XX,inv(6)(p21q21)	-3.13	-0.78
Lip 25	46,XX,t(1;6)(p32;p21)	-3.15	0.16
Lip 27	46,XY,del(13)(q14q22)	-1.66	-0.69
Lip 3	46,XY,t(3;12)(q27;q15)	-1.80	0.04
Lip 5	46,XX,t(3;12)(q27;q14)	-1.14	-1.04
Lip 7	46,XX,t(5;12)(q32;q14)/46,idem,add(2)(p14),add(4)(q21),der(18)t(4;18)(q21;q?21)	-0.35	-1.64
Lip 9	46,XY,ins(12;5)(q15;q33q13)	0.13	-0.63
Lip 28	46,XY,t(12;20)(q13;q11),del(13)(q12q22-31)	-2.22	-0.76
Lip 39	46,XX	1.72	0.29
Lip 31	46-48,XY,+1-2r,+mar	2.94	1.54
Lip 33	47,XX,+r/47-48,XX,+1-2r/47-49,XX,+1-3r	2.12	0.51
Lip 35	47,XX,+r/47,XX,+mar	2.37	0.84
Lip 37	n.d.	2.73	0.95

The relative expression of *HMGA2* and *p14^{Arf}* are logarithmically scaled.

expression was significantly ($P < 0.05$) lower in the overweight group than in normal weight group (Figure 6C). The average *PPAR-gamma* expression in the normal weight group of 0.94 (range, 0.351-1.641) was about 1.5-fold higher than in the overweight group (average, 0.622; range, 0.171-1.327).

Discussion

Under normal conditions, adipocytes develop from progenitor cells to ensure proper fat cell turnover; ~ 10% of the fat cells are renewed annually (9). Recently, it was shown that these progenitor cells reside in a perivascular niche of adipose tissue (22). Besides regular turnover, the expression of certain fat-depots due to overfeeding not only results from hypertrophy but also from an increase in their number (hyperplasia). In particular, lower body fat seems to respond to overfeeding by hyperplasia, with the gain of ~ 1.6 kg lower body fat corresponding to roughly 2.5 billion new adipocytes within 8 weeks (23). This enormous gain of adipocytes, as well as the regular turnover rate, reflects the ability of preadipocytes or ADSC to proliferate and differentiate upon appropriate stimuli. The mechanisms underlying this process are still poorly understood, but certainly deserve interest. Apparently, the signaling that tightly controls the development of adipocytes involves an interaction between FGF1 and FGFR1. Not only does FGF1 trigger the proliferation of human preadipocytes but also their subsequent differentiation toward mature adipocytes can be abrogated by knock-down of FGFR1 expression (12). Interestingly, FGF1 is a major inducer of the *HMGA2* gene in immortalized murine pre-adipocytes (18), as well as in primary human ADSC (19). In turn, *HMGA2* has been linked with the development of a variety of benign tumors of mesenchyme-derived tissues, including not only adipose tissue tumors but also

uterine fibroids, pulmonary chondroid hamartomas, and endometrial polyps (2). *HMGA2* is frequently targeted by chromosomal rearrangements in lipomas resulting in its transcriptional upregulation (1-3). Transgenic mice constitutively expressing *HMGA2* present with gigantism including an increased amount of body fat. Almost all adult mammalian tissues show very low or even absent expression of *HMGA2* and its protein (8). Nevertheless, we were able to show herein that in WAT samples *HMGA2* can be stimulated by FGF1, suggesting that cells that are able to execute an *HMGA2* response exist in adult adipose tissue. This leads us to assume that the *HMGA2* response is linked to the proliferation of ADSC and

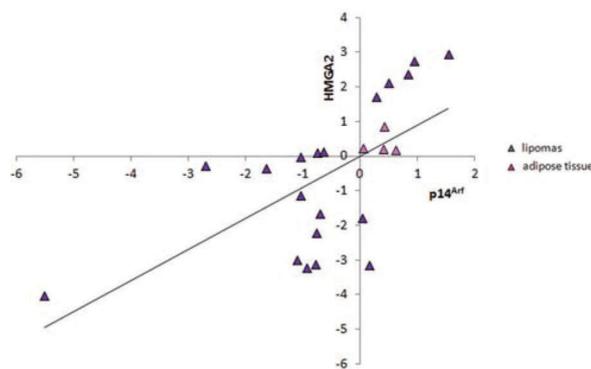


FIGURE 5 In lipomas, a highly significant correlation ($P < 0.001$) between the relative expression of *HMGA2* (y-axis) and *p14^{Arf}* (x-axis) exists. Both axes are logarithmically scaled with the numbers representing the exponents. For comparison, the expression of four samples of hWAT is given.

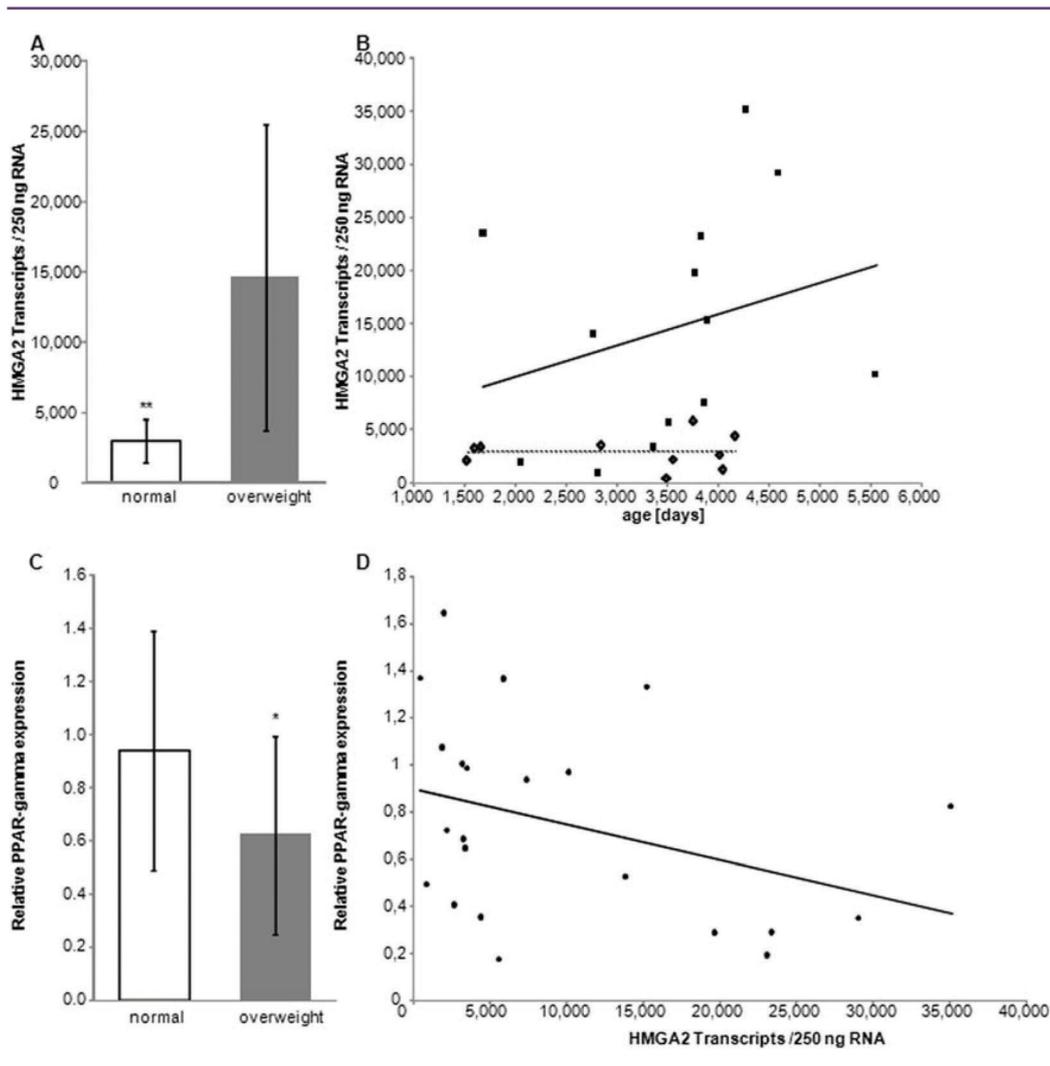


FIGURE 6 The expression of *HMGA2* as well as *PPAR-gamma* clearly differs between normal and overweighted dog. **A:** Absolute expression of *HMGA2* transcripts in canine subcutaneous adipose tissue. Gray column: overweight group; white column: normal weight group. ** $P < 0.01$. **B:** Absolute *HMGA2* expression in canine subcutaneous abdominal adipose tissue by age. Closed black squares: overweight group; Open rhombi: normal weight group. **C:** Relative *PPAR-gamma* expression in canine subcutaneous adipose tissue of 22 dogs older than 1,000 days in a normal weight group and an overweight group. Gray column: overweight group ($n = 13$); white column: normal weight group ($n = 9$). * $P < 0.05$. **D:** Absolute expression of *HMGA2* and relative *PPAR-gamma* expression in 22 dogs older than 1,000 days. The inverse correlation between *PPAR-gamma* expression and the amount of *HMGA2* transcripts is highly significant; $P < 0.001$.

progenitor cells in adult adipose tissue. Apparently, following appropriate stimulation, the *HMGA2* response is restricted to a temporal transcriptional activation of the gene and its protein. Mechanistically, a model can be proposed explaining the differences between the “normal” gain of adipocytes to keep homeostasis or to respond to overnutrition and the development of lipomas with *HMGA2* rearrangements (Figure 7). In contrast to the temporal physiological activation of *HMGA2*, the chromosomal rearrangements seen in tumors result in constitutive activation.

In the second part of this study, we analyzed the mRNA expression of *HMGA2* and *PPAR-gamma* in biopsies from normal weight and overweight canine donors. The *HMGA2* expression was rather low but as

progenitor cells are expected to constitute only a minority of the cells in these tissues, it seems reasonable to speculate that the actual expression in the progenitor cells is higher than in the mature cells. At least in mice, it seems as if an increase in the number of adipocytes, i.e., hyperplasia, requires intact *HMGA2*; knock-out mice not only show a pygmy phenotype but also do not gain weight after high-caloric diet (24,25). Furthermore, in mice, a high-caloric diet was found to coincide with detectable expression of *HMGA2* (25). These data fit with the results of the present study, revealing a highly significant increase of *HMGA2* expression in cWAT from overweight dogs. *PPAR-gamma* is an essential regulator for adipogenesis *in vivo* and complete absence of white and brown adipose tissue was noted in *PPAR-gamma* deficient mouse (26). During human adipogenesis, the

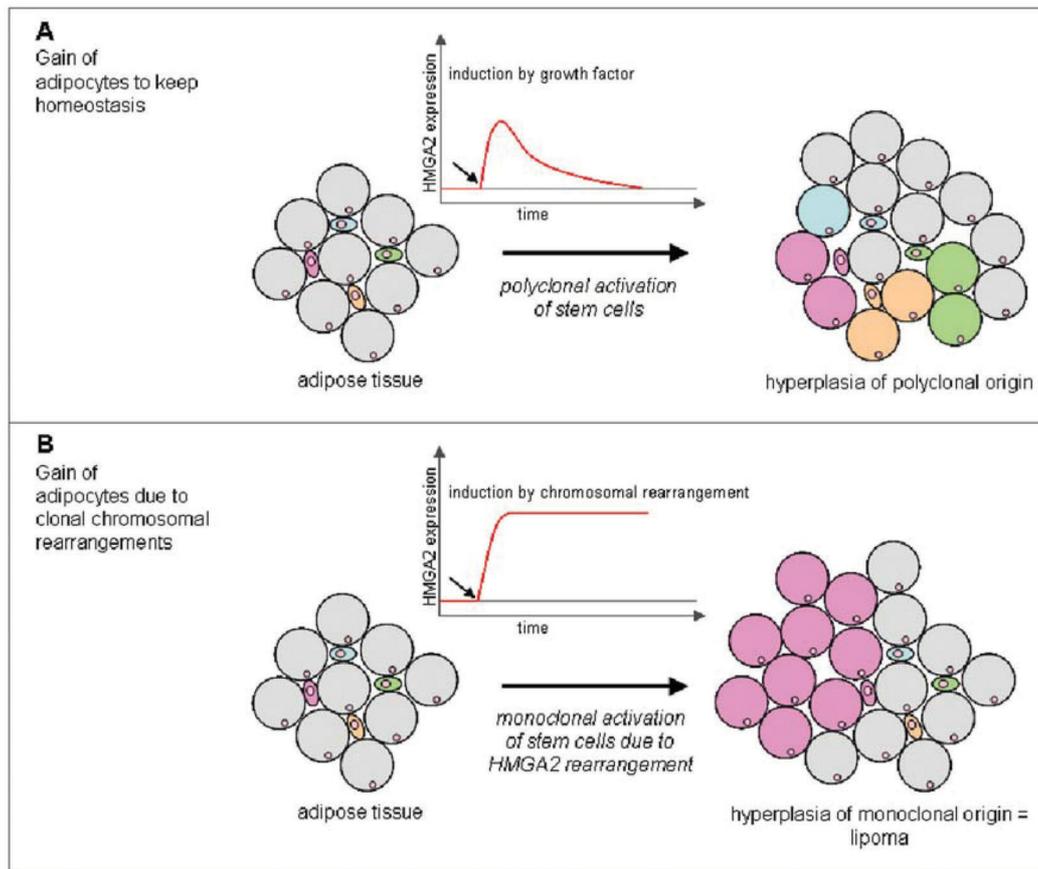


FIGURE 7 A proposed model illustrating the similarities between the development of lipomas and the gain of white adipose tissue. In the schematic model, both the gain of adipocytes in normal white adipose tissue (**A**) and during lipomagenesis (**B**) is related to the expression of *HMGA2*. When compared with normal WAT, a constitutive activation of *HMGA2* characterizes the monoclonal growth of lipomas.

expression of *PPAR-gamma* mRNA increases, whereas overexpression of miR-130, which interacts with the coding region and 3' untranslated region of *PPAR-gamma*, inhibits adipogenesis (27). Thus, it seems reasonable to use the expression of *PPAR-gamma* mRNA as a marker of adipocyte maturation. The size of adipocytes in mice with high-fat diet has been found to be positively associated with the amount of *PPAR-gamma* (20). Our results show a significantly lower expression of *PPAR-gamma* in cWAT from overweight dogs compared with normal weight dogs. To explain these findings, we want to propose a mechanism, being part of a mechanism of energy storage, by which an excess of food activates stem cell self-renewal and augmentation of progenitor cells and finally mature adipocytes. As a necessary early step within this cascade, *HMGA2* becomes activated representing an essential prerequisite for self-renewal and propagation of stem and progenitor cells, respectively. In the absence of *HMGA2*, augmentation of fat tissue does not take place. Of note, the expression of *HMGA2* varied over a broad range in the overweight group of dogs. This may reflect a different proliferative activity of stem and progenitor cells. In summary, the data presented herein suggest the expression of *HMGA2* in subcutaneous WAT as a marker of hyperplasia-mediated expansion of fat. **O**

Acknowledgments

We thank Frauke Meyer for her technical assistance.

© 2012 The Obesity Society

References

1. Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, et al. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 1995;82:57-65.
2. Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van den Ven WJ. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumors. *Nat Genet* 1995;10:436-444.
3. Bartuma H, Panagopoulos I, Collin A, et al. Expression levels of HMGA2 in adipocytic tumors correlate with morphologic and cytogenetic subgroups. *Mol Cancer* 2009;8:36.
4. Tallini G, Dal Cin P, Rhoden KJ, et al. Expression of HMGI-C and HMGI(Y) in ordinary lipoma and atypical lipomatous tumors: immunohistochemical reactivity correlates with karyotypic alterations. *Am J Pathol* 1997;1:37-43.
5. Battista S, Fidanza V, Fedele M, et al. The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res* 1999;59:4793-4797.
6. Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 1995; 376:771-774.

7. Pasquali D, Pierantoni GM, Fusco A, et al. Fenofibrate increases the expression of high mobility group AT-hook 2 (HMGA2) gene and induces adipocyte differentiation of orbital fibroblasts from Graves' ophthalmopathy. *J Mol Endocrinol* 2004;33:133-143.
8. Rogalla P, Drechsler K, Frey G, et al. HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am J Pathol* 1996;3:775-779.
9. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008;453:783-787.
10. Hutley L, Shurety W, Newell F, et al. Fibroblast growth factor 1: a key regulator of human adipogenesis. *Diabetes* 2004;53:3097-3106.
11. Newell FS, Su H, Tornqvist H, Whitehead JP, Prins JB, Hutley LJ. Characterization of the transcriptional and functional effects of fibroblast growth factor-1 on human preadipocyte differentiation. *FASEB J* 2006;20:2615-2617.
12. Widberg CH, Newell FS, Bachmann AW, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 is a key regulator of early adipogenic events in human preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E121-E131.
13. Sutter NB, Ostrander EA. Dog star rising: the canine genetic system. *Nat Rev Genet* 2004;5:900-910.
14. Planat-Bénard V, Menard C, André M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2003;94:223-229.
15. Markowski DN, von Ahsen I, Nezhad MH, Wosniok W, Helmke BM, Bullerdiek J. HMGA2 and the p19Arf-TP53-CDKN1A axis: a delicate balance in the growth of uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:661-668.
16. Gorzelnik K, Janke J, Engeli S, Sharma AM. Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res* 2001;33:625-627.
17. Schmitz S. *Hunderassen. Wie sie sind—Wie man sie hält*, 2nd ed. München, Germany, BLV; 2003.
18. Ayoubi TA, Jansen E, Meulemans SM, Van de Ven WJ. Regulation of HMGIC expression: an architectural transcription factor involved in growth control and development. *Oncogene* 1999;18:5076-5087.
19. Markowski DN, Winter N, Meyer F, et al. p14Arf acts as an antagonist of HMGA2 in senescence of mesenchymal stem cells-implications for benign tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:489-498.
20. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999;4:597-609.
21. Bartuma H, Hallor KH, Panagopoulos I, et al. Assessment of the clinical and molecular impact of different cytogenetic subgroups in a series of 272 lipomas with abnormal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46:594-606.
22. Tang W, Zeve D, Suh JM, et al. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 2008;322:583-586.
23. Tchoukalova YD, Votruba SB, Tehkonian T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:18226-18231.
24. Benson KF, Chada K. Mini-mouse: phenotypic characterization of a transgenic insertional mutant allelic to pygmy. *Genet Res* 1994;64:27-33.
25. Anand A, Chada K. In vivo modulation of Hmgic reduces obesity. *Nat Genet* 2000;24:377-380.
26. Lowell BB. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* 1999;99:239-242.
27. Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, et al. miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol* 2011;31:626-638.

3.2 Publikation II: Inverse correlation between PPAR- γ and HMGA2 expression in white adipose tissue of overweight humans (Thies et al., submitted for publication):

Tchoukaloya et al. (2010) konnten in einer Studie an menschlichen Probanden nachweisen, dass eine induzierte Gewichtszunahme von $\sim 1,6$ kg aufgrund einer erhöhten Kalorienaufnahme mit einer Neubildung von 2,6 Milliarden Adipozyten in der unteren Körperregion einhergeht. In Publikation I konnte eine Korrelation zwischen der Expression von *HMGA2* und dem Proliferationsmarker *MKi67* in ADSCs beobachtet werden. Daher ist anzunehmen, dass ein hoher *HMGA2*-Level mit der Bildung neuer Präadipozyten in Verbindung steht. Zudem konnte in Publikation I eine hohe *HMGA2*-Expression bei übergewichtigen Hunden im Vergleich zu normalgewichtigen Hunden festgestellt werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden die *HMGA2*- und *PPAR- γ* -Expressionen an 157 humanen abdominalen weißen subkutanen Fettgewebsproben untersucht. Die 157 Proben wurden zunächst mit Hilfe des BMI in eine normalgewichtige ($\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$) und eine übergewichtige Gruppe ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) unterteilt. Eine statistische Analyse der *PPAR- γ* - und *HMGA2*-Expressionen mittels Kolmogorow-Smirnow-Test ergab, dass die Daten nicht normal verteilt waren. Daher wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet, um nach Korrelationen zwischen den Expressionen und den Gruppen zu suchen.

Die Gruppe der ‚Übergewichtigen‘ zeigte eine signifikant ($p < 0,01$) niedrigere *PPAR- γ* -Expression als die Gruppe der ‚Normalgewichtigen‘. Die Analyse der *PPAR- γ* - und *HMGA2*-Expressionen zeigten eine höchst signifikante inverse Korrelation ($p < 0,001$) und bestätigte die Ergebnisse der Publikation I. Da *PPAR- γ* ein essentieller Regulator der Adipogenese *in vivo* ist (Lowell, 1999), und weil während der humanen Adipogenese die *PPAR- γ* mRNA-Expression steigt (Lee et al., 2011), wurde eine mögliche Korrelation zwischen dem BMI und den Expressionen von *PPAR- γ* und *HMGA2* untersucht. Die Ergebnisse belegen eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$) zwischen der *HMGA2*-Expression und dem BMI, sowie ein höchst signifikante inverse Korrelation ($p < 0,001$) zwischen der *PPAR- γ* -Expression und dem BMI.

Diverse Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen dem Pro12Ala-Polymorphismus bei *PPAR- γ* und dem verminderten Risiko an Diabetes Typ II zu erkranken nachgewiesen (Deeb et al., 1998; Altshuler et al., 2000). Aus diesem Grunde sollte eine Verbindung zwischen der *PPAR- γ* -Expression und dem Auftreten einer Diabetes Typ II Erkrankung untersucht werden. Dazu wurden die *PPAR- γ* -Expressionen der

Fettgewebsproben von 16 Diabetikern mit denen von 140 Nicht-Diabetikern (ein Proband hatte einen unbekanntem Diabetesstatus) auf mögliche Korrelationen hin analysiert. Der daraufhin durchgeführte Kruskal-Wallis-Test konnte jedoch keine Korrelation feststellen.

II

Inverse correlation between PPAR- γ and HMGA2 expression in white adipose tissue of overweight humans

Helge Wilhelm Thies, Dominique Nadine Markowski, Andrea Gottlieb, Heiner Wenk,
Manfred Wischnewsky, Jörn Bullerdiek

(Nutrition & Metabolism, zur Veröffentlichung eingereicht)

Inverse correlation between *PPAR-γ* and *HMGGA2* expression in white adipose tissue of overweight humans

Helge W. Thies¹, Andrea Gottlieb¹, Dominique N. Markowski¹, Heiner Wenk², Manfred Wischnewsky³, Joern Bullerdiek^{1,4,*}

¹ Center of Human Genetics, University of Bremen, Leobener Strasse ZHG, D-28359 Bremen, Germany

² Department of General and Vascular Surgery, Clinical Center Bremen-Nord, Hammersbecker Str. 228, D-28277 Bremen, Germany

³ Department of Mathematics and Computer Science, University of Bremen, Universitätsallee, D-28359 Bremen, Germany

⁴ Institute for Medical Genetics, University of Rostock, University Medicine, Ernst-Heydemann-Straße 8, D-18057 Rostock, Germany

*Correspondence to: Joern Bullerdiek, Center of Human Genetics, University of Bremen, Leobener Strasse ZHG, D-28359 Bremen, Germany; Phone: 49-421-218-61500; Fax: 49-421-218-4239; e-mail: bullerd@uni-bremen.de.

Abstract

Background

In a previous study we identified a lower expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (*PPAR-γ*) in canine individuals with overweight than in those with a body weight in the normal range. To see if these findings could be further validated we have investigated biopsies from human donors of both groups for possible differences of their *PPAR-γ* expression. In addition, the expression of high mobility group protein AT-hook 2 gene (*HMG A2*) turned out to be a marker of active adipose tissue derived stem cells (ADSCS).

Methods

In this study we analyzed the gene expression of *PPAR-γ* and *HMG A2* in human abdominal subcutaneous white adipose tissue (WAT) of 157 patients by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

Results

We found a significantly lower expression of *PPAR-γ* in WAT of overweight humans compared to normal weight group and an inverse correlation between *PPAR-γ* and body mass index. In addition, an inverse correlation between the expression of *PPAR-γ* and *HMG A2* was noted.

Conclusions

These findings of a lower mRNA expression of *PPAR-γ* in subcutaneous abdominal WAT from individuals with overweight and the inverse correlation between *PPAR-γ* and *HMG A2* expression suggest a role of *PPAR-γ* and *HMG A2* as antagonists in the differentiation of adipocytes and the proliferation and self-renewal of their progenitors, respectively.

Keywords: PPAR- γ ; HMGA2; subcutaneous white adipose tissue; BMI; ADSCs

Background

Changes of the amount of body fat are of great importance as a physiologically relevant mechanism of energy storage as well as for a variety of obesity induced disorders. Generally accumulation of body fat can either result from hypertrophy, i.e. an increase of size of the adipocytes or from hyperplasia, i.e. an increase of their number. Currently there is ample evidence that both mechanisms can account for the accumulation of body fat with possible differences existing between upper- and lower-body fat [1]. Hyperplasia of adipose tissue requires the activation of progenitor and/or stem cells and can be associated with drastic increases of the cell number. E.g. the gain of only 1.6 kg of lower-body fat has been found to result in the creation of approximately 2.6 billion new adipocytes within a few weeks [1]. Thus, genes and their activity, respectively, causally related to the augmentation of adipose tissue progenitor and stem cells are of pivotal interest to understand the mechanisms underlying the hyperplasia of adipose tissue. A recent study on obese dogs indicates an ongoing gain of not yet fully differentiated preadipocytes, thus hyperplasia of adipose tissue [2]. This hyperplasia is a link between an elevated level of high mobility group protein AT-hook 2 gene (*HMGA2*) expression and a decreasing mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR- γ). PPAR- γ is a ligand-binding nuclear transcription factor of the PPAR subfamily of nuclear hormone receptors [3] and promotes gene expression when it heterodimerizes with retinoid X receptor α . This complex binds and transactivates target differentiation-dependent genes [4]. *PPAR- γ* expression is both necessary and sufficient for ongoing adipogenesis, in particular for the differentiation of preadipocytes to mature adipocytes [5-7]. Gain-of-function experiments with NIH-3T3 fibroblasts, which are relatively resistant to differentiation towards adipocytes and do not express *PPAR- γ* , show adipogenesis after forced ectopic expression of *PPAR- γ* [8-11]. Likewise PPAR- γ knock-out

mice are characterized by a total absence of white and brown adipose tissue and exhibiting a fatty liver. In comparison with PPAR- γ +/- mice the phenotype of the PPAR- γ -/- mice revealed a runt weighing only 70% of her littermate [12]. Former studies in transgenic mice expressing a truncated *HMGA2*, still containing the three AT-hook domains, exhibit a giant phenotype with hyperplasia of white adipose tissue (WAT) [13]. In contrast, Zhou et al. [14] present a *HMGA2* knock-out mice displaying a pygmy phenotype and hypoplasia of WAT. Furthermore, the absence of *HMGA2* affects the lineage commitment of stem cells towards preadipocytes [15].

In summary, PPAR- γ turned out to be a major regulator of adipose tissue maturation and thereby an essential protein in the gain of body weight. In a previous study we identified a lower expression of *PPAR- γ* in canine individuals with overweight than in those with a body weight in the normal range. To see if these findings could be further validated we have investigated biopsies from human donors of both groups for possible differences of their *PPAR- γ* expression.

Materials and methods

Tissue samples

Human subcutaneous abdominal white adipose tissue (WAT) used in this study was taken during surgery and immediately frozen in liquid nitrogen. Prior to surgery, informed written consent was obtained from all patients. In addition, the study has been approved by the local ethics committee (Ethikkommission der Ärztekammer Bremen, no. 309).

RNA isolation

For RNA isolation 700 μ l QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden Germany) were added to 100 mg subcutaneous WAT. Total RNA was isolated using an RNeasy mini kit (Qiagen) in a

QIACube (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and DNase I digestion was performed. DNase digestion was carried out on the column during RNA extraction (RNase-free DNase set, Qiagen).

cDNA-Synthesis

About 250 ng of total RNA were reverse transcribed with 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Darmstadt, Germany), RNase Out (Invitrogen), and 150 ng random hexamers (Biomers.net, Ulm, Germany), according to the manufacturer's instructions. RNA was denatured at 65°C for 5 min and subsequently kept on ice for 1 min. After adding the enzyme to the RNA primer mixes, samples were incubated for 10 min at 25°C to allow annealing of the random hexamers. Reverse transcription was performed at 37°C for 50 min followed by inactivation of the reverse transcriptase at 70°C for 15 min.

Quantitative real-time PCR

Relative quantification of transcription levels was carried using the Applied Biosystems 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Commercially available gene expression assays (Applied Biosystems) were used for quantification of mRNA of *PPAR-γ* (Hs01115513) and *HMGGA2* (Hs00171569). *HPRT* served as endogenous control as described before [16]. All qRT-PCR experiments were done in triplicate.

Statistical evaluation

Normal distribution of our data was tested using the Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit test. Correlations between *PPAR-γ*, *HMGGA2* and BMI were analysed using Kendall's Tau-b correlations. Comparison of the distribution resp. medians of *PPAR-γ* across diabetes was

performed using the independent-sample Kruskal-Wallis test. Calculations were performed with NCSS (version 2007), SPSS (version 20), R (2.15.3) and Viscosity (version 5.1).

Results

A significantly lower expression of *PPAR-γ* in human overweight group

Recently, we have demonstrated a lower expression of *PPAR-γ* in overweight dogs compared to those in the normal weight group. To see if these findings could be validated in human subcutaneous adipose tissue, we classified our data in an overweight group (n= 83), which was defined as a BMI ≥ 25 kg/m² and a normal weight group (n= 74) with a BMI < 25 kg/m² (Tab.1). The One-Sample-Kolmogorov-Smirnov test revealed that the distribution of *PPAR-γ* expression was not normal (suppl. Fig.1; suppl. Tab.1), thus the Mann-Whitney U test was applied to check for correlations. The relative *PPAR-γ* expression was significantly ($p < 0.01$) lower in the overweight group (mean: 0.593 +/- 0.254) than in normal weight group (mean: 0.758 +/- 0.299) (Fig. 1). This result fits with the hypothesis of adipocytes with a lower level of maturation in the overweight group, because *PPAR-γ* expression is essential for adipocyte differentiation [17].

Highly significant inverse correlation between *HMG2* and *PPAR-γ* indicating a lower differentiation level of adipocytes in subcutaneous WAT

In a recent study, an increased “*HMG2*-response” was found to be associated with overweight in dogs. Aimed at the question if an increased *HMG2* expression is accompanied by a decrease of *PPAR-γ* mRNA level as suggested from our study with overweight in dogs, we measured the mRNA expression of *PPAR-γ* and *HMG2* in biopsies of subcutaneous abdominal adipose tissue from 157 human donors. Neither the mRNA level

of *PPAR-γ* nor that of *HMGA2* followed a normal distribution (suppl. Fig.1; suppl. Tab.1) and thus we analyzed our data (n=157) using the Kendall's Tau-b statistic test. The expression of *HMGA2* and *PPAR-γ* shows a highly significant inverse correlation ($p < 0.001$) (Fig. 2), further strengthening the hypothesis of a lower average maturation level in adipocytes in WAT.

A lower expression of *PPAR-γ* in the overweight group suggest an augment of adipocytes with a lower level of maturation

To address the question if the elevated level of *HMGA2* and lower level of *PPAR-γ* in the overweight group could be generally observed in increasing body weight we analyzed the *HMGA2* and *PPAR-γ* expression for a possible correlation with BMI. Therefore we determined the expression of *HMGA2* and *PPAR-γ* mRNA and their correlation with BMI. The results showed a significant correlation ($p < 0.05$) between *HMGA2* and BMI (Fig. 3A) and a highly significant inverse correlation ($p < 0.001$) between the expression of *PPAR-γ* and BMI (Fig. 3B). These findings indicate that the decrease of *PPAR-γ* with increasing BMI represents a gain of body weight through immature adipocytes in WAT.

No correlation between diabetes and *PPAR-γ* expression

Furthermore, *PPAR-γ* is an essential regulator for adipogenesis in vivo and the Pro12Ala variant in *PPAR-γ* is a common polymorphism shown in multiple studies to influence risk of type 2 diabetes (T2D) [18, 19]. Of the 157 human subcutaneous white adipose tissue donors 16 individuals were known T2D patients, the T2D status of one individual was unknown, and the remaining patients were not known to be affected by T2D. We made an independent-samples Kruskal-Wallis test to investigate if there is a correlation between *PPAR-γ* expression and diabetes, but no significant correlation could be noted (Fig. 4).

Discussion

Subcutaneous adipose tissue contains cells of the adipocyte lineage at different levels of differentiation. It has the ability to respond in a dynamic manner to changes in nutrient intake and hormone levels through fat-cell hypertrophy or hyperplasia. Serving as a reservoir, preadipocytes persist throughout the life span in adipose tissue and are capable to replicate and to differentiate into mature adipocytes [4]. During differentiation they lose their capacity to replicate but gain the ability to store or mobilize triglycerides, respond to insulin and other hormones, and to release different hormones as well as other para- and autocrine factors (e.g. leptin, adiponectin, TNF α and IL-6) [4]. *PPAR- γ* is an essential regulator of adipogenesis in vivo and accordingly a complete absence of white and brown adipose tissue was noted in *PPAR- γ* knock-out mice [7]. The size of adipocytes in mice with high-fat diet is positively associated with the amount of *PPAR- γ* and accompanied by gain of body weight [17]. In the present study we analyzed the mRNA expression of *PPAR- γ* and *HMGA2* in subcutaneous abdominal WAT biopsies from normal weight and overweight human donors. The results revealed a clearly inverse correlation between the mRNA expression of either gene. These fits with previous findings of a decreased *PPAR- γ* expression in obese dogs [2]. Moreover, we were able to show that *PPAR- γ* expression in WAT is significantly lower in the overweight group than in normal weight group and declines with increasing BMI. Several studies revealed that in mild obesity increased fat cell size accounts for an increased fat mass whereas in severe obesity an increasing number of fat cells and preadipocytes was noted [20-23]. Apparently, a critical adipocyte size seems to exist where the cells secrete growth factors that mediate the proliferation of preadipocytes [24-26]. Previously, in human adipose tissue derived stem cells [27] as well as in the murine immortalized preadipocyte cell line 3T3-L1 [28] growth factors were shown to induce an upregulation of *HMGA2* which appears to be tightly regulated. Accordingly, we noted an increasing level of *HMGA2* mRNA expression

which inversely correlates with a lower level of *PPAR-γ*. *HMGGA2* protein is linked with the proliferation and differentiation of adipose tissue stem and progenitor cells. Battista et. al. noted a giant phenotype and hyperplasia of WAT in transgenic mice overexpressing a truncated *HMGGA2*. Whereas a *HMGGA2* knock-out mice present a pygmy phenotype and hypoplasia of WAT [14]. Most likely, the higher expression of *HMGGA2* reflects a gain of body weight due to increasing numbers of preadipocytes, i.e. hyperplasia. As a result of augmentation of immature adipocytes the ability of WAT to store or mobilize triglycerides and to respond to insulin could be diminished. Deeb et.al. [18] were able to show that a decreased risk of developing T2D is associated with the common *PPAR-γ* Pro12Ala polymorphism. Based on these findings we analyzed our data for a possible correlation between *PPAR-γ* mRNA expression and diabetes. Its absence could be due to the small number of patients with T2D in our data set and the fact that among the German population roughly 50% of T2D patients are not yet diagnosed [29].

Conclusions

However, the lower mRNA expression of *PPAR-γ* in subcutaneous abdominal WAT from individuals with overweight and the inverse correlation between *PPAR-γ* and *HMGGA2* expression suggest a role of *PPAR-γ* and *HMGGA2* as antagonists in the differentiation of adipocytes and the proliferation and self-renewal of their progenitors, respectively. These results are consistent with our findings in a recent study demonstrating a lower expression of *PPAR-γ* in overweight dogs.

Competing Interests

J.B. is named co-inventor and co-applicant of a patent application on the quantification of *HMG2* expression to diagnose aberrant mesenchymal growth.

Authors' Contributions

HWT: conception and design of the study; acquisition of data; analysis and interpretation of data; manuscript writing; final approval of the manuscript. AG: acquisition of data; final approval of the manuscript. DNM: acquisition of data; final approval of the manuscript. HW: provision of study material; final approval of the manuscript. MW: analysis and interpretation of data; final approval of the manuscript. JB: conception and design of the study; analysis and interpretation of data; manuscript writing; revising the manuscript critically for important intellectual content; final approval of the manuscript.

Acknowledgement

We thank Frauke Meyer and Alisa Ivanov for their excellent technical assistance.

References

- [1] Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonina T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD: **Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding.** *PNAS* 2010, **42**: 8226-8231.
- [2] Thies HW, Nolte I, Wenk H, Mertens F, Bullerdiek J, Markowski DN: **Permanent activation of HMGA2 in lipomas mimics its temporal physiological activation linked to the gain of adipose tissue.** *Obesity (Silver Spring)* 2014, **22**:141-150.
- [3] Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ: **Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files.** *Science* 2001, **294**:1866-1870.
- [4] Kirkland JL, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Han J, Karagiannides I: **Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD?** *Exp Gerontol* 2002, **37**:757-767.
- [5] Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA: **The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation.** *J Biol Chem* 1998, **273**:30057-30060.
- [6] Gregoire FM, Smas CM, Sul HS: **Understanding adipocyte differentiation.** *Physiol Rev* 1998, **78**:783-809.
- [7] Lowell BB: **PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function.** *Cell* 1999, **99**:239-242.
- [8] Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD: **Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells.** *Genes Dev* 1994, **8**:1654-1663.
- [9] Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM: **Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR-gamma 2, a lipid-activated transcription factor.** *Cell* 1994, **79**:1147-1156.

- [10] Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL: **Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins.** *Genes Dev* 1995, **9**:168-181.
- [11] Wu Z, Bucher NL, Farmer SR: **Induction of peroxisome proliferator-activated receptor -gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:4128-4136.
- [12] Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM: **PPAR -gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development.** *Mol Cell* 1999, **4**:585-595.
- [13] Battista S, Fidanza V, Fedele M, Klein-Szanto AJ, Outwater E, Brunner H, Santoro M, Croce CM, Fusco A: **The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis.** *Cancer Res* 1999, **59**:4793-4797.
- [14] Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K: **Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C.** *Nature* 1995, **376**:771-774.
- [15] Pasquali D, Pierantoni GM, Fusco A, Staibano S, Colantuoni V, De Bellis A, Bellastella A, Sinisi AA: **Fenofibrate increases the expression of high mobility group AT-hook 2 (HMGA2) gene and induces adipocyte differentiation of orbital fibroblasts from Graves' ophthalmopathy.** *J Mol Endocrinol* 2004, **33**:133-143.
- [16] Markowski DN, von Ahsen I, Nezhad MH, Wosniok W, Helmke BM, Bullerdiek J: **HMGA2 and the p19Arf-TP53-CDKN1A axis: a delicate balance in the growth of uterine leiomyomas.** *Genes Chromosomes Cancer* 2010, **49**:661-668.
- [17] Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa

G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T: **PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance.** *Mol Cell* 1999, **4**:597-609.

[18] Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkänen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J: **A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity.** *Nat Genet* 1998, **20**:284-287.

[19] Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES: **The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes.** *Nat Genet* 2000, **26**:76-80.

[20] Shillabeer G, Forden JM, Russell JC, Lau DC: **Paradoxically slow preadipocyte replication and differentiation in corpulent rats.** *Am J Physiol* 1990, **258**:E368–E376.

[21] Strissel K, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, Defuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS: **Adipocyte death, adipose tissue remodeling and obesity complications.** *Diabetes* 2007, **56**:2910–2918.

[22] Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K: **Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes.** *Endocrinology* 2007, **148**:868–877.

[23] Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS: **Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans.** *J Lipid Res* 2005, **46**:2347–2355.

- [24] Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J: **Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: A new model of obesity.** *Am J Physiol* 1978, **235**:E279–E286.
- [25] DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R: **Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum.** *Am J Physiol* 1998, **274**:R1460–R1467.
- [26] Marques BG, Hausman DB, Martin RJ: **Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity.** *Am J Physiol* 1998, **275**:R1898–R1908.
- [27] Markowski DN, Winter N, Meyer F, von Ahsen I, Wenk H, Nolte I, Bullerdiek J: **p14Arf acts as an antagonist of HMGA2 in senescence of mesenchymal stem cells-implications for benign tumorigenesis.** *Genes Chromosomes Cancer* 2011, **50**:489-498.
- [28] Ayoubi TA, Jansen E, Meulemans SM, Van de Ven WJ: **Regulation of HMGIC expression: an architectural transcription factor involved in growth control and development.** *Oncogene* 1999, **18**:5076-5087.
- [29] Rathmann W, Haastert B, Icks A, Löwel H, Meisinger C, Holle R, Giani G: **High prevalence of undiagnosed diabetes efficient screening. The KORA survey 2000.** *Diabetologia* 2003, **46**:182-189.

Figures

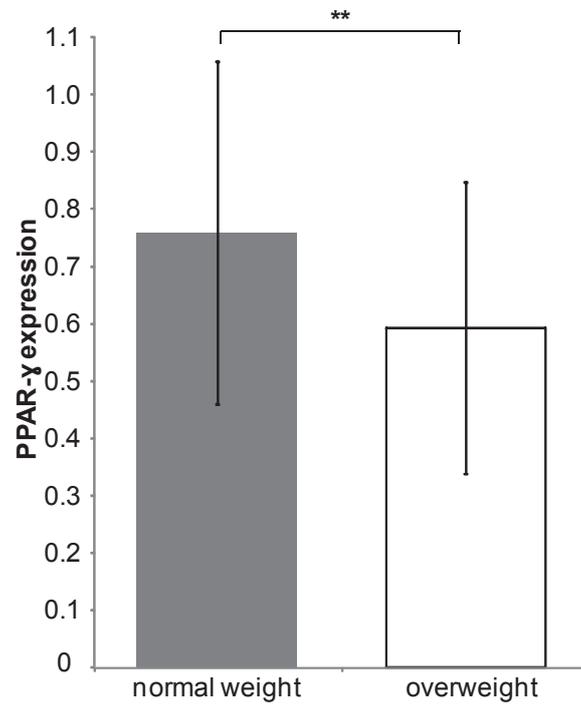


Fig. 1 A higher relative *PPAR- γ* expression in normal weight group than in overweight group

Relative *PPAR- γ* expression in human subcutaneous adipose tissue. Grey column : normal weight group (n = 74); white column: overweight group (n = 83). Asterisks indicate significances; **, p < 0.01.

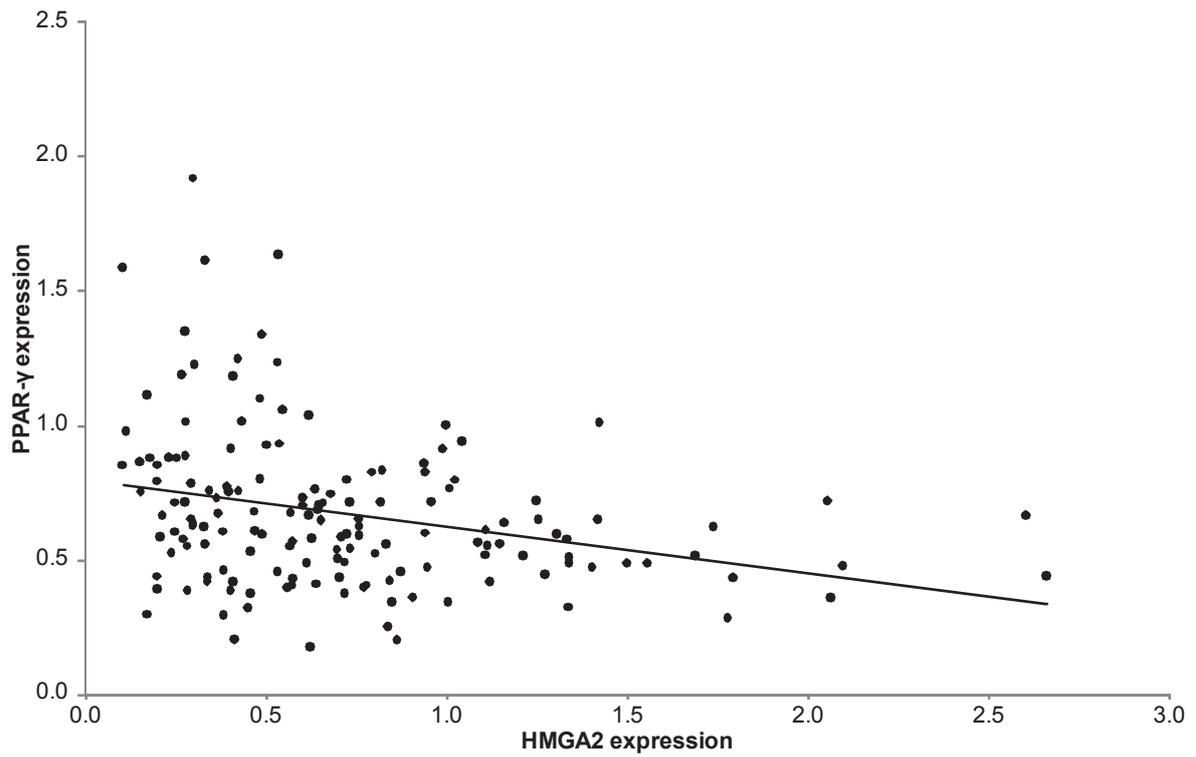


Fig. 2 Inverse correlation of *PPAR-γ* and *HMGA2* expression in human subcutaneous white adipose tissue

Relative expression of *PPAR-γ* and *HMGA2* in subcutaneous WAT in 157 human donors. The decline of *PPAR-γ* expression with the increase of *HMGA2* expression is highly significant ($p < 0.001$).

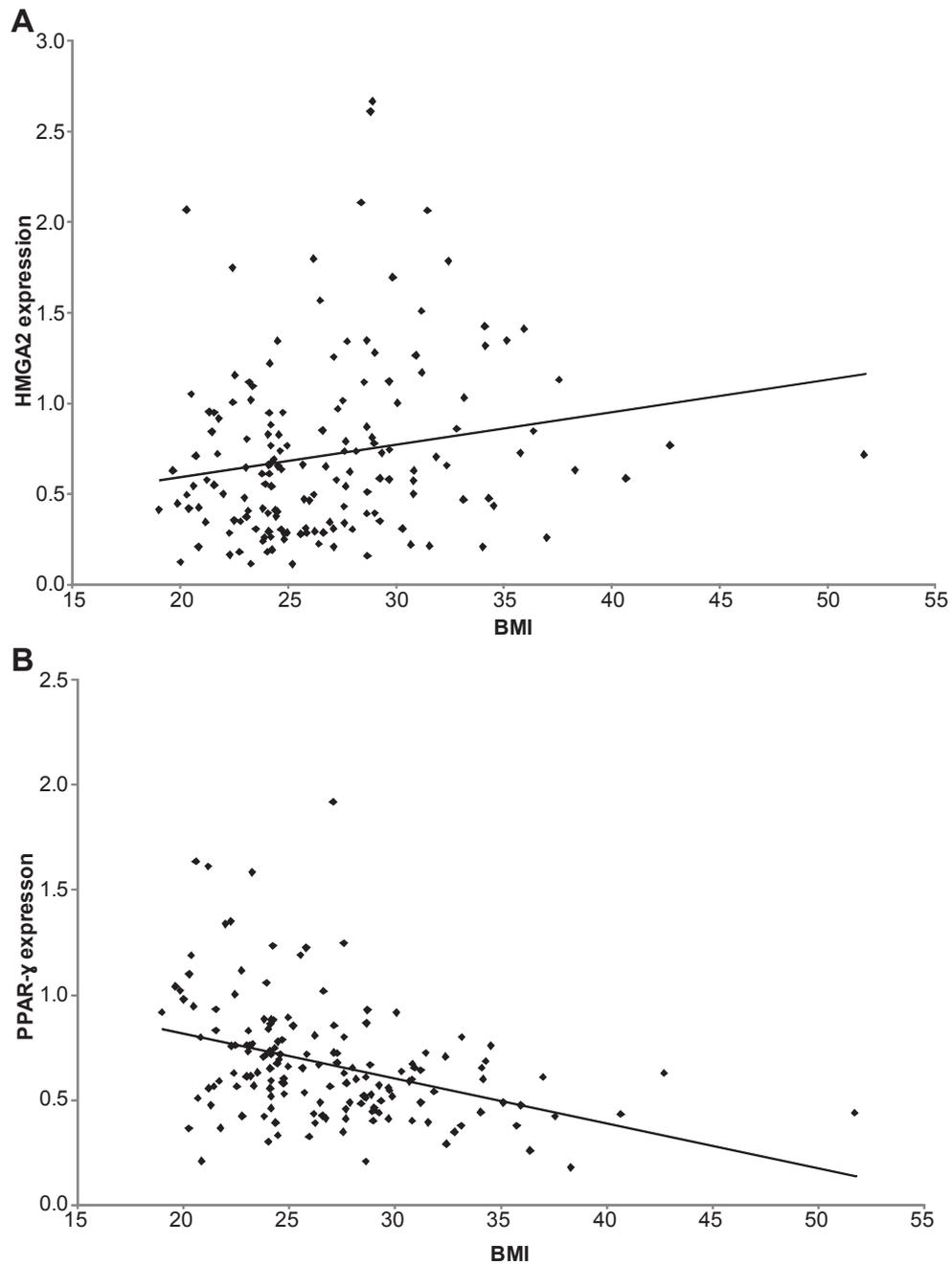


Fig. 3 A decrease of relative *PPAR-γ* and an increase of relative *HMG2* expression with increasing BMI represents a gain of body weight through accumulation of immature adipocytes in WAT

(A) Significant correlation ($p < 0.05$) of relative *HMG2* expression and BMI and (B) highly significant inverse correlation ($p < 0.001$) of relative *PPAR-γ* expression and BMI in human subcutaneous adipose tissue ($n = 157$).

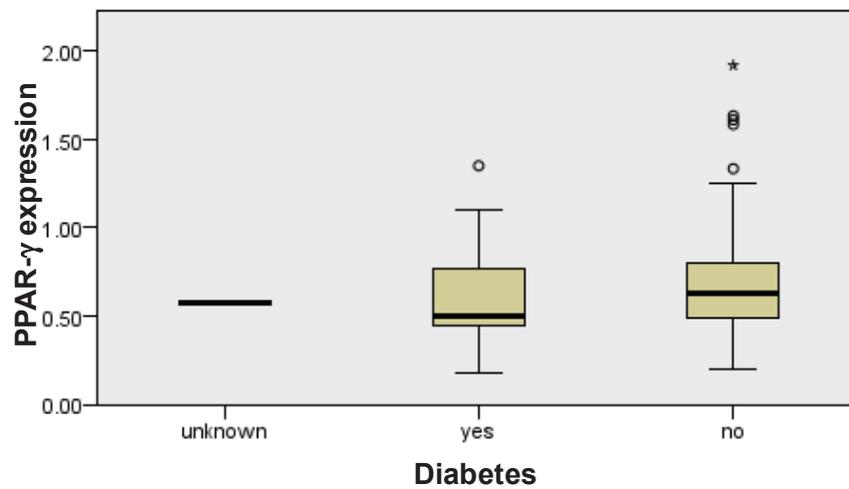


Fig. 4 No significant correlation between relative *PPAR-γ* expression and diabetes

Boxplots of relative *PPAR-γ* expression and diabetes in 157 human subcutaneous white adipose tissue. 140 individuals exhibit no type 2 diabetes, 16 individuals have T2D and the T2D status of one individual is unknown.

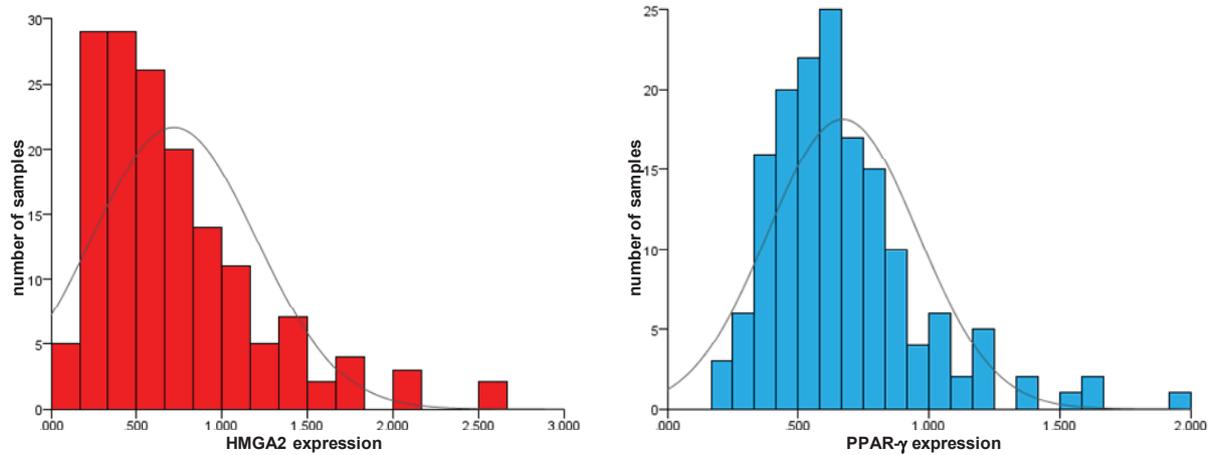
Tables

Table 1. Characteristics of the human subcutaneous abdominal white adipose tissue donors

	Normal weight			Overweight		
	male	female	all	male	female	all
n=	47	27	74	44	39	83
Age [years]	65,7 +/- 18,1	57,5 +/- 16,8	62,7 +/- 18,0	59,9 +/- 11,5	62,0 +/- 16,9	60,9 +/- 14,3
BMI [kg/m ²]	23,2 +/- 1,5	22,7 +/- 1,7	23,0 +/- 1,6	29,9 +/- 4,90	30,7 +/- 3,6	30,3 +/- 4,4
Diabetes	2	5	7	3	6	9

Values are means +/- standard deviation.

Supplemental Figures



Supplement Fig. 1 Histograms showing the distribution of 157 human abdominal subcutaneous adipose tissue samples and their relative expression of *PPAR-γ* and *HMGA2* (A,B). One-Sample-Kolmogorov-Smirnov test revealed that the test distribution of *HMGA2* (Asymptotic Significance (2-tailed) = 0.019) and *PPAR-γ* (Asymptotic Significance (2-tailed) = 0.049) is not normal.

Supplemental Tables

Supplement Table 1 One-Sample Kolmogorov-Smirnov test for normal distribution of expression of *PPAR-γ* and *HMGA2*

		PPAR- γ expression	HMGA2 expression
N		157	157
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	0.671	0.717
	Std. Deviation	0.287	0.483
Most Extreme Differences	Absolute	0.109	0.122
	Positive	0.109	0.122
	Negative	-0.069	-0.103
Kolmogorov-Smirnov Z		1.362	1.524
Asymptotic Significance (2-tailed)		0.049	0.019

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

3.3 Publikation III: HMGA2 expression in white adipose tissue linking cellular senescence with diabetes (Markowski, Thies et al., 2013):

Es gibt einen nachweisbaren Zusammenhang zwischen der Zunahme von Fettgewebe, Übergewicht und dem Risiko an Diabetes Typ II zu erkranken. Die molekularen Mechanismen, welche zu einem Übermaß an Fettgewebe und letztendlich zur Entstehung des Metabolischen Syndroms führen, sind weitestgehend unbekannt (Ahima, 2009). Ein adipöser Zustand setzt das Fettgewebe oxidativem Stress aus, welcher zu einem beschleunigten Alterungsprozess des Gewebes und einer Insulinresistenz der Adipozyten führt (Ahima, 2009; Minamino et al., 2009). Die Folge ist eine chronische Entzündungsreaktion, die durch eine Zunahme von unreifen seneszenten Zellen, welche nicht mehr in den Zellzyklus eintreten können, noch verstärkt wird (Tchkonia et al., 2010).

In den Publikationen I und II konnte ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der *HMGA2* Expression und dem Übergewicht bei Hunden bzw. der Zunahme des BMI beim Menschen festgestellt werden. Zudem konnte im *in vitro* System mit der Hochregulierung von *HMGA2* ein Anstieg der *p14^{Arf}*-Expression beobachtet werden. Dies sollte in dieser Studie zusätzlich an nativen humanen Fettgewebeproben überprüft werden. Dafür wurde die Expression von *HMGA2*, der Seneszenz-assoziierten Gene *p14^{Arf}* und *CDKN1A*, sowie des pro-apoptischen *BAX*-Gens mittels qRT-PCR an 157 humanen subkutanen abdominalen Fettgewebeproben gemessen.

Die mit Hilfe des Kendalls Tau-b Tests durchgeführte Analyse der Daten ergab eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$) zwischen der Expression der vier genannten Gene sowie eine hoch signifikante Korrelation ($p < 0,01$) zwischen der Expression von *HMGA2* mit *p14^{Arf}* sowie mit *CDKN1A*. Anschließend wurde der *HMGA2*-Expressionslevel von übergewichtigen Patienten ($\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) mit dem normalgewichtiger Patienten ($\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$) verglichen. Es zeigte sich hierbei eine signifikant höhere *HMGA2*-Expression ($p < 0,05$) in der ‚Übergewichtigen‘-Gruppe. Genomweite Assoziationsstudien konnten einen Zusammenhang zwischen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) im *HMGA2*-Lokus und dem Risiko an Diabetes Typ II zu erkranken feststellen (Ohshigo et al., 2011; Voight et al., 2010; Dayeh et al., 2013; Zeggini et al., 2007). Um einen Zusammenhang zwischen einer Diabetes Typ II Erkrankung und der Expression von sowohl *HMGA2* als auch von *p14^{Arf}* zu untersuchen, wurden die Fettgewebeproben von 16 Diabetikern mit denen von 140 Nicht-Diabetikern mittels Mann-Whitney U Test verglichen. Es zeigte sich ein höchst signifikanter ($p < 0,001$) Anstieg der *HMGA2*-Expression und ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der

p14^{Arf}-Expression in der Diabetiker-Gruppe. Ein Vergleich der Genexpressionen von sowohl *HMGA2* als auch von *p14^{Arf}* zwischen der Diabetiker- und der Nicht-Diabetiker-Gruppe mittels Perzentilen-Plots, zeigte zudem eine jeweilig höhere Genexpression der einzelnen Perzentile in der Diabetiker-Gruppe.

Um die Beziehung der Biomarker *HMGA2*, *p14^{Arf}*, *p21* und *BAX* mit dem BMI und dem Diabetes-Status zu analysieren, wurde Kohonens multivariates Modell der Selbstorganisierenden Karten (Kohonen, 2001) verwendet. Diese Selbstorganisierenden Karten zeigten eine Einteilung der Daten in drei Gruppen (S1, S2 und S3). Die Selbstorganisierende Karte für die *HMGA2*-Expression zeigte eine hohe Expression in der Diabetiker-Gruppe (S3), aber auch am direkt angrenzenden Bereich der Nicht-Diabetiker-Gruppe (S2) war eine erhöhte Expression festzustellen. Die Mittelwerte der *HMGA2*-Expressionen lagen bei 1,4 in S3, 0,9 in S2 und 0,5 in S1. Die Mittelwerte der *p14^{Arf}*-mRNA-Expressionen waren 2,2 in S3, 1,6 in S2 und 0,9 in S1.

III

HMGA2 expression in white adipose tissue linking cellular senescence with diabetes

Dominique Nadine Markowski*, Helge Wilhelm Thies*, Andrea Gottlieb, Heiner Wenk,
Manfred Wischnewsky, Jörn Bullerdiek

*diese Autoren sind gleichberechtigte Erstautoren des Artikels

(Genes & Nutrition. 8:449-456)

HMGA2 expression in white adipose tissue linking cellular senescence with diabetes

Dominique Nadine Markowski · Helge Wilhelm Thies ·
Andrea Gottlieb · Heiner Wenk · Manfred Wischnewsky ·
Jörn Bullerdiek

Received: 30 May 2013 / Accepted: 12 July 2013 / Published online: 24 July 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract There is a clear link between overweight, gain of white adipose tissue, and diabetes type 2 (T2D). The molecular mechanism of the gain of adipose tissue is linked with the expression of high mobility group protein AT-hook 2 (HMGA2), and recent studies revealed an association with a SNP near *HMGA2*. In this study, we investigated the gene expression of *HMGA2*, *p14^{Arf}*, *CDKN1A*, and *BAX* in human abdominal subcutaneous white adipose tissue from 157 patients. We found a significant higher *HMGA2* expression in obese individuals than in non-obese patients. Furthermore, the *HMGA2* expression in white adipose tissue in patient with type 2 diabetes was significantly higher than in nondiabetic patients. There is an association between the DNA-binding nonhistone protein HMGA2 and

the risk of developing T2D that remains mechanistically unexplained so far. Likewise, *p14^{Arf}*, an inducer of cellular senescence, has been associated with the occurrence of T2D. The data of the present study provide evidence that both proteins act within the same network to drive proliferation of adipose tissue stem and precursor cells, senescence, and increased risk of T2D, respectively.

Keywords HMGA2 · Subcutaneous abdominal white adipose tissue · Type 2 diabetes · ADSCs · *p14^{Arf}*

Introduction

Though there is little doubt about the association between overweight, gain of white adipose tissue (WAT), and diabetes type 2 (T2D), the mechanisms by which an excess of adipose tissue contributes to the onset of the metabolic syndrome are as yet far away from being fully understood (Ahima 2009). However, chronic inflammation contributes to a tissue environment that triggers an accelerated aging process and insulin resistance (Ahima 2009; Minamino et al. 2009). Some recent evidence suggests that an accumulation of immature senescent cells irreversibly unable to re-enter the cell cycle can lead to inflammatory processes (Tchkonia et al. 2010). A protein that is apparently linked to the process of proliferation and differentiation of adipose tissue stem and progenitor cells is high mobility group protein AT-hook 2 (HMGA2). Its gene (*HMGA2*) maps to a segment of 12q14 ~15 that is rearranged in a variety of tumors mostly of mesenchymal origin, including lipomas (Ashar et al. 1995; Schoenmakers et al. 1995a), pulmonary chondroid hamartomas, uterine leiomyomas, and fibroadenomas of the breast (Kazmierczak et al. 1999; Hennig et al. 1996; Schoenmakers et al. 1995b; Staats et al. 1996).

Dominique Nadine Markowski and Helge Wilhelm Thies have contributed equally.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12263-013-0354-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. N. Markowski · H. W. Thies (✉) · A. Gottlieb ·
J. Bullerdiek
Center of Human Genetics, University of Bremen,
Leobener Strasse ZHG, 28359 Bremen, Germany
e-mail: hties@uni-bremen.de

J. Bullerdiek
e-mail: bullerd@uni-bremen.de

H. Wenk
Department of General and Vascular Surgery,
Clinical Center Bremen-Nord, Hammersbecker Str. 228,
28277 Bremen, Germany

M. Wischnewsky
Department of Mathematics and Computer Science, University
of Bremen, Universitätsallee, 28359 Bremen, Germany

These rearrangements result in the formation of fusion genes, e.g., those with LPP (Rogalla et al. 2000) or merely in a strong transcriptional up-regulation of *HMGA2* (Bartuma et al. 2009; Tallini et al. 1997) likely causing tumorigenesis. As to normal tissues, there are strong experimental data linking *HMGA2* with hyperplasia of WAT. Transgenic mice expressing truncated *HMGA2* still retain the three AT-hook domains present with a giant phenotype and hyperplasia of WAT (Battista et al. 1999). Vice versa, *HMGA2* knockout mice show a pygmy phenotype with hypoplasia of WAT (Zhou et al. 1995). Likewise, a lack of *HMGA2* impairs lineage commitment of stem cells toward pre-adipocytes (Pasquali et al. 2004). Ayoubi et al. (1999) were able to show that in the murine-immortalized cell line NIH3T3, *HMGA2* can be induced by several growth factors as well as by fetal calf serum. Moreover, even normal not immortalized cells from adult adipose tissue have been shown to be able to execute a *HMGA2* response, i.e., appropriate stimuli lead to a short abundant expression of *HMGA2*. In a recent study, an increased “*HMGA2*-response” was found to be associated with overweight in dogs (Thies et al. 2013). This challenges earlier findings that *HMGA2* is a protein normally almost exclusively expressed during embryonic and fetal life. Apparently, many types of stem cells of adult mammals are able to restore the expression of *HMGA2* which in these cases might reflect self-renewal activity of stem and progenitor cells.

While the expression of *HMGA2* has been linked to a gain of adipose tissue and some recent studies revealed an association between variants of *HMGA2* and different risks to develop T2D (Ohshige et al. 2011; Voight et al. 2010; Dayeh et al. 2013), the exact mechanisms linking *HMGA2* with T2D remain obscure. A possibly relevant pathway addressing *HMGA2*'s role in WAT links the *CDKN2A* locus with the activation of *HMGA2* that, in adipose tissue-derived stem cells (ADSCs), recently has been associated with the induction of one of the two genes of the senescence-associated *CDKN2A* locus, i.e., *p14^{Arf}* (Markowski et al. 2011a), an upstream agonist of p53 driving apoptosis and senescence. Since the main players within that network are well-conserved among mammals, these latter effects can be considered being part of an ancient mechanism preventing activated mesenchymal stem cells from undergoing malignant transformation. On the other hand, an increased expression of *HMGA2* can be expected to result in an increase in the expression of *p14^{Arf}*, *p53*, and *CDKN1A* and subsequently an increase in senescent cells (Markowski et al. 2011a). Generally, an increase in senescent cells is believed to contribute to age-related diseases. For example, in mice, excessive caloric intake promoted senescence-associated changes like an increased β -galactosidase activity, an increased expression of p53

and of pro-inflammatory cytokines finally leading to insulin resistance (Minamino et al. 2009). As a mechanism, the accumulation of oxidative stress has been proposed. In addition, the increased proliferation of adipose tissue stem and progenitor cells may lead to their increased probability to enter senescence. Therefore, we were interested to investigate whether the link between the up-regulation of *HMGA2* and an increased expression of *p14^{Arf}* and its downstream effectors of senescence and apoptosis as revealed by in vitro studies can be confirmed on native human tissues.

Materials and methods

Tissue samples

Human subcutaneous abdominal WAT from 157 patients used in this study was taken during surgery and immediately frozen in liquid nitrogen. Prior to surgery, informed written consent was obtained from all patients. In addition, the study has been approved by the local ethics committee (Ethikkommission der Ärztekammer Bremen, no. 309). Clinical data were obtained by data-recording sheets.

RNA isolation

Total RNA was isolated using an RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden Germany) in a QIACube (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, and DNase I digestion was performed.

cDNA-synthesis

About 250 ng of total RNA were reverse transcribed with 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Darmstadt, Germany), RNase Out, and 150 ng random hexamers according to the manufacturer's instructions. RNA was denatured at 65 °C for 5 min and subsequently kept on ice for 1 min. After adding the enzyme to the RNA primer mixes, samples were incubated for 10 min at 25 °C to allow annealing of the random hexamers. Reverse transcription was performed at 37 °C for 50 min followed by inactivation of the reverse transcriptase at 70 °C for 15 min.

Quantitative real-time PCR

Relative quantification of transcription levels was carried out on the samples by real-time PCR analyses using the Applied Biosystems 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Commercially available gene expression assays (Applied Biosystems) were

used for quantification of mRNA of *p14^{Arf}* (Hs00924091), *CDKN1A* (Hs99999142), *BAX* (Hs00180269), and *HMGA2* (Hs00171569). *HPRT* served as endogenous control as described before (Markowski et al. 2010). All qRT-PCR experiments were done in triplicate.

Statistical evaluation

Nominally scaled variables were tabulated in contingency tables and tested for differences in frequency distribution. Variables for location and variance were calculated, whenever ordinally scaled and intervally scaled continuous variables were involved. For each group, we calculated the following: number of cases, mean, standard deviation, standard error of the mean, minimum, maximum, and 95 % confidence interval (CI) for the mean, medians [interquartile range, IQR], Levene's test for homogeneity of variance, analysis-of-variance table, and robust tests of the equality of means (medians). Normal distribution was tested using the Kolmogorov–Smirnov goodness-of-fit test. In addition to the standard Kolmogorov–Smirnov test, we also used the Anderson–Darling test and the Cramer–Smirnov–Von-Mises test, a modification of the K–S test, giving more weight to the tails of the distribution than does the K–S test. In order to compare the distributions and medians of the various biomarkers across diabetes, we used the independent samples Kolmogorov–Smirnov test, the Kruskal–Wallis test, the Mann–Whitney *U* test, and the median test. Correlations between the mRNA biomarkers were analyzed using Kendall's Tau-b correlations. Decision trees (Exhausted CHAID or CART) were calculated in order to create models that predict the value of one of the biomarkers as a target variable based on several other biomarkers or basic characteristics as input variables.

Beside decision trees to uncover interactions within the HMGA2-p14^{Arf}-p53 network, we used the data of the expression analyses as well as BMI and the diagnosis of T2D to create self-organizing maps (SOM) (Kohonen 2001). SOM may be considered a nonlinear generalization of principal components analysis (PCA). A SOM is a type of artificial neural network that is trained using unsupervised learning to produce a low-dimensional (typically two-dimensional), discretized representation of the input space of the training samples and called a map. The map learns the typical features of the subclasses in the learning set by means of a shortest Euclidean distance algorithm, after which self-adaptation of the neurons occurs. SOM has many advantages over the conventional feature extraction methods such as empirical orthogonal functions or PCA. SOM has been interpreted using semantic maps where similar samples are mapped close together and dissimilar ones apart.

Calculations were performed with NCSS (version 2007), SPSS (version 20), R (2.15.3), and Viscosity (version 5.1).

Results

Kendall's Tau-b correlation test revealing correlations between the expression of *HMGA2*, *p14^{Arf}*, *BAX*, and *CDKN1A*

Median age of patients was 65 years (range 19–97). 19.1 % were older than 75 years. 32.5 % had overweight (BMI 25.0–30.0), 20.4 % had adipositas (BMI > 30.0), and 10.2 % had been diagnosed as being diabetic patients (Table 1). HMGA2, p14^{Arf}, BAX, and CDKN1A mRNA expressions were detectable in all 157 samples. The relative levels of HMGA2 mRNA ranged between 0.11 and 2.66 with mean 0.72 ± 0.48 (Fig. 1). The distributions of p14^{Arf}, HMGA2, and CDKN1A expressions were not normal (One-Sample-Kolmogorov–Smirnov test) (suppl. Fig. 1a–c, suppl. Tab. 1). Only BAX was normally distributed with an asymptotic significance (2-tailed) of 0.634. Akin to what had been observed in in vitro studies, there were weak correlations at the 0.05 level (2-tailed) (Kendall's Tau-b) between any pair of the four determined biomarkers (Table 2). As to HMGA2 mRNA, there was even a weak correlation at the 0.01 level (2-tailed) with that of p14Arf and CDKN1A.

HMGA2 and obesity

Obesity (BMI > 25 kg/m²) was significantly associated with an increase in the expression of HMGA2 mRNA in our series of samples of human WAT. The Mann–Whitney *U* test showed that the distribution of HMGA2 mRNA was significantly ($p = 0.044$) different across the two categories of obese and non-obese patients. The median rank of HMGA2 mRNA for obese patients was 85.9 and 71.3 for non-obese patients. The mean of HMGA2 expression was 0.81 ± 0.55 in the group of obese patients ($n = 83$; 52.9 %) and 0.62 ± 0.38 in the group of non-obese patients ($n = 74$; 47.1 %) ($p = 0.016$; exhausted CHAID).

A significantly higher expression of HMGA2 mRNA in adipose tissue in patients with type 2 diabetes

16 (10.3 %) patients had a previous diagnosis of T2D. Diabetes was found to be highly significantly ($p < 0.001$) associated with an increase in the expression of HMGA2 mRNA. The independent samples Mann–Whitney *U* test (as well as the independent samples Kruskal–Wallis test) showed that the distribution of HMGA2 mRNA was highly significantly ($p = 0.001$) different across the two

Table 1 Characteristics of the human subcutaneous abdominal white adipose tissue donors

	<i>n</i> = 157 Number (%)
Sex	
Female	66 (42.0)
Male	91 (58.0)
Age	
Median	65.0 years
Min	19 years
Max	97 years
Age group	
<65 years	83 (52.9)
65–75 years	44 (28.0)
>75 years	30 (19.1)
BMI	
Underweight (<18.5)	1 (0.6)
Normal weight (18.5–25.0)	73 (46.5)
Overweight (25.0–30.0)	51 (32.5)
Adipositas (>30.0)	32 (20.4)
Diabetes	
Yes	16 (10.2)
Biomarker (mean ± sd; min, max)	
p14 ^{Arf}	1.34 ± 1.06; 0.14, 0.90
BAX	0.79 ± 0.16; 0.48, 1.67
p21	1.38 ± 0.59; 0.50, 4.12
HMGA2	0.72 ± 0.48; 0.11, 2.66

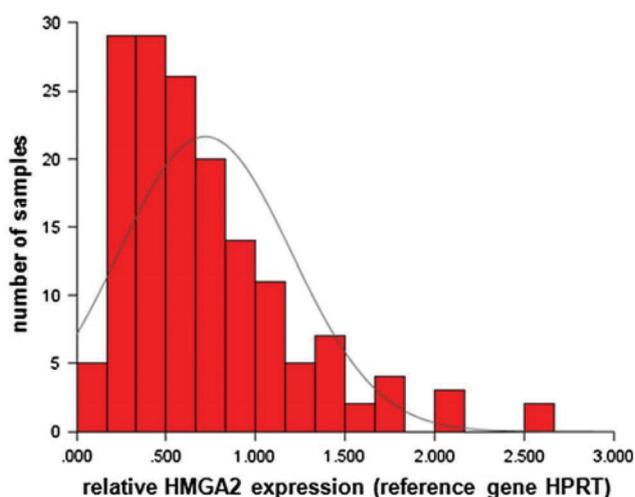


Fig. 1 Histogram showing the distribution of 157 human abdominal subcutaneous adipose tissue samples and their relative *HMGA2* expression. The housekeeping gene *HPRT* served as reference for relative quantification. One-sample Kolmogorov–Smirnov test revealed that the test distribution is not normal (asymptotic significance (2-tailed) = 0.019)

Table 2 Kendall’s Tau-b statistic test revealed correlation between the expression of *HMGA2*, p14^{Arf}, p21, and Bax

	p14 ^{Arf}	BAX	p21	HMGA2
<i>p14^{Arf}</i>				
Correlation Coefficient	1	0.333 ^a	0.188 ^a	0.180 ^a
Sig. (2-tailed)		<0.001	0.003	0.001
<i>N</i>	157	157	157	157
<i>BAX</i>				
Correlation Coefficient	0.333 ^a	1	0.265 ^a	0.127 ^b
Sig. (2-tailed)	<0.001		<0.001	0.048
<i>N</i>	157	157	157	157
<i>p21</i>				
Correlation Coefficient	0.188 ^a	0.265 ^a	1	0.272 ^a
Sig. (2-tailed)	0.003	<0.001		<0.001
<i>N</i>	157	157	157	157
<i>HMGA2</i>				
Correlation Coefficient	0.180 ^a	0.127 ^b	0.272 ^a	1
Sig. (2-tailed)	0.001	0.048	<0.001	
<i>N</i>	157	157	157	157

^a Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

^b Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

categories of diabetic and nondiabetic patients. The median rank of *HMGA2* mRNA for diabetic patients was 115.6 and 74.3 for nondiabetic patients. The mean of *HMGA2* expression was 1.24 ± 0.68 in the group of diabetic patients and 0.65 ± 0.42 the group of nondiabetic patients (*p* < 0.001; exhausted CHAID) (Fig. 2).

In mesenchymal stem cells (MSC), as well as in uterine leiomyomas, the increase in *HMGA2* was found to be accompanied by an increase in p14^{Arf} (Markowski et al. 2011a). Due to the fact that MSCs are part of WAT, we analyzed the distribution of p14^{Arf} in WAT across 140 nondiabetics and 16 diabetics. The independent samples Mann–Whitney *U* test showed that the distribution of

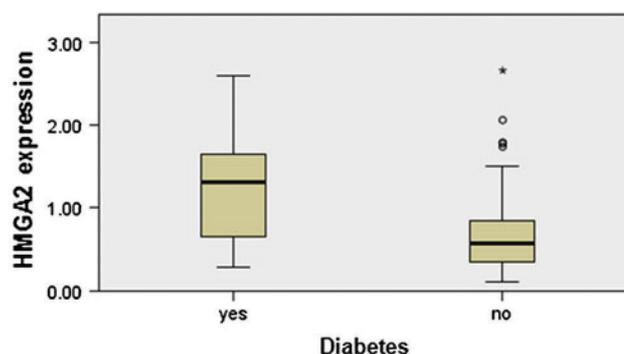


Fig. 2 Boxplot showing the relative *HMGA2* expression in WAT from patients with T2D (*n* = 16) and nondiabetic patients (*n* = 140). Independent samples Kruskal–Wallis test revealed a highly significant (*p* < 0.001) elevated expression of *HMGA2* in patients with T2D. The test statistics is adjusted for ties

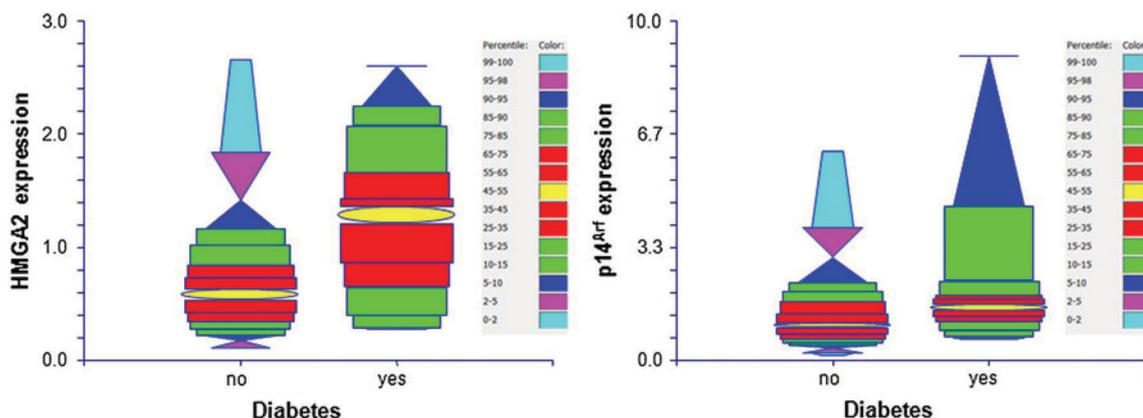


Fig. 3 Percentile plots of relative expression of *HMGA2* and *p14^{Arf}* in WAT from patients with T2D ($n = 16$) and nondiabetic patients ($n = 140$). In almost every percentile, the diabetic group showed a higher gene expression than in their corresponding percentile in the

nondiabetic group. Set of 15 percentiles (0–2, 2–5, 5–10, 10–15, 15–25, 25–35, 35–45, 45–55, 55–65, 65–75, 75–85, 85–90, 90–95, 95–99, 99–100)

p14^{Arf} expression is significantly ($p = 0.020$) different across the two categories of diabetic and nondiabetic patients. The mean rank of *p14^{Arf}* mRNA for diabetic patients was 103.5 and 75.7 for nondiabetic patients. The mean of *p14^{Arf}* mRNA expression was 1.97 ± 1.94 in the group of diabetic patients and 1.27 ± 0.90 in the group of nondiabetic patients ($p = 0.012$; exhausted CHAID).

The percentile plots from a set of 15 percentiles (0–2, 2–5, 5–10, 10–15, 15–25, 25–35, 35–45, 45–55, 55–65, 65–75, 75–85, 85–90, 90–95, 95–99, 99–100) for *HMGA2* and *p14^{Arf}* mRNA, an estimate of the corresponding distribution functions, show that in almost every percentile, the diabetic group has a higher gene expression than in their corresponding percentile in the nondiabetic group (Fig. 3).

Data analyses by self-organizing maps suggest a T2D risk profile associated with high *HMGA2* expression in a subset of diabetic individuals

We used Kohonen’s self-organizing maps to analyze the interactions of the biomarkers *HMGA2*, *p14^{Arf}*, *p21*, and *BAX* with the BMI- and diabetes status in a multivariate model. Figure 4a shows the corresponding segmentations of the patients into 3 groups. The goal of this segmentation was to separate the patients into such groups (segments) that the variance of the attribute values in a segment was as small as possible and in between the groups as large as possible. In segment S3 were most of the patients with diabetes, and a much smaller cluster of diabetic patients could be found in segment S1 (Fig. 4c). The map for *HMGA2* (Fig. 4b) shows the increase in the expression of *HMGA2* mRNA for diabetic patients in S3. The patients in segment S2 with an expression of *HMGA2* mRNA >1.6 might be those patients with pre-diabetes. Figure 5

represents the deviation of the mean of the values, an attribute of a segment from the mean of the corresponding attribute of the entire data set. S3 was characterized by a significant increase in the expressions of the biomarkers in question. The segment S2 was characterized by a light increase, whereas S1 was characterized by a light decrease. The mean value of *HMGA2* mRNA was 1.4 in S3, 0.9 in S2, and 0.5 in S1, whereas the mean value for *p14^{Arf}* was 2.2 in S3, 1.6 in S2, and 0.9 in S1.

Discussion

A gain of WAT is a hallmark of obesity. Nevertheless, details as to how diet-induced hypertrophy and hyperplasia of WAT are linked with the biology of mature adipocytes as well as with their precursors and stem cells are not fully understood, yet. Among the genes that have been linked to a gain of WAT and to T2D by large association studies (Ohshige et al. 2011; Voight et al. 2010; Zeggini et al. 2007) is *HMGA2* which has been linked to the development and differentiation of WAT as well. Recently, we had been able to identify an association between the expression of *HMGA2* and canine obesity (Thies et al. 2013). Based on these finding, we have hypothesized that the temporal activation of *HMGA2* in adipose tissue stem cells is a prerequisite not only of normal turnover of adipose tissue but also of its diet-induced hyperplasia. Since in vitro, the activation of *HMGA2* in ADSC by growth factors leads to an increasing expression of *p14^{Arf}* and accordingly of *p53* downstream targets as in particular *CDKN1A* and *BAX* we had aimed the present study at the question if comparable findings can be obtained on human WAT in vivo as well. The results confirm the hypothesis that the presumed associations between *HMGA2* and *p14^{Arf}* and its

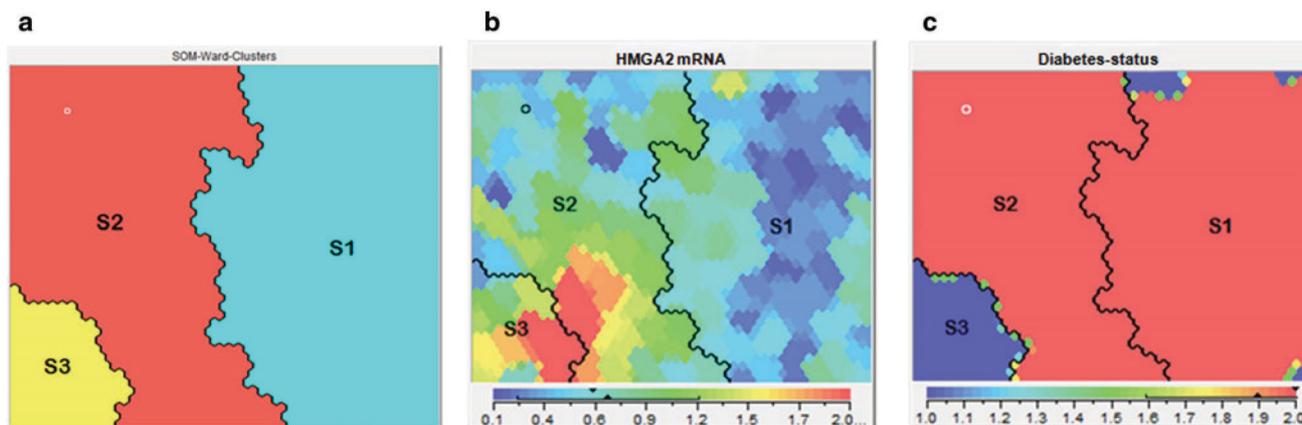


Fig. 4 Self-organizing maps suggests a T2D risk profile associated with high *HMGA2* expression. **a** Distribution of subgroups (S1–S3) after creation of self-organized map. **b** Self-organized map of relative

HMGA2 expression (low expression = blue; high expression = red). **c** Self-organized map of diabetic patient distribution (nondiabetic patient = red; diabetic patient = blue)

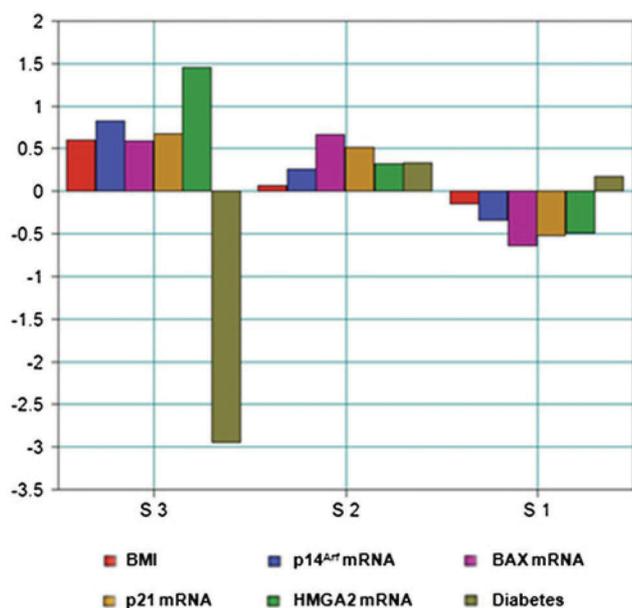


Fig. 5 Bar chart of the attributes in the three segments. The height of a bar in the bar chart is not the absolute mean of the values of an attribute of a segment, but the deviation of this mean from the mean of the entire data set. The unit is standard deviations of the entire data set. The diabetes status is inversely plotted, i.e., a negative value represents patients with T2D and a positive value nondiabetic patients

downstream targets were also detected in that large series of human WAT. Most likely, the increased level of *HMGA2* does not result from a generally increased expression in mature adipocytes but from the activation in single stem and precursor cells. This makes it tempting to speculate that these latter cells are also prone to undergo cellular senescence. An accumulation of senescent cells has repeatedly been hypothesized to cause inflammation of adipose tissue finally contributing to insulin resistance (Ahima 2009; Minamino et al. 2009). From the results reported in the literature as well as from this study, there is

ample evidence that a gain of fat cells depends on the activation of *HMGA2*. First, the constitutive activation of *HMGA2*, e.g., by chromosomal rearrangements causes lipomas, i.e., benign adipocytic tumors (Ashar et al. 1995; Schoenmakers et al. 1995a). Likewise, transgenic mice constitutively expressing *HMGA2* have been reported to develop subcutaneous lipomas and generally a drastic gain of adipose tissue (Battista et al. 1999). In contrast, constitutional knockout of *HMGA2* is associated with a hypoplasia of WAT and a lack of an obese phenotype despite leptin deficiency (Zhou et al. 1995). Accordingly, we have proposed that the temporarily strictly scheduled activation of *HMGA2* distinguishes the processes in normal adult tissue from the monoclonal gain of adipose tissue underlying the development of lipomas (Thies et al. 2013). However, all these results point to a pivotal role of *HMGA2* in the gain of adipocytes from their precursors and stem cells, respectively. On the other hand, activation of *HMGA2* seems to coincide with an increased expression of *p14^{Arf}* probably reflecting a mechanism protecting mesenchymal stem cells against malignant transformation (Markowski et al. 2011b). Subsequently, this increases the cell's probability to undergo cellular senescence. In turn, an accumulation of senescent cells is known to trigger inflammation known to be associated with insulin resistance, and more general with the metabolic syndrome. Of note, a high expression of *HMGA2* in the present study was not always associated with T2D. Nonetheless, from their position on the map (cf. Fig. 4b), these individuals were close to the patients with known T2D (cf. Fig. 4c). Basically, two explanations fit with these findings. First, the island with high *HMGA2* expression in a sector of S2 adjacent to the diabetes patients in S3 may in part represent T2D patients not yet detected. It is estimated that among the German population, roughly 50 % of the T2D patients are not yet diagnosed (Rathmann et al. 2003). Moreover,

this group of *HMGA2* “high expressors” in S2 could also contain individuals with insulin resistance not yet displaying T2D. Thus, one might speculate whether an increased expression of *HMGA2* mRNA in WAT can help to identify individuals at risk to become a diabetic patient. To some extent, the differences in *HMGA2* expression may reflect genetic factors, but to a much larger extent, they can be expected to depend on the individual lifestyle with food intake and mobility being major determinants. Dynamics of *HMGA2* expression over time were not in the focus of the present study, and the sampling procedure accordingly did not address that point. Nevertheless, in a future study, repeated samples taken from individuals at different times should be analyzed in order to understand if and how fast changes of the lifestyle can influence *HMGA2* expression in WAT.

From in vitro experiments, it has become evident that up- and downregulation of *HMGA2* in ADSCs occurs depending on the level of growth factors (Markowski et al. 2011b). If it holds true that the differences of *HMGA2* observed in WAT are due to changes in the stem and progenitor cell compartment, the kinetics may be similar to those observed in vitro with a relatively fast adjustment reacting to changes in food uptake, etc. Interestingly, in a recent paper, SNPs of *HMGA2* and *CDKN2A* known to undergo epigenetic modifications have been associated with T2D (Dayeh et al. 2013) offering further evidence linking T2D with *HMGA2*-induced proliferation and cellular senescence, i.e., irreversible escape from cell cycle. However, mechanistically, this association remains to be elucidated. The data of the present study provide evidence that both proteins act within the same network to drive proliferation of adipose tissue stem and precursor cells, senescence, and increased risk of T2D, respectively.

Acknowledgments We thank the Department of General and Vascular Surgery, Clinical Center Bremen-Nord, for providing human abdominal subcutaneous adipose tissue. We also thank Frauke Meyer and Alisa Ivanov for technical assistance.

Conflict of interest Dominique Nadine Markowski, Helge Wilhelm Thies, Andrea Gottlieb, Heiner Wenk, Manfred Wischnewsky, and Jörn Bullerdiel declare that they have no conflict of interest.

References

- Ahima RS (2009) Connecting obesity, aging and diabetes. *Nat Med* 15:996–997
- Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A et al (1995) Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 82:57–65
- Ayoubi TA, Jansen E, Meulemans SM et al (1999) Regulation of HMGIC expression: an architectural transcription factor involved in growth control and development. *Oncogene* 18:5076–5087
- Bartuma H, Panagopoulos I, Collin A et al (2009) Expression levels of *HMGA2* in adipocytic tumors correlate with morphologic and cytogenetic subgroups. *Mol Cancer* 8:36
- Battista S, Fidanza V, Fedele M et al (1999) The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res* 59:4793–4797
- Dayeh TA, Olsson AH, Volkov P et al (2013) Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets. *Diabetologia* 56:1036–1046
- Hennig Y, Wanschura S, Deichert U et al (1996) Rearrangements of the high mobility group protein family genes and the molecular genetic origin of uterine leiomyomas and endometrial polyps. *Mol Hum Reprod* 2:277–283
- Kazmierczak B, Meyer-Bolte K, Tran KH et al (1999) A high frequency of tumors with rearrangements of genes of the HMGI(Y) family in a series of 191 pulmonary chondroid hamartomas. *Genes Chromosomes Cancer* 26:125–133
- Kohonen T (2001) *Self-Organizing Maps*. Third, extended edition. Springer Berlin, Heidelberg, New York
- Markowski DN, von Ahnen I, Nezhad MH et al (2010) *HMGA2* and the p19Arf-TP53-CDKN1A axis: a delicate balance in the growth of uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 49:661–668
- Markowski DN, Winter N, Meyer F et al (2011a) p14Arf acts as an antagonist of *HMGA2* in senescence of mesenchymal stem cells—implications for benign tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 50:489–498
- Markowski DN, Helmke BM, Meyer F et al (2011b) BMP4 increases expression of *HMGA2* in mesenchymal stem cells. *Cytokine* 56:811–816
- Minamino T, Orimo M, Shimizu I et al (2009) A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* 15:1082–1087
- Ohshige T, Iwata M, Omori S et al (2011) Association of new loci identified in European genome-wide association studies with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese. *PLoS ONE* 6:e26911
- Pasquali D, Pierantoni GM, Fusco A et al (2004) Fenofibrate increases the expression of high mobility group AT-hook 2 (*HMGA2*) gene and induces adipocyte differentiation of orbital fibroblasts from Graves’ ophthalmopathy. *J Mol Endocrinol* 33:133–143
- Rathmann W, Haastert B, Icks A et al (2003) High prevalence of undiagnosed diabetes efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia* 46:182–189
- Rogalla P, Lemke I, Kazmierczak B et al (2000) An identical HMGI-C-LPP fusion transcript is consistently expressed in pulmonary chondroid hamartomas with t(3;12)(q27–28;q14–15). *Genes Chromosomes Cancer* 29:363–366
- Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R et al (1995a) Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumors. *Nat Genet* 10:436–444
- Schoenmakers EF, Geurts JM, Kools PF et al (1995b) A 6-Mb yeast artificial chromosome contig and long-range physical map encompassing the region on chromosome 12q15 frequently rearranged in a variety of benign solid tumors. *Genomics* 29:665–678
- Staats B, Bonk U, Wanschura S et al (1996) A fibroadenoma with a t(4;12)(q27;q15) affecting the HMGI-C gene, a member of the high mobility group protein gene family. *Breast Cancer Res Treat* 38:299–303

- Tallini G, Dal Cin P, Rhoden KJ et al (1997) Expression of HMGI-C and HMGI(Y) in ordinary lipoma and atypical lipomatous tumors: immunohistochemical reactivity correlates with karyotypic alterations. *Am J Pathol* 151:37–43
- Tchkonina T, Morbeck DE, Von Zglinicki T et al (2010) Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 9:667–684
- Thies HW, Nolte I, Wenk H et al (2013) Permanent activation of HMGA2 in lipomas mimics its temporal physiological activation linked to the gain of adipose tissue. *Obesity*. doi:[10.1002/oby.20137](https://doi.org/10.1002/oby.20137)
- Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V et al (2010) Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet* 42:579–589
- Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM et al (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316:1336–1341
- Zhou X, Benson KF, Ashar HR et al (1995) Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 376:771–774

4 Diskussion

Die WHO hat überhöhtes Körpergewicht, als Folge von Fettgewebszunahme, als eines der schwerwiegendsten Probleme der öffentlichen Gesundheit im 21. Jahrhundert ausgemacht. Allein in der Europäischen Union ist Übergewicht jährlich für mehr als 1 Mio. Todesfälle sowie für 12 Mio. „krank verbrachte“ Lebensjahre verantwortlich (James et al., 2004). Die wesentlichen Risikofaktoren die zu Übergewicht und Adipositas führen sind u. a. Überernährung, Bewegungsmangel, genetische Faktoren sowie Nebenwirkungen von Medikamenten. Zu den Folgen von Übergewicht gehören kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ II, Metabolisches Syndrom und Tumorerkrankungen. Die zellulären Grundlagen für die Expansion von weißem Fettgewebe beruhen sowohl auf der Hypertrophie als auch der Hyperplasie von Adipozyten (Hellmann und Hellerstrom, 1961; Hirsch und Han, 1969; Lemonnier, 1972; Häger et al., 1977; Bertrand et al., 1978; Faust et al., 1978; Knittle et al., 1979). Diese Mechanismen sorgen u. a. für die enorme ‚Plastizität‘ des Fettgewebes, denn Fettgewebe ist in der Lage, in Abhängigkeit von der jeweiligen Energiebilanz, sowohl massiv zu expandieren als auch zu schrumpfen. Selbst im nicht-expandierenden Fettgewebe erneuern sich ~10 % aller Adipozyten regelmäßig, um einen strukturierten Turnover zu gewährleisten (Spalding et al., 2008; Rigamonti et al., 2011). Zudem konnten Studien an Ratten, Kaninchen und am Menschen belegen, dass sich weißes Fettgewebe nach einer Lipektomie regenerieren kann (Larson und Anderson, 1978; Reyne et al., 1983; Hernandez et al., 2011; Faust et al., 1977). Grundlage für die Regeneration und den Turnover von Adipozyten ist die MSC im Fettgewebe (Zuk et al., 2001; Halvorsen et al., 2001), aus der letztendlich der reife Insulin-sensitive Adipozyt entsteht. Diese MSCs befinden sich in der perivaskulären Nische des Fettgewebes (Tang et al., 2008; Zannettiino et al., 2008; Traktuev et al., 2008) und entwickeln sich über ADSCs zu Präadipozyten, um am Ende des Differenzierungsprozesses als reife Adipozyten hervorzugehen. Bis heute sind die genauen molekularen Mechanismen, die zur Hyperplasie von Fettgewebe, der Differenzierung von ADSCs zu reifen Adipozyten und dem Turnover von Adipozyten führen, nicht bekannt. Ein eminentes Gen, welches mit der Proliferation, Differenzierung und Selbsterneuerung von Präadipozyten und deren Vorläuferzellen in Zusammenhang steht, ist *HMGA2*. HMGA2-Proteine können als architektonische Transkriptionsfaktoren die Regulation von Genen durch Konformationsänderungen der DNA veranlassen und durch Rekrutierung anderer Transkriptionsfaktoren die Genexpression beeinflussen (Cleynen und van de Ven, 2007). Anand und Chada konnten im Jahr 2000 an *Hmga2* Knock-out Mäusen zeigen, dass das

Fehlen von *Hmga2* unter anderem mit einem verringerten Körpergewicht und einer verringerten Zellzahl im Fettgewebe assoziiert ist. Transgene *Hmga2*-Mäuse wiesen hingegen einen Riesenwuchs und einen enormen Zuwachs an subkutanem Fettgewebe auf (Battista et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde u. a. die Rolle von *HMGA2* in Bezug auf den Turnover von Adipozyten und die Hyperplasie von Fettgewebe untersucht.

Da in adulten Geweben die *HMGA2*-Expression kaum detektierbar ist (Rogalla et al., 1996; Gattas et al., 1999), sollte zunächst die *HMGA2*-Expression in Tumoren untersucht werden. Die Entstehung von benignen Tumoren mesenchymalen Ursprungs, wie Lipomen, Myomen, pulmonalen chondroiden Hamartomen und Endometriumpolypen, wird mit einer Überexpression von *HMGA2* aufgrund von 12q14~15 Rearrangierungen in Verbindung gebracht (Schoenemakers et al. 1995). Besonders bei Lipomen, die eine chromosomale Rearrangierung im Bereich 12q14~15 aufweisen, konnte eine transkriptionelle Hochregulation von *HMGA2* beobachtet werden (Ashar et al., 1995; Schoenemakers et al. 1995; Bartuma et al., 2009). Aus diesem Grund ergab sich für diese Arbeit zunächst die Fragestellung, ob Gemeinsamkeiten zwischen der permanenten Aktivierung von *HMGA2* in Lipomen und der temporären Aktivierung von *HMGA2* im Fettgewebe bestehen. Es ist bekannt, dass der Wachstumsfaktor FGF1 die Expression des *HMGA2*-Gens in immortalisierten murinen Präadipozyten (Ayoubi et al. 1999) und primären humanen ADSCs (Markowski et al., 2011a) induziert. Die FGF1-Signalkaskade und somit die Interaktion zwischen FGF1 und seinem Rezeptor (Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1)) spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Entwicklung humaner Adipozyten. FGF1 fördert nicht nur die Proliferation von humanen Präadipozyten, sondern bewirkt auch die anschließende Differenzierung zu reifen Adipozyten (Widberg et al., 2009). Im Zuge dieser Arbeit wurden humane Fettgewebsexplantate und die aus ihnen gewonnenen ADSCs mit FGF1 stimuliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Fettgewebsexplantate als auch die ADSCs einen höchstsignifikanten *HMGA2*-Anstieg auf Gen- und Proteinebene aufwiesen. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass im adulten Fettgewebe Zellen existieren, die nach einem geeigneten Stimulus eine *HMGA2*-Antwort ausführen können. Die beobachtete *HMGA2*-Antwort verlief in einem engen zeitlichen Rahmen mit einem Peak der *HMGA2*-Expression nach 12 Stunden und einer anschließenden sukzessiven Abnahme, welche darauf schließen lässt, dass die transkriptionelle Hochregulierung von *HMGA2* nicht aktiv terminiert wird, sondern durch den nachlassenden FGF1 Stimulus langsam abklingt. Zudem führte eine Restimulierung der ADSCs 72 Stunden nach der initialen Stimulierung mit FGF1 zu einer erneuten hochsignifikanten transkriptionellen Hochregulierung von *HMGA2*.

Dies steht im Widerspruch zu der von Ayoubi et al. (1999) postulierten Hypothese einer aktiv terminierten *HMGA2*-Transkription mittels eines Repressors. Wäre dieser Repressor noch vorhanden könnte *HMGA2* nicht erneut und insbesondere nicht nach derart kurzer Zeit transkriptionell reaktiviert werden. Die temporäre Aktivierung von *HMGA2* durch Stimulierung mit dem Wachstumsfaktor FGF1 ist mit der Proliferation von MSCs, ADSCs und Präadipozyten verbunden. Wird die *HMGA2*-Expression mittels siRNAs inhibiert, kann ein höchstsignifikanter Rückgang der Expression des Proliferationsmarkers *MKi67* beobachtet werden (Thies et al., 2012). Diese *HMGA2*-assoziierte Proliferation spiegelt die Situation im Fettgewebe wider, bei der neue Präadipozyten rekrutiert werden, nachdem die reifen Adipozyten nicht länger in der Lage sind weitere Triglyzeride zu speichern bzw. eine kritische Größe erreicht haben, was wiederum zu einer Sekretion von Wachstumsfaktoren führt (Faust et al., 1978; DiGirolamo et al., 1998; Marques et al., 1998). Die Zunahme von MSCs, ADSCs und Präadipozyten in weißem subkutanem Fettgewebe führt zu einer Expansion des Gewebes und kann als der Beginn einer Hyperplasie von Fettgewebe betrachtet werden (Abb.1A). In Lipomen mit Translokation im chromosomalen Bereich 12q14~15 ist *HMGA2* permanent transkriptionell hochreguliert, was ähnlich wie bei der temporären Aktivierung von *HMGA2* durch Wachstumsfaktoren im Fettgewebe zu einer Proliferation der Zellen führt. Im Vergleich zu normalem weißem Fettgewebe in dem die Hyperplasie polyklonalen Ursprungs ist, charakterisiert die konstitutive Aktivierung von *HMGA2* das monoklonale Wachstum von Lipomen (Abb. 1B). Da in Lipomen mit *HMGA2*-Rearrangierung eine permanente transkriptionelle Hochregulierung von *HMGA2* existiert (Ashar et al., 1995; Schoenemakers et al. 1995; Bartuma et al., 2009), stellt sich die Frage, warum Lipome nicht schnell und unbegrenzt wachsen, sondern teils sehr langsam an Größe zunehmen und irgendwann ihr Wachstum einstellen. Besonders interessant ist diese Tatsache vor dem Hintergrund, dass durch die Rearrangierung trunkierte *HMGA2*-Proteine oder Fusionsgene entstehen (Ashar et al., 1995; Schoenemakers et al., 1995; Petit et al., 1999), denen die 3'UTR von *HMGA2* inklusive der Bindungsstelle für die *let-7* miRNAs fehlen und sich somit der negativen posttranskriptionalen Regulation entziehen (Lee et al., 2007; Mayr et al. 2007). Eine mögliche Erklärung für das langsame Wachstum und eine augenscheinliche vorhandene Regulierung einer unkontrollierten Proliferation von Lipomen könnte eine Verbindung zum Tumorsuppressor p53 sein. Der Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor u. a. die Progression im Zellzyklus, die Apoptose-Induktion und die Reparatur von DNA-Schäden in der Zelle (Lane, 1992). Der upstream Agonist p14^{Arf} des p53 ist ein bekannter Zellzyklusinhibitor und mit *HMGA2* assoziiert (Nishino et al., 2008;

Markowski et al., 2011). Es zeigte sich bei Myomen, dass der p14^{Arf}-MDM2-TP53 Signalweg eine zentrale Rolle in der Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS) einnimmt (Markowski et al., 2010). Über die Aktivierung des *CDKN2A*-Lokus, der für die Zellzyklusinhibitoren p14^{Arf} und p16^{Ink4a} kodiert, führt die OIS zu einem Wachstumsstopp in den betroffenen Zellen und nimmt diese somit aus dem Zellzyklus. Dieser durch OIS herbeigeführte Wachstumsarrest ist häufig bei benignen und prämaligen Tumoren zu beobachten (Braig et al., 2005; Michaloglou et al., 2005; Chen et al., 2005; Mooi und Peeper, 2006). MSCs sind die mutmaßlichen Ursprungszellen aus denen Lipome sowie Myome hervorgehen. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll die OIS als möglichen Wachstumsregulator in Lipomen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden daraus resultierend die Expressionen von *HMGA2* und *p14^{Arf}* in 19 Lipomen analysiert und es ließ sich eine höchstsignifikante positive Korrelation zwischen beiden Genen feststellen (Thies et al., 2012). Weitere Untersuchungen an ADSCs, also den mutmaßlichen Ursprungszellen von Lipomen, wiesen eine Korrelation zwischen *HMGA2*, *p14^{Arf}* und dem p53 nachgeschalteten *CDKN1A* auf. Diese Erkenntnis steht im Widerspruch zu der von Nishino et al. (2008) vermuteten Reprimierung des Seneszenz-assoziierten *p14^{Arf}*-Gens durch *HMGA2* in NSCs. Es ist eher davon auszugehen, dass *HMGA2* ein Agonist von p14^{Arf} ist und das Zusammenspiel von Proliferation und Seneszenz der Zellen einen Schutzmechanismus gegen eine maligne Transformation darstellt.

Da die temporäre *HMGA2*-Aktivierung in ADSCs nach Stimulierung mit dem Wachstumsfaktor FGF1 mit deren Proliferation assoziiert ist (Thies et al., 2012), sollte die Situation *in vivo* genauer untersucht werden. Hierfür wurden subkutane weiße Fettgewebeproben sowohl von Hunden als auch von Menschen untersucht. Das Hundemodell wurde für diese Untersuchung ausgewählt, da Hunde dieselbe Umwelt mit dem Menschen teilen, eine ähnliche Ernährungsweise haben und die Genome von Hund und Mensch eine weitaus höhere Nukleotid-Übereinstimmung aufweisen als die von Maus und Mensch (Sutter und Ostrander, 2004). Es zeigte sich, dass ein hochsignifikanter Unterschied in der *HMGA2*-Expression zwischen normal- und übergewichtigen Hunden (Thies et al., 2012) existiert. Auch in humanem Fettgewebe konnte ein signifikanter Unterschied zwischen normal- (BMI < 25 kg/m²) und übergewichtigen (BMI ≥ 25 kg/m²) Menschen in Bezug auf die *HMGA2*-Expression festgestellt werden (Markowski et al., 2013). Die *HMGA2*-Expression im subkutanen weißen Fettgewebe von normalgewichtigen Hunden und Menschen spiegelt den normalen Adipozyten-Turnover wider. Der geschätzte Adipozyten-Turnover des Menschen variiert sehr stark. Von knapp 10 % pro Jahr, gemessen an der Einbaurrate von atmosphärischem ¹⁴C in genomische DNA (Spalding et al., 2008), bis hin zu 60 % pro Jahr,

errechnet durch Langzeit-Beobachtung vom $^2\text{H}_2\text{O}$ Einbau in Adipozyten (Strawford et al., 2004). Der Adipozyten-Turnover ist streng reguliert und es konnte kein Unterschied in der Adipozytensterblichkeit zwischen schlanken und übergewichtigen Individuen nachgewiesen werden (Spalding et al., 2008). Das belegt, dass die höhere *HMGGA2*-Expression bei übergewichtigen Hunden und Menschen nicht auf eine erhöhte Adipozyten-Turnover-Rate zurückzuführen ist.

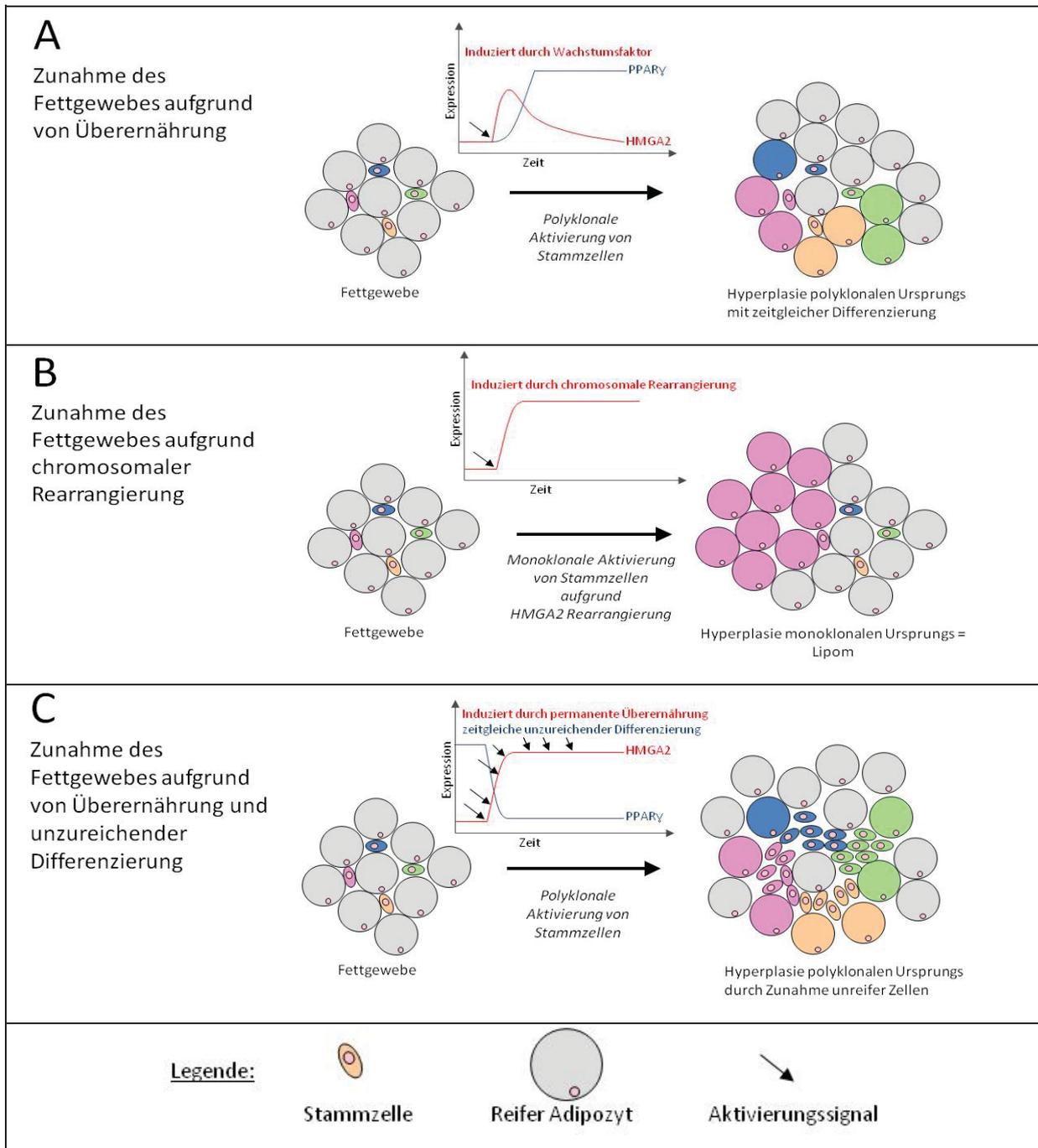


Abbildung 1: Hyperplasie im Fettgewebe und im Lipom. A: Hyperplasie im Fettgewebe mit gleichzeitiger Differenzierung der Stammzellen. B: Hyperplasie im Lipom aufgrund monoklonaler Aktivierung der Stammzellen. C: Hyperplasie im Fettgewebe induziert durch permanente Überernährung führt mit PPAR- γ -Mangel zur Zunahme unreifer Zellen.

Da Übergewicht häufig auf ein Ungleichgewicht in der Energiebilanz des Individuums zurückzuführen ist, also auf entweder eine zu große Energieaufnahme durch Ernährung und/oder einen zu geringen Energieverbrauch durch Bewegungsmangel, kann man davon ausgehen, dass hauptsächlich die Zunahme von Fettgewebe und nicht von Muskelmasse für das Übergewicht verantwortlich ist. Durch spezielle fettreiche bzw. hochkalorische Diäten kann die Anzahl der Adipozyten im Fettgewebe, durch Expansion der Präadipozyten, zunehmen (Klyde und Hirsch, 1979; Ailhaud et al., 1992). Eine Studie von Tchoukalova (2010) konnte zeigen, dass bei humanen Probanden eine Zunahme des Körpergewichtes um 1,6 kg im unteren Körperbereich, durch hochkalorische Diät einherging mit dem Anstieg der Adipozytenzahl um 2,6 Milliarden. Zudem konnte an Wildtyp-Mäusen die eine Woche lang eine fettreiche Diät erhielten ein Anstieg der *Hmga2*-Expression gezeigt werden (Anand und Chada, 2000). Fehlt HMGA2, wie bei *Hmga2* Knock-out Mäusen, führt dies zu einem Pygmy-Phänotyp und einem rund 40 % geringeren Körpergewicht im Vergleich zu den Wildtyp-Wurfgeschwistern (Benson und Chada, 1994). Vergleicht man nun das Fettgewebe auf zellulärer Basis, so zeigt sich, dass das geringere Körpergewicht bei der *Hmga2*^{-/-}, *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} Maus im Vergleich zur *Lep*^{ob}/*Lep*^{ob} Maus auf einer geringeren Zellzahl im Fettgewebe basiert (Anand und Chada, 2000). Ebenso beeinträchtigt ein Mangel an HMGA2 die Determination der mesenchymalen Stammzelle in Richtung Präadipozyte (Pasquali et al., 2004). Im Gegensatz zu den *Hmga2* Knock-out Mäusen weisen transgene Mäuse, die ein trunkiertes *Hmga2*-Protein exprimieren, einen Riesenwuchs und eine drastische Zunahme an retroperitonealem und weißem subkutanem Fettgewebe auf (Battista et al., 1999). Diese Zunahme von weißem Fettgewebe ist mit dem Anstieg des Körpergewichtes um ~ 36 % im Vergleich zu den Wildtyp-Wurfgeschwistern verbunden. Experimente sowohl an homo- als auch heterozygoten *Hmga2* Knock-out Mäusen, sowie an transgenen *Hmga2*-Mäusen deuten auf eine dosisabhängige Wirkweise von *Hmga2* hin. Übereinstimmend mit diesen Erkenntnissen konnte bei übergewichtigen Hunden eine hochsignifikant gesteigerte Anzahl von *HMGA2*-Transkripten im Vergleich zu normalgewichtigen Hunden ermittelt werden (Thies et al., 2012). Des Weiteren konnte an humanem subkutanem weißem Fettgewebe eine erhöhte *HMGA2*-Expression bei Übergewichtigen (BMI \geq 25 kg/m²) im Vergleich zu Normalgewichtigen (BMI $<$ 25 kg/m²) ermittelt werden (Markowski et al., 2013). Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die *HMGA2*-Expression beim Menschen signifikant positiv mit dem BMI korreliert ist (Thies et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Insgesamt deutet der Zusammenhang zwischen hoher *HMGA2*-Expression und Übergewicht bzw. dem BMI daraufhin, dass die Zunahme von Fettgewebe verstärkt wird durch die

Expansion der MSCs, ADSCs und Präadipozyten, also durch Hyperplasie. Ein weiteres Indiz für die *HMGA2*-assoziierte Hyperplasie des Fettgewebes ist die Zunahme der *HMGA2*-Expression übergewichtiger Hunde mit dem Alter (Thies et al., 2012). Dieser Anstieg ist vermutlich auf ein jahrelanges falsches Fütterungsverhalten (Überfütterung) des Besitzers und auf eine altersbedingte geringere körperliche Aktivität der Hunde, sowie auf eine Änderung des Hormonstatus der Tiere zurückzuführen. Bei normalgewichtigen Hunden hingegen bleibt die *HMGA2*-Expression im Alter nahezu konstant auf einem niedrigen Niveau. Dies spiegelt mutmaßlich den normalen Turnover der caninen Adipozyten wider.

Es ist bekannt, dass leichtes Übergewicht mit einer zunehmenden Adipozytengröße einhergeht, wohingegen bei Adipositas neben der Adipozytengröße auch deren Anzahl zunimmt (Spiegelman und Flier, 1996). Bei Mäusen die eine fettreiche Diät erhalten ist die Größe der Adipozyten positiv mit *Ppar-γ* korreliert und geht mit der Zunahme des Körpergewichtes einher (Kubota et al., 1999). *PPAR-γ* ist ein Liganden-bindender nukleärer Transkriptionsfaktor der PPAR-Unterfamilie, der zur Gruppe der nukleären Hormonrezeptoren gehört (Chawla et al., 2001). Über Heterodimerisation mit dem Retinoid X Rezeptor α (RXR α) aktiviert *PPAR-γ* Adipozyten-differenzierende Gene (Kirkland et al., 2002). Die Expression von *PPAR-γ* ist für das Fortschreiten der Adipogenese zwingend erforderlich, insbesondere für die Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten (Darlington et al., 1998; Gregoire et al., 1998; Lowell, 1999). Während der humanen Adipogenese nimmt die Expression von *PPAR-γ*-mRNA zu. Durch eine induzierte Überexpression von miR-130, die sowohl mit der codierenden Region als auch mit der 3'UTR von *PPAR-γ* interagiert und diese reprimiert, wird die Adipogenese inhibiert (Lee et al., 2011). NIH-3T3 Fibroblasten, die relativ resistent gegenüber der Differenzierung zu reifen Adipozyten sind und kein *PPAR-γ* exprimieren, zeigen nach ‚Gain-of-Function‘-Experimenten mittels ektopischer Expression von *PPAR-γ* Adipogenese (Freitag et al., 1994; Tontonoz et al., 1994; Yeh et al., 1995b; Wu et al., 1996). Zudem ist *PPAR-γ* ein essentieller Regulator der Adipogenese *in vivo*. *Ppar-γ* Knock-out Mäuse wiesen ein komplettes Fehlen von weißem und braunem Fettgewebe auf. Ein Vergleich zwischen dem Gewicht von *Ppar-γ*^{+/-}- und *Ppar-γ*^{-/-}-Mäusen zeigte, dass letztere nur knapp 70 % des Gewichts ihrer *Ppar-γ*^{+/-}-Wurfgeschwister aufwiesen (Barak et al., 1999). Neben der Initiation der Präadipozyten-Differenzierung koordiniert *PPAR-γ* gemeinsam mit dem CCAAT/Enhancer Binding Protein α (C/EBP α) die Regulation der Expression diverser Gene, welche notwendig für die Aufrechterhaltung des Adipozyten-Phänotyps und ihrer Insulinsensitivität sind (Christy et al., 1989; El-Jack et al., 1999; Hollenberg et al., 1997; Yeh et al., 1995b). Zu den von *PPAR-γ*

regulierten Genen gehören Lipoprotein Lipase, CD36, Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, Aquaporin 7 und Adiponektin, die neben der Adipogenese auch im Glukose-Metabolismus und der Lipidspeicherung involviert sind (Lehrke und Lazar, 2005). Da PPAR- γ Schlüsselregulator-Funktionen während der Adipogenese und der Aufrechterhaltung des Adipozyten-Phänotyps zukommen und es somit als essentielles Protein am Zuwachs von Fettgewebe beteiligt ist, analysierten wir die caninen und humanen subkutanen weißen Fettgewebeproben auf Expression von PPAR- γ . Hierbei zeigte sich, dass die Expression von PPAR- γ in der übergewichtigen Gruppe sowohl beim Hund als auch beim Menschen signifikant geringer ist als in der normalgewichtigen Gruppe (Thies et al., 2012; Thies et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Dies lässt auf einen geringeren Differenzierungsgrad der Adipozyten in den untersuchten caninen und humanen Fettgewebeproben schließen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die höchstsignifikant inverse Korrelation zwischen der Expression von PPAR- γ und dem BMI (Thies et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Vergleicht man nun die Expressionen von PPAR- γ und *HMGA2*, sowohl beim Hund als auch beim Menschen miteinander, zeigt sich eine höchst signifikante inverse Korrelation beider Gene (Thies et al., 2012; Thies et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Die geringere mRNA-Expression von PPAR- γ in subkutanem weißem abdominalem Fettgewebe bei Individuen mit Übergewicht sowie die inverse Korrelation zwischen PPAR- γ und *HMGA2* lassen eine antagonistische Rolle von PPAR- γ und *HMGA2* in der Differenzierung von Adipozyten und der Proliferation und Selbsterneuerung der MSCs, ADSCs und Präadipozyten vermuten. Durch die signifikante Korrelation zwischen *HMGA2* und dem BMI in Kombination mit einer höchstsignifikanten inversen Korrelation zwischen PPAR- γ und dem BMI, lässt sich belegen, dass bei Zunahme des Körpergewichts auch die Anzahl der unreifen Adipozyten im Fettgewebe zunimmt. Es kommt zur Hyperplasie des Fettgewebes ohne zeitgleiche Hypertrophie der Adipozyten (Abb. 1C). Die Präadipozyten und ihre Vorläuferzellen können in subkutanem weißem Fettgewebe also nicht so schnell und in dem Maße zu reifen Insulin-sensitiven Adipozyten differenzieren, wie es zur Rekrutierung neuer Präadipozyten kommt. Würde eine parallele Rekrutierung und Differenzierung von Präadipozyten erfolgen, müsste eine positive Korrelation zwischen PPAR- γ und *HMGA2* vorhanden sein. Diese verstärkte Zunahme an unreifen Präadipozyten im Vergleich zu reifen Insulin-sensitiven Adipozyten in subkutanem Fettgewebe hat enorme Auswirkungen auf den Lipid- und Glukose-Metabolismus sowie auf die endokrine Funktion des Fettgewebes. Im Bereich des Lipid-Metabolismus können freie Fettsäuren nicht, oder nur im geringen Maße, im Adipozyt gespeichert werden. Dies hat u. a. Auswirkungen auf das vaskuläre System und

würde das Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen erhöhen. In transgenen Mausmodellen, in denen speziell die Fettgewebsentwicklung blockiert wurde, zeigte sich ein nicht vollständig differenziertes weißes Fettgewebe mit einer verminderten Fettdepotgröße und einen verminderten mRNA-Level der Adipozyten-Differenzierungsmarker *PPAR-γ*, *C/EBPα* und *Leptin*. Aus dem geringeren Differenzierungsgrad des Fettgewebes resultiert eine erhöhte Triglyzerid-Konzentration im Plasma, die mit einer verstärkten Lipidaufnahme in der Leber und anderen Stellen sowie Diabetes einhergeht (Shimomura et al., 1998). Diese Umverteilung der Triglyzeride sorgt für eine Lipidakkumulation und Dedifferenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen, wie Muskelsatellitenzellen und Osteoblasten-Vorläuferzellen, in einen teilweisen Adipozyten-ähnlichen Phänotyp, die sogenannte ‚MAD-Zellen‘ (Kirkland et al., 2002). Zirkulierende freie Fettsäuren haben zudem einen negativen Einfluss auf die Glukoseverwertung der Skelettmuskulatur, was in der Leber zu einer verstärkten Glukoseproduktion führt. Beide Phänomene sorgen für eine hohe Blutzuckerkonzentration im Blutkreislauf, ein Kennzeichen für nicht-Insulin-abhängigen Diabetes Mellitus (Morrison und Farmer, 2000). Eine verstärkende Wirkung auf die Blutzuckerkonzentration hat die Beeinträchtigung des Glukose-Metabolismus aufgrund des Fehlens des Insulin-abhängigen Glukose-Transporters Glut4 in Präadipozyten (Kaestner et al. 1989; Garcia de Herreros und Birnbaum, 1989; Richardson und Pessin, 1993). Dadurch kann Glukose nicht oder nur in geringem Maße gespeichert werden und hat Auswirkungen auf die Fettsäure- und Glycerol-Synthese (Lipogenese) im Adipozyten. Eine bedeutende Rolle im Bereich der endokrinen Funktion des Fettgewebes spielt auch das in volldifferenzierten Adipozyten synthetisierte Adipozytokin Leptin. Leptin verfügt über ein breites Spektrum an parakrinen und endokrinen Funktionen, wie z. B. der Appetit-Regulation, der Modulation der Insulin-Sekretion von Leber und Fettgewebe sowie der Regulierung der Steroid-Produktion in den Ovarien und der Nebennierenrinde (Zhang et al., 1994). Ein Mangel an Leptin oder eine Leptinresistenz ist mit einer Lipidakkumulation außerhalb des Fettgewebes assoziiert (Koteish und Diehl, 2001; Wang et al., 2001). Zudem bringt eine geringe Leptinkonzentration im Blutkreislauf eine Zunahme des Appetits mit sich, was eine weitere Energiezufuhr durch Nahrungsaufnahme zur Folge hat. Diese zusätzliche Energiezufuhr sorgt für die Rekrutierung neuer Präadipozyten, welche wiederum nicht schnell genug zu reifen Adipozyten differenzieren und somit das vorhandene Leptindefizit indirekt verstärken. Es besteht somit ein verhängnisvoller Kreislauf aus Rekrutierung neuer Präadipozyten, die nicht schnell genug oder in ausreichendem Maße zu reifen Insulin-sensitiven Adipozyten differenzieren und folglich auf die metabolischen Notwendigkeiten im Fettgewebe wie z. B. Lipidspeicherung reagieren können, was

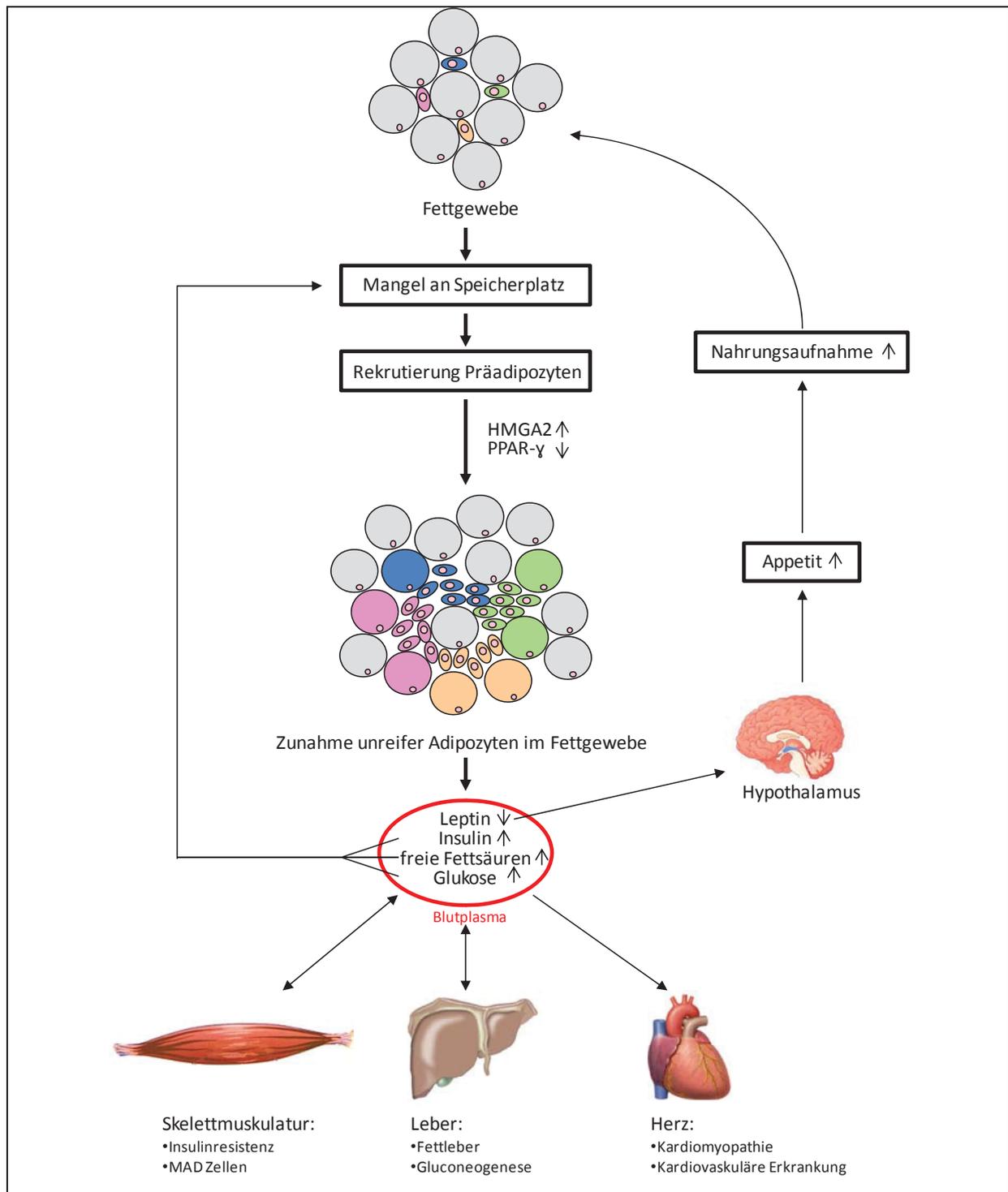


Abbildung 2: Auswirkung der Fettgewebsexpansion aufgrund der Zunahme unreifer Adipozyten. Durch hyperkalorische Ernährung können Nährstoffe nicht in vollem Umfange in den Adipozyten gespeichert werden. Es kommt zur Rekrutierung neuer Präadipozyten, die aber nicht zu reifen Insulin-sensitiven Adipozyten differenzieren. Die Präadipozyten sind nicht in der Lage ausreichend auf Insulin zu reagieren, sowie Fettsäuren und Glukose zu speichern, es kommt zu deren Akkumulation im Blutplasma. In den verschiedenen Organen wird versucht diesen Überschuss zu kompensieren, was über einen längeren Zeitraum aber zum Metabolischem Syndrom führt. Zudem können unreife Adipozyten kein Leptin produzieren, der sinkende Leptinspiegel im Blut sorgt im Hypothalamus für ein verstärktes Hungergefühl und hat die Aufnahme zusätzlicher Nahrung zur Folge.

letztendlich im Fettgewebe zu einer weiteren verstärkten Rekrutierung zusätzlicher Präadipozyten führt. Geschieht dies über einen längeren Zeitraum kann es unter anderem zu kardiovaskulären Erkrankungen, der Bildung einer Fettleber und Diabetes Typ II kommen (Abb. 2). Bei Mäusen, die einen Diabetes Typ II ähnlichen Phänotyp aufweisen, konnte bei einer exzessiven Kalorienaufnahme eine Zunahme von oxidativem Stress im Fettgewebe nachgewiesen werden (Minamino et al., 2009). Zudem konnte bei nichtdiabetischen Menschen eine Korrelation zwischen zunehmenden Fettgewebe und dem Anstieg des oxidativen Stresses gezeigt werden (Furukawa et al., 2004). Der Anstieg des oxidativen Stresses in *KK γ* -Mäusen, die an starker Fettleibigkeit, Hyperlipidämie und Insulinresistenz leiden, ist mit einer Dysregulation von Adipozytokinen und einer niedrigeren *Ppar- γ* -Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe verbunden. Die Dysregulation von Adipozytokinen ist an der Pathogenese des mit Übergewicht assoziierten metabolischen Syndroms beteiligt. Furukawa et al. beobachteten zudem, dass ein hoher Level von freien Fettsäuren in 3T3-L1 Zellen oxidativen Stress durch Aktivierung von NADPH Oxidasen induziert. Im weißen Fettgewebe von übergewichtigen *KK γ* -Mäusen konnte eine erhöhte Expression von *NADPH-Oxidasen*-mRNA festgestellt werden, damit einhergehend war die mRNA-Expression und die Enzymaktivität diverser Antioxidantien verringert (Furukawa et al., 2004). Die Zunahme von oxidativem Stress förderte Seneszenz-ähnliche Veränderungen im Fettgewebe, wie beispielsweise eine gesteigerte β -Galaktosidase-Aktivität, eine erhöhte *p53*-Expression und eine Zunahme der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Minamino et al., 2009). Zur Überprüfung, ob der mit der Fettgewebszunahme assoziierte oxidative Stress eine Seneszenz-ähnliche Veränderung im humanen weißen subkutanen Fettgewebe auslöst, wurde in dieser Arbeit das Fettgewebe auf die Expressionen der Seneszenz-assoziierten Gene *p14^{Arf}*, *CDKN1A* und des pro-apoptotischen *BAX*-Gens im Vergleich mit der des Stammzell-assoziierten *HMGA2*-Gens untersucht. Sowohl in MSCs als auch in uterinen Leiomyomen konnte bei einem *HMGA2*-Anstieg ebenso ein Anstieg der *p14^{Arf}*-Expression gezeigt werden (Markowski et al., 2011a). *p14^{Arf}* ist ein vorgelagerter Agonist von p53, welches mittels Apoptose- (Aktivierung von *BAX*) und Seneszenz-Pathway (über *CDKN1A*-Aktivierung) den Zellzyklus reguliert. Es zeigte sich in den untersuchten humanen Fettgeweben eine signifikante Korrelation aller vier Gene miteinander (Markowski et al., 2013). Dass die Aktivierung von *HMGA2* mittels Wachstumsfaktoren zu einem Anstieg der *p14^{Arf}*-Expression führt und entsprechend das nachgeschaltete p53-Target *CDKN1A* hochreguliert wird, bestätigten die an ADSCs *in vitro* gefundenen Erkenntnisse (Thies et al., 2012). Da der *HMGA2*-Anstieg im Fettgewebe auf die Aktivierung der MSCs und

Prädipozyten zurückzuführen ist, ist anzunehmen, dass diese Zellen sich der zellulären Seneszenz unterziehen. Seneszente Zellen sondern Moleküle, wie proinflammatorische Zytokine, in die Mikroumgebung ab (Campisi, 2005; Minamino und Komuro, 2007). Eine Anhäufung seneszenten Zellen löst vermutlich Entzündungsreaktionen im Fettgewebe aus, was letztendlich zu einer Insulinresistenz führt (Ahima, 2009; Minamino et al., 2009) und im Allgemeinen die Pathogenese des Übergewicht-assoziierten metabolischen Syndroms fördert. Der zeitgleiche Anstieg der Expression von *HMGGA2*, d.h. der Proliferation der MSCs und der Prädipozyten, und von *p14^{Arf}*, d.h. der Aktivierung des Seneszenz-Pathways, kann als Schutzmechanismus einer möglichen malignen Transformation mesenchymaler Stammzellen betrachtet werden (Markowski et al., 2011b). Dieser potentielle Schutzmechanismus verstärkt zusätzlich das Problem der Zunahme von unreifen Adipozyten in weißem Fettgewebe übergewichtiger Individuen. Die Zellen, die mittels Seneszenz aus dem Zellzyklus entfernt wurden, sind möglicherweise noch nicht zu reifen Insulin-sensitiven Adipozyten differenziert und somit nicht in der Lage u.a. freie Fettsäuren oder Glukose aus dem Plasma aufzunehmen und weiter zu prozessieren. Die Folge ist die Anhäufung von Fettsäuren in Form von Triglyzeriden in Leber, Herz, Nieren, Pankreas, Skelettmuskulatur oder Blutgefäßen (Koyama et al., 1997; Lee et al., 1994). Die Zellen in diesen Organen haben unter normalen Bedingungen nur einen kleinen Lipidvorrat um essentielle Funktionen wie die Aufrechterhaltung der Zellmembranstruktur und –fluidität u. Ä. zu gewährleisten. Wird die Zelle dann mit Triglyzeriden überladen, führt das zu einer Fehlfunktion der Zelle (Lipotoxizität) und zu einem Lipid-induzierten programmierten Zelltod (Lipoapoptose) (Slawik und Vidal-Puig, 2006). Interessanterweise kann die Akkumulation von Lipiden in Nicht-Fettgeweben nicht nur bei übergewichtigen Individuen, sondern auch während des Alterns bei schlanken Individuen, beobachtet werden (Petersen et al., 2003; Unger, 2005). Dies könnte der ursächliche Zusammenhang zwischen der Prävalenz von chronischen Erkrankungen wie Diabetes Typ II, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Fettleber, sowohl im Hinblick auf Übergewicht als auch auf das Altern sein.

Diabetes Typ II ist eine chronische Stoffwechselstörung, die gekennzeichnet ist durch Hyperglykämie, Insulinresistenz in unterschiedlicher Ausprägung und beeinträchtigter Insulinausschüttung. Im postprandialen Zustand stimuliert Insulin die Adipozyten dazu, Glukose und freie Fettsäuren aus dem Blutkreislauf aufzunehmen und diese als Triglyzeride zu speichern. Zudem inhibiert Insulin die Lipolyse, also die Freisetzung von Fettsäuren, in den Adipozyten (Gibson und Harris, 2002). Der genaue Mechanismus, der zur Entstehung und Progression der Diabetes Typ II Erkrankung führt ist noch nicht entschlüsselt. Es ist

jedoch bekannt, dass genetische Faktoren eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Diabetes einnehmen (O’Rahilly et al., 2005). Zu diesen genetischen Faktoren zählen SNPs im *HMGA2*-, *PPAR-γ*- und *CDKN2A*-Lokus (Ohshigo et al., 2011; Voight et al., 2010; Zeggini et al., 2007; Dayeh et al., 2013). Minamino et al. (2009) konnten im viszeralen Fettgewebe von Diabetikern eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität, ein erhöhtes Level an p53-Protein sowie an *CDKN1A*-mRNA, also verschiedene Seneszenz-assoziierte Veränderungen detektieren. In der vorliegenden Studie konnte diese Zunahme an seneszenten Zellen während der Expansion von weißem subkutanem Fettgewebe bestätigt werden. Daraufhin wurden nun Genexpressionsanalysen von *HMGA2* und *p14^{Arf}* an Fettgewebeproben von Diabetikern und Nicht-Diabetikern durchgeführt. Es zeigte sich, dass in subkutanem weißem Fettgewebe von Individuen mit Diabetes Typ II eine signifikant erhöhte Expression von *HMGA2* und *p14^{Arf}* zu beobachten ist (Markowski et al., 2013), wohingegen kein Unterschied bei der *PPAR-γ*-Expression zwischen den beiden Gruppen erkannt werden konnte (Thies et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Die signifikant höhere *p14^{Arf}*-Expression im Fettgewebe von Diabetikern kann durch einen SNP im *CDKN2A*-Lokus erklärt werden. Dayeh et al. (2013) konnten an humanen Pankreasinseln nachweisen, dass durch den Diabetes Typ II-assoziierten SNP im *CDKN2A*-Lokus eine ursprünglich vorhandene CpG-Insel wegfällt und somit die Methylierung in diesem Bereich aufgehoben wird. Auf diese Weise sind SNPs in der Lage Genfunktionen epigenetisch zu beeinflussen. In diesem Fall bewirkt der SNP im *CDKN2A*-Lokus über eine Demethylierung die Reaktivierung der Genexpression und führt daraus resultierend zu einer erhöhten *p14^{Arf}*-Expression. Ein SNP im Bereich des *HMGA2*-Lokus beeinflusst bei den umliegenden CpG-Inseln den Methylierungsstatus (Dayeh et al., 2013) und sorgt somit vermutlich dafür, dass das *HMGA2*-Gen transkribiert werden kann. Dies bedeutet, dass es in weißem subkutanem Fettgewebe von Diabetikern zur Rekrutierung neuer Präadipozyten kommt, um vermeintlich auf die gestiegenen Konzentrationen von Glukose und freien Fettsäuren im Blutkreislauf zu reagieren. Diese hohen Glukose- und Fettsäurekonzentrationen sind möglicherweise auf die Zunahme der Insulinresistenz des Fettgewebes zurückzuführen. Der Körper versucht den Mangel an Speicherplatz, aufgrund von Insulinresistenz und/oder mangelnder Insulinsensitivität unreifer Adipozyten, durch die Rekrutierung neuer Präadipozyten zu kompensieren. Differenzieren die neu rekrutierten Präadipozyten nun aufgrund eines *PPAR-γ*-Mangels nicht oder werden die Präadipozyten vorzeitig durch Seneszenz aus dem Zellzyklus herausgenommen, was durch die erhöhte *p14^{Arf}*-Expression vermutet werden kann, bleibt das Problem des Speicherplatzmangels bestehen. Die vorliegenden Ergebnisse stützen die Vermutung von Danforth (2000), dass eine

Erkrankung an Diabetes Typ II durch eine fehlerhafte Adipozytendifferenzierung hervorgerufen werden kann. Durch Gabe von oralen Antidiabetika, wie z. B. Thiazolidindione (TZD), verbessert sich der Zustand von Patienten mit Diabetes Typ II. PPAR- γ wurde als pharmakologisches Ziel von TZD identifiziert, PPAR- γ wird durch TZD aktiviert und sorgt u. a. für eine verbesserte Insulinsensitivität der Adipozyten und wirkt der Insulinresistenz entgegen (Harris und Kletzien, 1994; Lehmann et al., 1995). Eine neuere Studie konnte an Adipozyten von transgenen Mäusen, denen der nukleäre Rezeptor-Corepressor 1 (NCoR-1) fehlt, welcher die Aktivität von *PPAR- γ* negativ reguliert, zeigen, dass durch das Fehlen dieses Corepressors eine verstärkte Adipogenese, ein Rückgang von Entzündungsreaktionen und eine Verbesserung der Insulinsensitivität (Li et al., 2011) durch Translokation von GLUT4-Transportern an die Zelloberfläche zu beobachten ist. Interessanterweise zeigte sich in der Analyse der *HMG2A*-Expression mit Hilfe von Selbst-organisierenden Karten (SOM), dass nicht nur die Diabetiker-Gruppe eine signifikant höhere Expression aufweist, sondern auch eine Gruppe, die direkt an die Diabetiker-Gruppe angrenzt (Markowski et al., 2013). Dies lässt zwei Vermutungen zu: Zum Einen könnten die Individuen dieser Gruppe bereits an Diabetes Typ II erkrankt sein, ohne dass dies bisher diagnostiziert wurde. Rathmann et al. (2003) konnten in der KORA-Studie feststellen, dass knapp 50 % der untersuchten Probanden in einem auf orale Glukose-Toleranz untersuchten Patientenkollektiv an einem noch nicht diagnostizierten Diabetes Typ II leiden. Zum Anderen könnten die Individuen mit hoher *HMG2A*-Expression gerade im Begriff sein, eine Diabetes Typ II Erkrankung zu entwickeln. In diesem Fall wäre es denkbar, *HMG2A* als Biomarker einzusetzen, um eine mögliche gerade entstehende Diabetes Typ II Erkrankung im Vorhinein zu erkennen und gegebenenfalls frühzeitig zu behandeln. Denkbar wäre z. B. die Einhaltung einer strengen Diät in Kombination mit einem Sportprogramm, um eine negative metabolische Energiebilanz herzustellen, welche die Rekrutierung neuer Präadipozyten verhindert. Zeitgleich sollte die Differenzierung der Präadipozyten zu reifen Insulin-sensitiven Adipozyten kontrolliert und gegebenenfalls die Differenzierung mittels Gabe von TZD stimuliert werden. Ziel dieses Ansatzes wäre, die Expansion von subkutanem weißem Fettgewebe derart zu regulieren, dass keine Anhäufung von seneszenten Zellen stattfindet und somit eine Entzündungsreaktion ausbleibt, damit die Gefahr der Insulinresistenz für die Adipozyten gemindert wird. Bei stark übergewichtigen Patienten, die sich einer bariatrischen Chirurgie unterzogen haben, stellte sich neben einem großen Gewichtsverlust auch teilweise die Remission des Diabetes Typ II oder zumindest eine Verbesserung der Erkrankung ein (Brethauer et al., 2013). Es gilt als

nachgewiesen, dass die Regulation der Expansion von Fettgewebe einen positiven Einfluss auf eine mögliche Diabetes Typ II Erkrankung hat.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Einfluss von *HMGA2* auf die Hyperplasie von subkutanem weißem Fettgewebe und den Turnover von Adipozyten. Bei normalgewichtigen Individuen spiegelt die gemessene *HMGA2*-Expression den Turnover der Adipozyten, sprich das Ersetzen alter Adipozyten durch Rekrutierung neuer Prädipozyten, wider. Dahingegen führt die verstärkte *HMGA2*-Aktivierung bei übergewichtigen Individuen aufgrund erhöhter Kalorienaufnahme zu einer übermäßigen Proliferation von MSCs, ADSCs und Prädipozyten, was letztendlich zu einer Hyperplasie im Fettgewebe führt. Begleitet wird diese Hyperplasie mit der Abnahme der *PPAR-γ*-Expression bei zeitgleicher Zunahme des BMI sowie einer Zunahme von seneszenten Zellen. Das bedeutet, dass mit zunehmendem Körpergewicht auch die Anzahl unreifer Adipozyten zunimmt. Diese unreifen Adipozyten sind nur in geringem Umfang in der Lage, die metabolischen Anforderungen reifer Insulin-sensitiver Adipozyten zu erfüllen und stehen so im Zusammenhang mit der Entstehung des metabolischen Syndroms. In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhter *HMGA2*- und *p14^{Arf}*-Expression und der Diabetes Typ II Erkrankung gezeigt werden. Diese Erkenntnisse könnten *HMGA2* als Biomarker für ein frühzeitiges Erkennen einer möglichen Diabetes Typ II Erkrankung etablieren.

5 Zusammenfassung

Die weltweit zunehmende Verbreitung von Übergewicht und Adipositas stellt ein wachsendes Gesundheitsproblem dar. Vor allem Adipositas ist assoziiert mit kardiovaskulären Erkrankungen (Bogers et al., 2007), erhöhtem Risiko für Diabetes mellitus Typ II (Wang et al., 2005) und dem Risiko an bestimmten Krebsarten zu erkranken (Renehan et al., 2008). Die Zunahme von Fettgewebe im Körper, welches zu Übergewicht und Adipositas führen kann, basiert sowohl auf dem Anstieg der Anzahl der Adipozyten (Hyperplasie) als auch auf der Zunahme des Adipozytenvolumens (Hypertrophie). Während der Adipogenese reguliert eine Kaskade an Transkriptionsfaktoren den äußerst dynamischen Differenzierungsvorgang. Die molekularen Mechanismen zur Regulation der Genese von weißem Fettgewebe sind nur teilweise bekannt und ein Großteil der Erkenntnisse wurde an Mausmodellen bzw. in Zellkulturversuchen gewonnen.

In der vorliegenden Dissertation sollten die molekularen Mechanismen der Fettgewebs-Hyperplasie und des Adipozyten-Turnovers unter Beteiligung des *HMGA2*-Gens im Fettgewebe, in Lipomen sowie an ADSCs untersucht werden. Das *HMGA2*-Protein ist maßgeblich an einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie Zellproliferation und -differenzierung, beteiligt. Zudem spielt *HMGA2* eine tragende Rolle bei der Entstehung benigner Tumoren mesenchymalen Ursprungs, wie z. B. Lipomen und Myomen. Daher wurde zunächst eine mögliche *HMGA2*-Aktivierung in ADSCs, den Ursprungszellen von Fettgewebe und möglicherweise von Lipomen, untersucht. In ADSCs konnte mittels FGF1-Stimulierung eine temporäre *HMGA2*-Aktivierung induziert werden, die mit der Proliferation der ADSCs assoziiert war. Diese temporäre Aktivierung von *HMGA2* in ADSCs ähnelt der nachgewiesenen permanenten Aktivierung durch *HMGA2*-Rearrangierung in Lipomen. Zurückzuführen ist die *HMGA2*-Aktivierung in ADSCs und Lipomen auf deren gemeinsame Ursprungszelle, der mesenchymalen Stammzelle. Weitere Untersuchungen an humanem und caninem abdominalem subkutanem weißem Fettgeweben zeigten eine signifikant stärkere *HMGA2*-Expression bei übergewichtigen Individuen im Vergleich zu normalgewichtigen Individuen. Während die *HMGA2*-Expression bei normalgewichtigen Individuen den Turnover der Adipozyten widerspiegelt, deutet die signifikant höhere Expression bei Übergewichtigen auf eine Hyperplasie im subkutanen Fettgewebe hin. Da *PPAR-γ* ein bekannter Marker für die fortschreitende Adipogenese *in vivo* ist, wurde seine Expression im Fettgewebe ebenfalls analysiert. Die mit der *HMGA2*-Expression assoziierte Präadipozyten-

Proliferation, also die Hyperplasie des Fettgewebes, wurde begleitet von einer Abnahme der *PPAR-γ*-Expression und lässt eine antagonistische Beziehung beider Gene vermuten. Diese Ergebnisse belegen, dass es mit der Zunahme des Körpergewichts zu einer Hyperplasie von Präadipozyten kommt, die aber nicht oder nur kaum in der Lage sind zu reifen Insulin-sensitiven Adipozyten zu differenzieren. Zudem konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass mit dem Anstieg der *HMGA2*-Expression sowohl in subkutanem weißem Fettgewebe als auch in Lipomen und ADSCs eine Aktivierung der Seneszenz-assoziierten Gene *p14^{Arf}* und *CDKN1A* erfolgt. Die Akkumulation von seneszenten Zellen im Fettgewebe ist vermutlich an Entzündungsreaktionen im Fettgewebe beteiligt, die letztlich zur Insulinresistenz der Zellen führt (Ahima, 2009; Minamino et al., 2009). Unterstützt wird diese Theorie durch den Zusammenhang zwischen der signifikant verstärkten Expression von *HMGA2* und *p14^{Arf}* im Fettgewebe von Diabetes Typ II Erkrankten. Interessanterweise zeigte sich in der Analyse der *HMGA2*-Expression mit Hilfe von Selbst-organisierenden Karten, dass nicht nur die Diabetiker-Gruppe eine signifikant höhere Expression aufweist, sondern auch eine Gruppe die direkt an die Diabetiker-Gruppe angrenzt. Diese angrenzende Gruppe könnte an einem noch nicht diagnostizierten Diabetes Typ II leiden oder aber gerade eine Diabetes Typ II Erkrankung entwickeln. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse die bedeutende Rolle von *HMGA2* während der Adipogenese, bei der zellulären Fettgewebzusammensetzung und dessen möglichen Einfluss auf eine Diabetes Typ II Erkrankung. Daraus eröffnen sich neue Möglichkeiten für den Einsatz von *HMGA2* als Biomarker bei der Beurteilung einer Fehlentwicklung des subkutanen Fettgewebes und als möglicher Frühindikator einer beginnenden Diabetes Typ II Erkrankung.

6 Summary

The increasing dissemination of overweight and obesity poses a global health problem. Especially obesity is considered to be associated with cardiovascular diseases (Bogers et al., 2007), the risk of type II diabetes (Wang et al., 2005) and inducing of several types of cancer (Renehan et al., 2008). Adipose tissue expansion, which leads to overweight and obesity, is based on an increase in the number (hyperplasia) and volume (hypertrophy) of adipocytes. A cascade of transcription factors regulates the highly dynamic differentiation process during adipogenesis. These molecular mechanisms regulating adipogenesis are not completely understood yet. Additionally, it has to be highlighted that most findings attained thus far were generated by mouse models or in vitro studies.

This thesis analyzed the molecular mechanisms of adipocyte hyperplasia and turnover in adipose tissue, lipomas and ADSCs, focussing on *HMGA2* participation. *HMGA2* is considered to be a protein that is apparently linked to the process of proliferation and differentiation of cells. Additionally, *HMGA2* plays a major role in the development of benign tumors of mesenchymal origin, including lipomas and leiomyomas. Therefore a possible activation of *HMGA2* in ADSCs was investigated, representing the adipose tissues' as proposed lipomas' cells of origin. It could be observed that stimulation of ADSCs with growth factor FGF1 induced a temporary *HMGA2* response. This respective *HMGA2* response was linked with the proliferation of ADSCs. This temporary activation of *HMGA2* in ADSCs resembles the constitutive activation of *HMGA2* in lipomas. The *HMGA2* activation in both ADSCs and lipomas results from their shared cells' origin, i.e. the mesenchymal stem cell. Further investigation of human and canine abdominal subcutaneous white adipose tissue revealed a significantly higher expression of *HMGA2* in overweight individuals compared to those of normal weight. While the *HMGA2* expression in normal weight individuals reflects the turnover of adipocytes, the high significant *HMGA2* expression in overweight individuals points to hyperplasia of subcutaneous adipose tissue. Due to the fact that *PPAR-γ* can be considered as an essential regulator for adipogenesis in vivo, its expression in adipose tissue was analysed accordingly. The *HMGA2* expression, which is associated with the proliferation of preadipocytes thus hyperplasia of adipose tissue, is accompanied by a decrease of *PPAR-γ* expression. The inverse correlation observed between the expressions of the two genes suggests antagonistic roles of *HMGA2* and *PPAR-γ* regarding the differentiation of adipocytes and the proliferation of their progenitors, respectively. The results indicate that the gain of

body weight is due to hyperplasia of preadipocytes which are not or hardly able to differentiate to mature insulin-sensitive adipocytes. Furthermore, the increase of *HMGA2* expression in subcutaneous white adipose tissue, lipomas and ADSCs was accompanied by an activation of the senescence-associated genes *p14^{Arf}* and *CDKN1A*. An accumulation of senescent cells is known to trigger inflammation in adipose tissue which results in insulin resistance (Ahima 2009; Minamino et al., 2009). This theory was supported by the significant increase of *HMGA2* and *p14^{Arf}* expression in patients with type II diabetes. According to an analysis based on self-organizing maps, significantly increased expression of *HMGA2* is not exclusive to patients diagnosed with type II diabetes. These maps indicate another group of individuals close to the patients with known type II diabetes. This adjacent group of individuals may suffer from type II diabetes not being detected or this reflects the beginning of the development of type II diabetes. In summary, this thesis highlight the important role of *HMGA2* during adipogenesis, the cellular composition of adipose tissue and its possible influence on type II diabetes. Hence, new opportunities arise to establish *HMGA2* as a biomarker to evaluate adipose tissue dysplasia or as an early indicator to identify individuals at risk to become a diabetic patient.

7 Literaturverzeichnis

Ahima RS (2009) Connecting obesity, aging and diabetes. *Nat Med* 15:996-7

Ailhaud G, Grimaldi P, Négre R (1992) Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12:207-33

Anand A, Chada K (2000) In vivo modulation of Hmgic reduces obesity. *Nat Genet* 24:377-80

Arlotta P, Tai AK, Manfioletti G, Clifford C, Jay G, Ono SJ (2000) Transgenic mice expressing a truncated form of the high mobility group I-C protein develop adiposity and an abnormally high prevalence of lipomas. *J Biol Chem* 275:14394-400

Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, Morton CC, Chada K (1995) Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 82:57-65

Ashar HR, Tkachenko A, Shah P, Chada K (2003) HMGA2 is expressed in an allele-specific manner in human lipomas. *Cancer Genet Cytogenet* 143:160-8

Ayoubi TA, Jansen E, Meulemans SM, Van de Ven WJ (1999) Regulation of HMGIC expression: an architectural transcription factor involved in growth control and development. *Oncogene* 18:5076-87

Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM (1999) PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4:585-95

Bartuma H, Panagopoulos I, Collin A, Trombetta D, Domanski HA, Mandahl N, Mertens F (2009) Expression levels of HMGA2 in adipocytic tumors correlate with morphologic and cytogenetic subgroups. *Mol Cancer* 8:36

Battista S, Fidanza V, Fedele M, Klein-Szanto AJ, Outwater E, Brunner H, Santoro M, Croce CM, Fusco A (1999) The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res* 59:4793-7

Benson KF, Chada K (1994) Mini-mouse: phenotypic characterization of a transgenic insertional mutant allelic to pygmy. *Genet Res* 64:27-33

Bertrand HA, Masoro EJ, Yu BP (1978) Increasing adipocyte number as the basis for perirenal depot growth in adult rats. *Science* 201:1234-5

Björntorp P (1974) Effects of age, sex, and clinical conditions on adipose tissue cellularity in man. *Metabolism* 23:1091-102

Bogers RP, Bemelmans WJ, Hoogenveen RT, Boshuizen HC, Woodward M, Knekt P, van Dam RM, Hu FB, Visscher TL, Menotti A, Thorpe RJ Jr, Jamrozik K, Calling S, Strand BH, Shipley MJ (2007) Association of overweight with increased risk of coronary heart disease partly independent of blood pressure and cholesterol levels: a meta-analysis of 21 cohort studies including more than 300 000 persons. *Arch Intern Med* 167:1720–1728

Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436:660-5

Brethauer SA, Aminian A, Romero-Talamás H, Batayyah E, Mackey J, Kennedy L, Kashyap SR, Kirwan JP, Rogula T, Kroh M, Chand B, Schauer PR (2013) Can diabetes be surgically cured? Long-term metabolic effects of bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg* 258:628-36

Brook CG, Lloyd JK, Wolf OH (1972) Relation between age of onset of obesity and size and number of adipose cells. *Br Med J* 2:25-7

Burgess WH, Maciag T (1989) The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 58:575-606

Bustin M (1999) Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 19:5237-46

Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120:513-22

Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294:1866-70

Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436:725-30

Christy RJ, Yang VW, Ntambi JM, Geiman DE, Landschulz WH, Friedman AD, Nakabeppu Y, Kelly TJ, Lane MD (1989) Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes Dev* 3:1323-35

Cleynen I, Van de Ven WJ (2007) The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *Int J Oncol* 32:289-305

Danforth E Jr (2000) Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? *Nat Genet* 26:13

Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA (1998) The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 273:30057-60

Dayeh TA, Olsson AH, Volkov P, Almgren P, Rönn T, Ling C (2013) Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets. *Diabetologia* 56:1036-46

Di Agostino S, Fedele M, Chieffi P, Fusco A, Rossi P, Geremia R, Sette C (2004) Phosphorylation of high-mobility group protein A2 by Nek2 kinase during the first meiotic division in mouse spermatocytes. *Mol Biol Cell* 15:1224-32

DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R (1998) Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol* 274:R1460-7

El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR (1999) Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and C/EBPalpha. *J Biol Chem* 274:7946-51

Enerbäck S, Ohlsson BG, Samuelsson L, Bjursell G (1992) Characterization of the human lipoprotein lipase (LPL) promoter: evidence of two cis-regulatory regions, LP-alpha and LP-beta, of importance for the differentiation-linked induction of the LPL gene during adipogenesis. *Mol Cell Biol* 12:4622-33

Faust IM, Johnson PR, Hirsch J (1977) Adipose tissue regeneration following lipectomy. *Science* 197:391-3

Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J (1978) Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol* 235:E279-86

Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD (1994) Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev* 8:1654-63

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752-61

Garcia de Herreros A, Birnbaum MJ (1989) The acquisition of increased insulin-responsive hexose transport in 3T3-L1 adipocytes correlates with expression of a novel transporter gene. *J Biol Chem* 264:19994-9

Gattas GJ, Quade BJ, Nowak RA, Morton CC (1999) HMGIC expression in human adult and fetal tissues and in uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer* 25:316-22

Gibson DM, Harris RA (2002) *Metabolic Regulation in Mammals*. Taylor & Francis, London

Goodwin G (1998) The high mobility group protein, HMGI-C. *Int J Biochem Cell Biol* 30:761-6

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783-809

Häger A, Sjöström L, Arvidsson B, Björntorp P, Smith U (1977) Body fat and adipose tissue cellularity in infants: a longitudinal study. *Metabolism* 26:607-14

Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM (2001) Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7:729-41

Harris PK, Kletzien RF (1994) Localization of a pioglitazone response element in the adipocyte fatty acid-binding protein gene. *Mol Pharmacol* 45:439-45

Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ (2007) High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 6:5

Hellman B, Hellerstrom C (1961) Cell renewal in the white and brown fat tissue of the rat. *Acta Pathol Microbiol Scand* 51:347–353

Herberg L, Coleman DL (1977) Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. *Metabolism* 26:59-99

Hernandez TL, Kittelson JM, Law CK, Ketch LL, Stob NR, Lindstrom RC, Scherzinger A, Stamm ER, Eckel RH (2011) Fat redistribution following suction lipectomy: defense of body fat and patterns of restoration. *Obesity (Silver Spring)* 19:1388-95

Herrera R, Ro HS, Robinson GS, Xanthopoulos KG, Spiegelman BM (1989) A direct role for C/EBP and the AP-1-binding site in gene expression linked to adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 9:5331-9

Hirning-Folz U, Wilda M, Rippe V, Bullerdiel J, Hameister H (1998) The expression pattern of the Hmgic gene during development. *Genes Chromosomes Cancer* 23:350-7

Hirsch J, Batchelor B (1976) Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 5:299-311

Hirsch J, Han PW (1969) Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity. *J Lipid Res* 10:77-82

Hollenberg AN, Susulic VS, Madura JP, Zhang B, Moller DE, Tontonoz P, Sarraf P, Spiegelman BM, Lowell BB (1997) Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein- α and peroxisome proliferator-activated receptor- γ on the leptin promoter. *J Biol Chem* 272:5283-90

Hutley L, Shurety W, Newell F, McGeary R, Pelton N, Grant J, Herington A, Cameron D, Whitehead J, Prins J (2004) Fibroblast growth factor 1: a key regulator of human adipogenesis. *Diabetes* 53:3097-106

James WPT, Jackson-Leach R, Mhurchu CN, Kalamara E, Shayeghi M, Rigby NJ, Nishida C, Rodgers A (2004) Overweight and obesity (high body mass index). In: Ezaati M et al., eds. *Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attribution to selected major risk factors*. Vol.1. Geneva, World Health Organization 497-596

Kaestner KH, Christy RJ, McLenithan JC, Braiterman LT, Cornelius P, Pekala PH, Lane MD (1989) Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a

putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3150-4

Kiel MJ, Iwashita T, Yilmaz OH, Morrison SJ (2005) Spatial differences in hematopoiesis but not in stem cells indicate a lack of regional patterning in definitive hematopoietic stem cells. *Dev Biol* 283:29-39

Kirkland JL, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Han J, Karagiannides I (2002) Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD? *Exp Gerontol* 37:757-67

Klyde BJ, Hirsch J (1979) Increased cellular proliferation in adipose tissue of adult rats fed a high-fat diet. *J Lipid Res* 20:705-15

Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, Brown RE, Katz DP (1979) The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J Clin Invest* 63:239-46

Kohonen T (2001) *Self-Organizing Maps*. Third, extended edition. Springer Berlin, Heidelberg, New York

Koteish A, Diehl AM (2001) Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 21:89-104

Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger RH (1997) Tissue triglycerides, insulin resistance, and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am J Physiol* 273:E708-13

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T (1999) PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4:597-609

Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-6

Larson KA, Anderson DB (1978) The effects of lipectomy on remaining adipose tissue depots in the Sprague Dawley rat. *Growth* 42:469-77

Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH (1994) Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10878-82

Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, Kim W, Kim MM, Srikantan S, Martindale JL, Hutchison ER, Kim HH, Marasa BS, Selimyan R, Egan JM, Smith SR, Fried SK, Gorospe M (2011) miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol* 31:626-38

Lee YS, Dutta A (2007) The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 21:1025-30

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270:12953-6

Lehrke M, Lazar MA (2005) The many faces of PPARgamma. *Cell* 123:993-9

Lemonnier D (1972) Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *J Clin Invest* 51:2907-15

Li P, Fan W, Xu J, Lu M, Yamamoto H, Auwerx J, Sears DD, Talukdar S, Oh D, Chen A, Bandyopadhyay G, Scadeng M, Ofrecio JM, Nalbandian S, Olefsky JM (2011) Adipocyte NCoR knockout decreases PPAR γ phosphorylation and enhances PPAR γ activity and insulin sensitivity. *Cell* 147:815-26

Ligon AH, Moore SD, Parisi MA, Mealiffe ME, Harris DJ, Ferguson HL, Quade BJ, Morton CC (2005) Constitutional rearrangement of the architectural factor HMGA2: a novel human phenotype including overgrowth and lipomas. *Am J Hum Genet* 76:340-8

Lowe SW, Sherr CJ (2003) Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13:77-83

Lowell BB (1999) PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* 99:239-42

Markowski DN, Helmke BM, Meyer F, von Ahsen I, Nimzyk R, Nolte I, Bullerdiek J (2011b) BMP4 increases expression of HMGA2 in mesenchymal stem cells. *Cytokine* 56:811-6

Markowski DN, Thies HW, Gottlieb A, Wenk H, Wischnewsky M, Bullerdiek J (2013) HMGA2 expression in white adipose tissue linking cellular senescence with diabetes. *Genes Nutr* 8:449-56

- Markowski DN, von Ahsen I, Nezhad MH, Wosniok W, Helmke BM, Bullerdiek J** (2010) HMGA2 and the p19Arf-TP53-CDKN1A axis: a delicate balance in the growth of uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 49:661-8
- Markowski DN, Winter N, Meyer F, von Ahsen I, Wenk H, Nolte I, Bullerdiek J** (2011a) p14Arf acts as an antagonist of HMGA2 in senescence of mesenchymal stem cells-implications for benign tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 50: 489-98
- Marques BG, Hausman DB, Martin RJ** (1998) Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol* 275:R1898-908
- Mayr C, Hemann MT, Bartel DP** (2007) Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315:1576-9
- Mensink GB, Schienkiewitz A, Haftenberger M, Lampert T, Ziese T, Scheidt-Nave C** (2013) Übergewicht bei Erwachsenen in Deutschland aktuell und im Zeitverlauf. Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 56:786–794
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS** (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436:720-4
- Minamino T, Komuro I** (2007) Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res* 100:15-26
- Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I** (2009) A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* 15:1082-7
- Mooi WJ, Peeper DS** (2006) Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 355:1037-46
- Morrison RF, Farmer SR** (2000) Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 130:3116S-3121S
- Newell FS, Su H, Tornqvist H, Whitehead JP, Prins JB, Hutley LJ** (2006) Characterization of the transcriptional and functional effects of fibroblast growth factor-1 on human preadipocyte differentiation. *FASEB J* 20:2615-7

Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ (2008) Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135:227-39

Noro B, Licheri B, Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, Chau KY, Ono SJ, Giancotti V, Manfioletti G (2003) Molecular dissection of the architectural transcription factor HMGA2. *Biochemistry* 42:4569-77

Ohshige T, Iwata M, Omori S, Tanaka Y, Hirose H, Kaku K, Maegawa H, Watada H, Kashiwagi A, Kawamori R, Tobe K, Kadowaki T, Nakamura Y, Maeda S (2011) Association of new loci identified in European genome-wide association studies with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese. *PLoS One* 6:e26911

O'Rahilly S, Barroso I, Wareham NJ (2005) Genetic factors in type 2 diabetes: the end of the beginning? *Science* 307:370-3

Pasquali D, Pierantoni GM, Fusco A, Staibano S, Colantuoni V, De Bellis A, Bellastella A, Sinisi AA (2004) Fenofibrate increases the expression of high mobility group AT-hook 2 (HMGA2) gene and induces adipocyte differentiation of orbital fibroblasts from Graves' ophthalmopathy. *J Mol Endocrinol* 33:133-43

Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI (2003) Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300:1140-2

Petit MM, Mols R, Schoenmakers EF, Mandahl N, Van de Ven WJ (1996) LPP, the preferred fusion partner gene of HMGIC in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family. *Genomics* 36:118-29

Petit MM, Swarts S, Bridge JA, Van de Ven WJ (1998) Expression of reciprocal fusion transcripts of the HMGIC and LPP genes in parosteal lipoma. *Cancer Genet Cytogenet* 106:18-23

Petit MM, Schoenmakers EF, Huysmans C, Geurts JM, Mandahl N, Van de Ven WJ (1999) LHFP, a novel translocation partner gene of HMGIC in a lipoma, is a member of a new family of LHFP-like genes. *Genomics* 57:438-41

- Rathmann W, Haastert B, Icks A, Löwel H, Meisinger C, Holle R, Giani G** (2003) High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia* 46:182-9
- Reeves R** (2001) Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 277:63-81
- Reeves R, Beckerbauer L** (2001) HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* 1519:13-29
- Reichert M, Eick D** (1999) Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene* 18:459-66
- Renahan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M** (2008) Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371:569–578
- Reyne Y, Nougues J, Vezinhet A** (1983) Adipose tissue regeneration in 6-month-old and adult rabbits following lipectomy. *Proc Soc Exp Biol Med* 174:258-64
- Richardson JM, Pessin JE** (1993) Identification of a skeletal muscle-specific regulatory domain in the rat GLUT4/muscle-fat gene. *J Biol Chem* 268:21021-7
- Rigamonti A, Brennand K, Lau F, Cowan CA** (2011) Rapid cellular turnover in adipose tissue. *PLoS One* 6:e17637
- Rogalla P, Drechsler K, Frey G, Hennig Y, Helmke B, Bonk U, Bullerdiek J** (1996) HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am J Pathol* 149:775-9
- Ron D, Brasier AR, McGehee RE Jr, Habener JF** (1992) Tumor necrosis factor-induced reversal of adipocytic phenotype of 3T3-L1 cells is preceded by a loss of nuclear CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). *J Clin Invest* 89:223-33
- Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ** (1995) Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 10:436-44

Schwanbeck R, Manfioletti G, Wiśniewski JR (2000) Architecture of high mobility group protein I-C.DNA complex and its perturbation upon phosphorylation by Cdc2 kinase. *J Biol Chem* 275:1793-801

Sgarra R, Maurizio E, Zammitti S, Lo Sardo A, Giacotti V, Manfioletti G (2009) Macroscopic differences in HMGA oncoproteins post-translational modifications: C-terminal phosphorylation of HMGA2 affects its DNA binding properties. *J Proteome Res* 8:2978-89

Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS (1998) Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 12:3182-94

Slawik M, Vidal-Puig AJ (2006) Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing Res Rev* 5:144-64

Smas CM, Sul HS (1995) Control of adipocyte differentiation. *Biochem J.* 309:697-710

Solomon MJ, Strauss F, Varshavsky A (1986) A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A.T base pairs in duplex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1276-80

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783-7

Spiegelman BM, Flier JS (1996) Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87:377-89

Strawford A, Antelo F, Christiansen M, Hellerstein MK (2004) Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H₂O. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E577-88

Sutter NB, Ostrander EA (2004) Dog star rising: the canine genetic system. *Nat Rev Genet* 5:900-10

Tallini G, Dal Cin P, Rhoden KJ, Chiapetta G, Manfioletti G, Giacotti V, Fusco A, Van den Berghe H, Sciot R (1997) Expression of HMGI-C and HMGI(Y) in ordinary lipoma and

atypical lipomatous tumors: immunohistochemical reactivity correlates with karyotypic alterations. *Am J Pathol* 151:37-43

Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD, Graff JM (2008) White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322:583-6

Tessari MA, Gostissa M, Altamura S, Sgarra R, Rustighi A, Salvagno C, Caretti G, Imbriano C, Mantovani R, Del Sal G, Giancotti V, Manfioletti G (2003) Transcriptional activation of the cyclin A gene by the architectural transcription factor HMGA2. *Mol Cell Biol* 23:9104-16

Tchkonia T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL (2010) Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 9:667-84

Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonia T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD (2010) Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18226-31

Thies HW, Gottlieb A, Markowski DN, Wenk H, Wischnewsky M, Bullerdiek J Inverse correlation between *PPAR- γ* and *HMGA2* expression in white adipose tissue of overweight humans. *Nutrition & Metabolism*, zur Veröffentlichung eingereicht

Thies HW, Nolte I, Wenk H, Mertens F, Bullerdiek J, Markowski DN (2012) Permanent activation of HMGA2 in lipomas mimics its temporal physiological activation linked to the gain of adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* doi: 10.1002/oby.20137

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147-56

Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 13:4753-9

Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL (2008) A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 102:77-85

Unger RH (2005) Longevity, lipotoxicity and leptin: the adipocyte defense against feasting and famine. *Biochimie* 87:57-64

Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, Zeggini E, Huth C, Aulchenko YS, Thorleifsson G, McCulloch LJ, Ferreira T, Grallert H, Amin N, Wu G, Willer CJ, Raychaudhuri S, McCarroll SA, Langenberg C, Hofmann OM, Dupuis J, Qi L, Segrè AV, van Hoek M, Navarro P, Ardlie K, Balkau B et al (2010) Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet* 42:579-89

Wang ZW, Pan WT, Lee Y, Kakuma T, Zhou YT, Unger RH (2001) The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging. *FASEB J* 15:108-114

Wang Y, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB (2005) Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *Am J Clin Nutr* 81:555–563

WHO (1995) Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization

Wang T, Zhang X, Obijuru L, Laser J, Aris V, Lee P, Mittal K, Soteropoulos P, Wei JJ (2007) A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 46:336-47

Widberg CH, Newell FS, Bachmann AW, Ramnoruth SN, Spelta MC, Whitehead JP, Hutley LJ, Prins JB (2009) Fibroblast growth factor receptor 1 is a key regulator of early adipogenic events in human preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E121-31

Wu Z, Bucher NL, Farmer SR (1996) Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 16:4128-36

Yeh WC, Bierer BE, McKnight SL (1995a) Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11086-90

Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL (1995b) Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9:168-81

Yie J, Liang S, Merika M, Thanos D (1997) Intra- and intermolecular cooperative binding of high-mobility-group protein I(Y) to the beta-interferon promoter. *Mol Cell Biol* 17:3649-62

Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, Gronthos S (2008) Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Cell Physiol* 214:413-21

Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS; Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), McCarthy MI, Hattersley AT (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316:1336-41

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-32

Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K (1995) Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 376:771-4

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-28

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörn Bullerdiek für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas sowie für die wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Andreas Dotzauer bedanke ich mich ganz herzlich für die Begutachtung meiner Arbeit und die Übernahme des Koreferats.

Frau Prof. Dr. Ursula Dicke danke ich für ihre Bereitschaft am Prüfungsausschuss teilzunehmen.

Für die Bereitstellung von Probenmaterialien bedanke ich mich außerdem bei Prof. Dr. Heiner Wenk, Prof. Dr. Ingo Nolte und Prof. Dr. Fredrik Mertens. Bei Prof. Dr. Manfred Wischnewsky möchte ich mich für die ausgezeichnete und aufschlussreiche Hilfestellung im statistischen Bereich dieser Arbeit danken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Zentrums für Humangenetik, für ihre vielfältige wissenschaftliche und organisatorische Hilfe während der Durchführung dieser Arbeit.

Besonders danke ich Herrn PD Dr. Gazanfer Belge für die vielen Tipps im Bereich der Zellkultur und das Mut zuzusprechen in so manch schwieriger Stunde. Dr. Norbert Drieschner und Dr. Andreas Richter danke ich für ihre Geduld beim Beantworten zahlreicher Fragen rundum das „Sonden-Projekt“. Für ihre unschätzbare Hilfe im Labor danke ich herzlichst Frauke Meyer, Nadja Schwochow und Alisa Ivanov.

Für die Unmengen an Kaffee und Tee sowie die vielen (Fach-) Gespräche und vergnüglichen Stunden außerhalb des ZHG's danke ich Dr. Dominique N. Markowski, Frauke Meyer und Inga Flor.

Jörn Gieseler, Dr. Travis Meador und ganz besonders Dr. Dominique N. Markowski danke ich für das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit. Bei Stefan Keinitz bedanke ich mich für das stets offene Ohr und das Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit. Für die Bewirtung im „Le Findorff“ und die diversen Spieleabende dort bedanke ich mich bei Dr. Katharina Lutz und Marco Lutz. Es ist schön, dass es Euch in meinem Leben gibt.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Lotti und Jürgen Thies und meinen Geschwistern Silke Böttcher und Jochen Thies bedanken, die immer an mich geglaubt und mich auch in schweren Zeiten unterstützt haben. Vor allem meinem Vater danke ich für das stete Interesse an meiner Forschungsarbeit und den Ansporn immer weiter zu machen. Leider kannst Du mich nicht das letzte Stück des Weges begleiten.

Aus tiefstem Herzen bedanke ich mich bei Claudia Tödter für ihre unendliche Unterstützung, ihre Geduld und den ungeheuren Zusammenhalt in schwierigen Zeiten. Ohne Dich wäre ich nie soweit gekommen. Danke, dass Du immer für mich da bist.

9 Publikationsübersicht

In der folgenden Übersicht sind die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Publikationen in der Reihenfolge, in der sie im Ergebnisteil erscheinen, aufgeführt:

- I. **Thies HW, Nolte I, Wenk H, Mertens F, Bullerdiek J, Markowski DN (2012)** Permanent activation of HMGA2 in lipomas mimics its temporal physiological activation linked to the gain of adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* doi: 10.1002/oby.20137

Eigenanteil: Durchführung und Auswertung der Studie zusammen mit D.N. Markowski. Verfassen des Artikels zusammen mit D.N. Markowski und J. Bullerdiek.

- II. **Thies HW, Gottlieb A, Markowski DN, Wenk H, Wischnewsky M, Bullerdiek J** Inverse correlation between *PPAR- γ* and *HMGA2* expression in white adipose tissue of overweight humans. Zur Veröffentlichung eingereicht

Eigenanteil: Planung, Organisation, Durchführung und Auswertung der Studie mit Ausnahme der statistischen Auswertung. Verfassen des Artikels zusammen mit J. Bullerdiek.

- III. **Markowski DN, Thies HW, Gottlieb A, Wenk H, Wischnewsky M, Bullerdiek J (2013)** HMGA2 expression in white adipose tissue linking cellular senescence with diabetes. *Genes Nutr* 8:449-56

Eigenanteil: Planung, Organisation, Durchführung und Auswertung der Studie zusammen mit D.N. Markowski mit Ausnahme der statistischen Auswertung. Verfassen des Artikels zusammen mit D.N. Markowski und J. Bullerdiek.

Dominique N. Markowski und Helge W. Thies sind gleichberechtigte Erstautoren des Artikels.