

Untersuchungen zur Rolle der Hyaluronsäure im Fettgewebe im Kontext der Entstehung einer Adipositas und Insulinresistenz

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Katharina Maier (geb. Bayer)
aus Lich

Düsseldorf, März 2016

aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Mai 2016

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Adipositas und Metabolisches Syndrom.....	1
1.2 Weißes Fettgewebe	2
1.2.1 Abstammung und Differenzierung weißer Adipozyten	2
1.2.2 Expansion des weißen Fettgewebes.....	3
1.2.3 Die Rolle von Vaskularisierung und Hypoxie im weißen Fettgewebe	3
1.2.4 Rolle des weißen Fettgewebes für die Adipositas-assoziierte Insulinresistenz...4	
1.3 Braunes Fettgewebe	6
1.3.1 Abstammung und Differenzierung brauner Adipozyten.....	7
1.3.2 Zitterfreie Thermogenese	7
1.3.3 Vaskularisierung im braunen Fettgewebe	9
1.4 Rolle der extrazellulären Matrix im Fettgewebe	10
1.5 Hyaluronsäure	11
1.5.1 Struktur, Vorkommen und Synthese.....	11
1.5.2 Bindeproteine, Rezeptoren und Degradation	12
1.5.3 4-Methylumbelliferon, ein Inhibitor der HA-Synthese	14
1.5.4 Rolle der Hyaluronsäure im weißen Fettgewebe.....	15
1.6 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Zellversuche	18
2.1.1 Verwendete Substanzen für die Zellkultur.....	18
2.1.2 Verwendete Zellen.....	19
2.1.2.1 3T3-L1 Zellen	19
2.1.2.2 Präadipozyten aus dem braunen und weißen Fettgewebe	19
2.1.3 Differenzierung in Adipozyten.....	20
2.1.3.1 3T3-L1	20
2.1.3.2 Präadipozyten aus braunem Fettgewebe.....	21
2.1.3.3 Präadipozyten aus weißem Fettgewebe	21
2.1.4 Behandlungen mit 4-MU, HMW-HA und Hyaluronidase.....	21

Inhaltsverzeichnis

2.1.5	Ölrot O Färbung.....	21
2.1.6	HA-Bindeprotein Sandwich ELISA-ähnlicher Assay.....	22
2.1.7	Transfektion von siRNA in 3T3-L1 Zellen.....	22
2.2	Tierversuche.....	24
2.2.1	Verwendete Tiere	24
2.2.2	Fütterung und experimentelles Schema.....	26
2.2.3	NMR Messung.....	28
2.2.4	TSE Phenomaster	28
2.2.5	Glukose- und Insulintoleranztests	29
2.2.6	Entnahme und Aufbereitung der Proben	29
2.2.7	Histochemische Färbungen.....	30
2.2.7.1	Verwendete Antikörper und Bindeproteine.....	31
2.2.7.2	Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung.....	31
2.2.7.3	MAC2 Färbung	31
2.2.7.4	UCP-1 Färbung	32
2.2.7.5	Isolectin B4 Färbung.....	32
2.2.8	Analyse der Adipozytengröße	32
2.2.8.1	Adipozyten des epididymalen weißen Fettgewebes.....	33
2.2.8.2	Adipozyten des interskapularen braunen Fettgewebes.....	33
2.2.9	Herstellung und Analyse des Mäuseplasmas.....	33
2.3	Analyse der Genexpression	34
2.3.1	RNA-Isolation und cDNA-Synthese.....	34
2.3.2	Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	34
2.4	Statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Charakterisierung des HA-Systems während der adipogenen Differenzierung und der Entstehung von Adipositas.....	37
3.1.1	Veränderungen im HA-System während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen.....	37
3.1.2	Genexpression der Has und HA-Rezeptoren im Modell der Diät-induzierten Adipositas in C57BL/6J Mäusen.....	38
3.1.2.1	Genexpression im braunen interskapularen Fettgewebe	39
3.1.2.2	Genexpression im weißen epididymalen Fettgewebe	40
3.2	Inhibition der HA-Synthese und des HA- <i>Signalings in vitro</i>	40
3.2.1	Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU-Natriumsalz	40
3.2.2	Transfektion von siRNA in 3T3-L1 Zellen.....	42

Inhaltsverzeichnis

3.3	Effekt einer 4-MU-vermittelten Inhibition der HA-Synthese <i>in vivo</i>	43
3.3.1	Analyse der Gewichts- und Körperfettzunahme unter Behandlung mit 4-MU ...	44
3.3.2	Effekt von 4-MU auf die Glukose- und Insulintoleranz	45
3.3.3	Analyse der Hypertrophie und Inflammation im weißen Fettgewebe	46
3.3.4	Untersuchung der Lipidakkumulation der Leber sowie des basalen Energieumsatzes der Mäuse.....	49
3.3.5	Veränderungen im braunen Fettgewebe unter Behandlung mit 4-MU	50
3.3.6	Effekt der 4-MU Behandlung auf <i>Browning</i> und Vaskularisierung des weißen Fettgewebes	53
3.3.7	Plasma-Lipidprofil 4-MU-gefütterter Mäuse.....	54
3.4	Untersuchung von <i>Has2-knockout</i> Mäusen im Hinblick auf einen metabolischen Phänotyp	56
3.4.1	<i>Has2-knockout</i> Mäuse.....	56
3.4.1.1	Analyse der Gewichts- und Körperfettzunahme	56
3.4.1.2	Untersuchung der Glukose- und Insulintoleranz	57
3.4.1.3	Analyse der Hypertrophie und Inflammation im weißen Fettgewebe	58
3.4.1.4	Effekt des <i>Has2-Knockouts</i> auf den basalen Energieumsatz und die Funktion des braunen Fettgewebes	60
3.4.2	Adipozytenspezifische <i>Has2-knockout</i> Mäuse	61
3.4.2.1	Analyse der Gewichts- und Körperfettzunahme	62
3.4.2.2	Untersuchung der Glukose- und Insulintoleranz	63
3.4.2.3	Analyse der Hypertrophie und Inflammation in weißen Fettgewebe	64
3.4.2.4	Effekt des adipozytenspezifischen <i>Has2-Knockouts</i> auf den basalen Energieumsatz und die Funktion des braunen Fettgewebes	66
3.4.3	<i>HAS3-knockout</i> Mäuse.....	67
3.4.3.1	Analyse der Gewichts- und Körperfettzunahme	67
3.4.3.2	Untersuchung der Glukose- und Insulintoleranz	68
3.4.3.3	Analyse der Hypertrophie und Inflammation in weißen Fettgewebe	69
3.4.3.4	Effekt des <i>HAS3-Knockouts</i> auf den basalen Energieumsatz und die Funktion des braunen Fettgewebes	71
3.4.4	Adipozytenspezifische <i>HAS3-knockout</i> Mäuse	72
3.4.4.1	Analyse der Gewichts- und Körperfettzunahme	72
3.4.4.2	Analyse der Hypertrophie und Inflammation in weißen Fettgewebe	72
3.4.4.3	Effekt des adipozytenspezifischen <i>HAS3-Knockouts</i> auf die Morphologie des braunen Fettgewebes	74
4	Diskussion	75

Inhaltsverzeichnis

4.1	Veränderte HA-Matrix in der Differenzierung und Expansion des Fettgewebes	76
4.2	HA als kritischer Faktor in der Differenzierung von Adipozyten	78
4.3	Inhibition der Hypertrophie und Inflammation des weißen Fettgewebes und Verbesserung der Insulinresistenz durch Behandlung mit 4-MU	79
4.4	4-MU induziert eine Erhöhung des O ₂ -Verbrauchs über eine Aktivierung des braunen Fettgewebes.....	82
4.5	Effekt von 4-MU auf die Plasmalipidkonzentration	85
4.6	Metabolischer Phänotyp von Has- <i>knockout</i> Mäusen	86
4.7	Ausblick und Limitierung	91
5	Zusammenfassung	93
6	Summary.....	94
	Literaturverzeichnis	95
	Originalarbeiten.....	110
	Kongressbeiträge.....	111
	Posterpräsentationen	111
	Kurzvorträge	111
	Lebenslauf	112
	Danksagung.....	113
	Eidesstattliche Versicherung	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zugrundeliegende Mechanismen einer Adipositas-induzierten Insulinresistenz [52].	6
Abbildung 2: Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung durch UCP-1 im braunen Fettgewebe (modifiziert nach Collins, http://people.duke.edu/~sc9/research.html).	8
Abbildung 3: Strukturformel der Hyaluronsäure.	12
Abbildung 4: Signalwege und Effekte der HA-Rezeptoren auf Zell- und Gewebefunktionen [103].	13
Abbildung 5: Strukturformel von 4-Methylumbelliferon.	14
Abbildung 6: Differenzierungsprotokoll der 3T3-L1 Zellen.	20
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung der humanen HAS3- <i>knockout</i> Maus (modifiziert nach genOway, <i>Confidential Data 2009</i>).	25
Abbildung 8: Experimentelles Schema der C57BL/6J \pm 4-MU, HAS3- <i>knockout</i> und adipozytenspezifischen Has2- und HAS3- <i>knockout</i> Mäuse.	27
Abbildung 9: Experimentelles Schema der ubiquitären Has2- <i>knockout</i> Mäuse.	28
Abbildung 10: Veränderungen im HA-System während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen.	38
Abbildung 11: Induktion einer Adipositas und Insulinresistenz in C57BL/6J Mäusen nach Fütterung einer DD vs. Kontrolldiät.	39
Abbildung 12: Veränderungen der mRNA Expression HA-assoziiierter Gene im braunen Fettgewebe adipöser C57BL/6J Mäuse.	39
Abbildung 13: Veränderungen der mRNA Expression HA-assoziiierter Gene im weißen Fettgewebe adipöser C57BL/6J Mäuse.	40
Abbildung 14: Differenzierung isolierter Fettgewebs-Prädipozyten unter Behandlung mit 4-MU-Natriumsalz.	41
Abbildung 15: Behandlung mit 4-MU, HMW-HA und Hyaluronidase in 3T3-L1 Zellen.	42
Abbildung 16: Transfektion von siRNA in 3T3-L1 Zellen.	43
Abbildung 17: Körpergewicht, Körperfettmasse und Futteraufnahme von C57BL/6J Mäusen gefüttert mit DD \pm 4-MU.	45
Abbildung 18: Bestimmung der Glukose- und Insulintoleranz in C57BL/6J gefüttert mit DD \pm 4-MU.	46
Abbildung 19: Effekt der 4-MU Behandlung auf Hypertrophie und Inflammation im weißen Fettgewebe von DD-gefütterten C57BL/6J.	48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Lipidakkumulation in der Leber und basaler Energieumsatz von C57BL/6J Mäusen gefüttert mit DD \pm 4-MU.....	50
Abbildung 21: Effekt der 4-MU Behandlung auf Lipidakkumulation und Aktivität im braunen Fettgewebe.....	51
Abbildung 22: Vaskularisierung des braunen Fettgewebes und Kälte-induzierter Energieumsatz von C57BL/6J Mäusen gefüttert mit DD \pm 4-MU.	52
Abbildung 23: Analyse des Brownings und der Vaskularisierung im subkutanen Fettgewebe von C57BL/6J gefüttert mit DD \pm 4-MU.....	54
Abbildung 24: Analyse der Plasmalipide von C57BL/6J Mäusen nach 22 Wochen Fütterung mit DD \pm 4-MU.....	55
Abbildung 25: Körpergewicht, Körperfettmasse und Futteraufnahme von DD-gefütterten Has2- <i>knockout</i> vs. Rosa26CreER ^{T2+/-} Mäusen.....	57
Abbildung 26: Glukose- und Insulintoleranz in DD-gefütterten Has2- <i>knockout</i> vs. Rosa26CreER ^{T2+/-} Mäusen.	58
Abbildung 27: Hypertrophie und Inflammation im epididymalen Fettgewebe von Has2- <i>knockout</i> und Rosa26CreER ^{T2+/-} Mäusen gefüttert mit DD.....	59
Abbildung 28: Analyse des basalen Energieumsatzes sowie der Veränderungen im braunen Fettgewebe von Has2- <i>knockout</i> vs. Rosa26CreER ^{T2+/-} Mäusen.	61
Abbildung 29: Körpergewicht, Körperfettmasse und Futteraufnahme von DD-gefütterten adipozytenspezifischen Has2- <i>knockout</i> vs. Fabp4Cre Mäusen.....	63
Abbildung 30: Glukose- und Insulintoleranz in DD-gefütterten adipozytenspezifischen Has2- <i>knockout</i> vs. Fabp4Cre Mäusen.....	64
Abbildung 31: Hypertrophie und Inflammation im epididymalen Fettgewebe von adipozytenspezifischen Has2- <i>knockout</i> und Fabp4Cre Mäusen gefüttert mit DD.....	65
Abbildung 32: Analyse des basalen Energieumsatzes sowie der Veränderungen im braunen Fettgewebe von adipozytenspezifischen Has2- <i>knockout</i> vs. Fabp4Cre Mäusen.....	66
Abbildung 33: Körpergewicht, Körperfettmasse und Futteraufnahme von DD-gefütterten HAS3- <i>knockout</i> vs. Wildtyp Mäusen.	68
Abbildung 34: Glukose- und Insulintoleranz in DD-gefütterten HAS3- <i>knockout</i> vs. Wildtyp Mäusen.....	69
Abbildung 35: Hypertrophie und Inflammation im epididymalen Fettgewebe von HAS3- <i>knockout</i> und Wildtyp Mäusen gefüttert mit DD.....	70
Abbildung 36: Analyse des basalen Energieumsatzes sowie der Veränderungen im braunen Fettgewebe von HAS3- <i>knockout</i> vs. Wildtyp Mäusen.	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 37: Körpergewicht und Körperfettmasse von DD-gefütterten adipozytenspezifischen HAS3- <i>knockout</i> vs. Fabp4Cre Mäusen.....	72
Abbildung 38: Hypertrophie und Inflammation im epididymalen Fettgewebe von adipozytenspezifischen HAS3- <i>knockout</i> und Fabp4Cre Mäusen gefüttert mit DD.....	73
Abbildung 39: Analyse der Veränderungen im braunen Fettgewebe von adipozytenspezifischen HAS3- <i>knockout</i> vs. Fabp4Cre Mäusen.....	74
Abbildung 40: Schematische Übersicht der Effekte einer Hemmung der HA-Synthese im Fettgewebe.....	90

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Substanzen für die Zellkultur	18
Tabelle 2: Verwendete siRNA	23
Tabelle 3: Zusammensetzung der DD und Kontrolldiät.....	27
Tabelle 4: In der Histochemie verwendete Antikörper und Bindeproteine	31
Tabelle 5: Für die qPCR verwendete Primer und deren Sequenzen	35

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

18S rRNA	18S ribosomale Ribonukleinsäure
4-MU	4-Methylumbelliferon
ABC	ATP-bindende Kasette
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase Domain Protein</i>
Adrb1	β_1 -Adrenozeptor
Adrb3	β_3 -Adrenozeptor
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve
BMI	Körpermasseindex
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CEBP / Cebp	<i>CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine</i>
CIDE-A / Cidea	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor, α subunit-like effector A</i>
c-Src	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
d	day, Tag
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DD	Diabetogene Diät
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
EBF2	Früher B-Zell Faktor 2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ErbB	<i>Receptor tyrosine-protein kinase, epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
F4/80	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
Fabp4	Fettsäure Bindeprotein 4
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fetales Kälberserum
FFA	Freie Fettsäuren
Flp	Flippase
FRT	<i>Flippase recognition target</i>
h	hour, Stunde
HA	Hyaluronsäure
HARE	<i>Hyaluronan receptor for endocytosis</i>
HAS / Has	Hyaluronsäuresynthase
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1A / Hif-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HMW-HA	Hochmolekulare Hyaluronsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HYAL / Hyal	Hyaluronidase
IKK β	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase β</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgG	Immunglobulin G
IL / II	Interleukin

Abkürzungsverzeichnis

ipGTT	Intraperitonealer Glukosetoleranztest
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
ITT	Insulintoleranztest
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KG	Körpergewicht
LDL	Lipoprotein geringer Dichte
LMW-HA	Niedermolekulare Hyaluronsäure
loxP	<i>Locus of X-over P1</i>
LYVE-1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
M	mol/l
MAC2	Galektin-3 (Lgals3)
MCP-1 / Mcp-1	Monozyten chemotaktisches Protein 1
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
Myf5	Myogener Faktor 3
NfκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMR	Kernspinresonanz
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Plättchen-stämmiger Wachstumsfaktor
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PGC-1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
Ppary	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptorer γ
PRDM16	<i>PR domain containing 16</i>
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
RAF	<i>Rat fibrosarcoma</i> Protein
RAS	<i>Rat sarcoma</i> Protein
RHAMM	<i>Receptor for hyaluronan mediated motility</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAA3	Serum Amyloid A3
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
si	<i>small interfering</i>
SVF	Stromal-vaskuläre Fraktion
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
T3	3,3',5-Triodo-L-thyronin
TE	Trypsin EDTA
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF-α / Tnf-α	Tumornekrosefaktor α
TSG-6	<i>TNF-stimulated gene 6 protein</i>
U	Einheiten
UCP-1 / Ucp-1	Entkopplungsprotein 1
UDP	Uridindiphosphat
UGDH	UDP-Glukose-Dehydrogenase
UGPP	UDP-Glukose-Pyrophosphorylase
UGT	UDP-Glukuronosyltransferase
V	Volumen
VEGF-A / Vegf-α	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
VLDL	Lipoprotein sehr geringer Dichte
w	Woche

Abkürzungsverzeichnis

WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
×g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Adipositas und Metabolisches Syndrom

Übergewicht und Adipositas sind bedeutende Risikofaktoren für das Auftreten zahlreicher Folgeerkrankungen, darunter Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM), kardiovaskuläre Erkrankungen sowie bestimmte Tumore (z.B. Brust- oder Darmtumore). Das zeitgleiche Vorliegen einer arteriellen Hypertonie, einer Lipidstoffwechselstörung und einer Insulinresistenz in Kombination mit einer Adipositas definiert das sogenannte Metabolische Syndrom, welches nachweislich durch eine hohe kardiovaskuläre Mortalität gekennzeichnet ist [1-3]. Übergewicht wird definiert durch einen Körpermasseindex (BMI) größer als 25 kg/m². Von einer Adipositas spricht man ab einem BMI von 30 kg/m², wobei hier eine Unterteilung in drei Schweregrade erfolgt: Die Adipositas Grad I liegt vor bei einem BMI von 30 – 34,9 kg/m², Adipositas Grad II bei einem BMI von 35 – 39,9 kg/m² und Adipositas Grad III, auch morbide Adipositas genannt, ist definiert durch einen BMI ab 40 kg/m². Mit steigendem BMI steigt infolge einer Vermehrung der Körperfettmasse auch das Risiko für die Entstehung der genannten Folgeerkrankungen sowie die Adipositas-assoziierte Mortalität [4-7]. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat sich die weltweite Prävalenz der Adipositas seit 1980 mehr als verdoppelt. So wurden im Jahr 2014 weltweit 39% der über 18-jährigen Erwachsenen als übergewichtig klassifiziert, 13% der Erwachsenen waren adipös. In Deutschland waren laut statistischem Bundesamt im Jahr 2013 sogar 52% der erwachsenen Bevölkerung übergewichtig und 16% adipös. Aktuelle Prognosen für die nächsten Jahrzehnte sagen eine weitere Zunahme der Adipositas-Prävalenz, verbunden mit immensen Kosten für das Gesundheitssystem, voraus [8].

Übergewicht und Adipositas entstehen durch ein Ungleichgewicht aus Energieaufnahme und Energieverbrauch, oftmals als Resultat aus einem übermäßigen Konsum hochkalorischer Nahrungsmittel und zu wenig Bewegung. Dieses Ungleichgewicht wird besonders in der heutigen Zeit durch sozio-kulturelle Faktoren wie sitzende Berufstätigkeiten, passive Freizeitaktivitäten (z.B. Computer, Fernsehen) und unregelmäßige, ungesunde („Fastfood“) Mahlzeiten begünstigt.

Die Behandlung der Adipositas hat stets eine Reduktion des Körpergewichts zum Ziel. Neben der erforderlichen Veränderung des Ess- und Bewegungsverhaltens der Patienten gab es in der Vergangenheit diverse Ansätze, einer Adipositas mit Hilfe einer unterstützenden pharmakologischen Therapie entgegenzuwirken. Arzneistoffe wie Rimonabant, ein Cannabinod-Rezeptorantagonist, und Sibutramin, ein indirektes Sympathomimetikum, sollten

Einleitung

durch Appetitminderung zu einer Gewichtsreduktion führen. Aufgrund schwerwiegender unerwünschter Arzneimittelwirkungen [9, 10] wurde für die Präparate jedoch ein Ruhen der Zulassung seitens der Europäischen Arzneimittelagentur angeordnet. Als einzig verbliebenes Arzneimittel für die Behandlung der Adipositas ist in Deutschland der Lipase-Hemmstoff Orlistat, welcher zu einer verringerten Fettresorption aus dem Darm, allerdings dadurch bedingt auch zum Auftreten unangenehmer Fettstühle führt, zugelassen. Infolgedessen steht die Aufdeckung innovativer *Targets* für die Prävention und Therapie einer Adipositas weiterhin im Fokus des Forschungsinteresses.

1.2 Weißes Fettgewebe

Die Entstehung der Adipositas ist gekennzeichnet durch eine starke Zunahme der Körperfettmasse. Hieran ist hauptsächlich das weiße Fettgewebe, welches als Speicherorgan für überschüssige aufgenommene Energie dient, beteiligt. Besonders die Expansion des viszeralen weißen Fettgewebes steht in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für metabolische Folgeerkrankungen [11-13]. Das weiße Fettgewebe besteht größtenteils aus den lipidspeichernden, univakuolären weißen Adipozyten. Zu einem geringeren Anteil finden sich in der stromal-vaskulären Fraktion auch Fibroblasten, Präadipozyten, Endothelzellen und Immunzellen. Im Folgenden soll sowohl auf die Entstehung weißer Adipozyten als auch die pathologischen Veränderungen des weißen Fettgewebes im Rahmen der Adipositas eingegangen werden.

1.2.1 Abstammung und Differenzierung weißer Adipozyten

Präadipozyten des weißen Fettgewebes stammen von adipogenen Myf5-negativen Progenitorzellen ab, die aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen entstehen [14]. Die Differenzierung von Präadipozyten in ausgereifte weiße Adipozyten wurde *in vitro* mit Hilfe präadipozytärer Zelllinien (z.B. 3T3-L1 Zellen) extensiv untersucht [15-18]. Initial erfordert die Adipogenese *in vitro* einen Wachstumsarrest, welcher durch Konfluenz der Zellen ausgelöst wird. Durch Zugabe differenzierungsfördernder Substanzen findet im Anschluss die sogenannte „klonale Expansion“ statt, die durch DNA Replikation im Rahmen von ein bis zwei weiteren mitotischen Zellteilungen gekennzeichnet und unerlässlich für die adipogene Differenzierung ist [19]. Zeitgleich wird die Expression der frühen Differenzierungsmarker *Cebp/β* sowie *Cebp/δ* induziert. An diese Phase schließt sich ein sekundärer, endgültiger Wachstumsarrest der Zellen in der G₀ Phase des Zellzyklus an [20]. Außerdem wird nun die Expression von *Pparγ* und *Cebp/α* induziert, welche für die nachfolgende adipogene

Einleitung

Transkriptionskaskade notwendig ist. In der Folge kommt es zur terminalen Differenzierung der weißen Adipozyten, erkennbar an dem vermehrten Auftreten intrazellulärer Lipidtropfen sowie der Expression terminaler Differenzierungsmarker wie *Leptin*, *Adiponectin* und *Fabp4*.

1.2.2 Expansion des weißen Fettgewebes

Das weiße Fettgewebe besitzt die Fähigkeit, sich rasch und effizient an Unterschiede in der Nährstoffversorgung anzupassen. Evolutionär bedingt dienen die im Fettgewebe gespeicherten Lipide als Energielieferant und sollen so ein Überleben in Phasen des Hungerns und einem damit verbundenen Nährstoffmangel sicherstellen. Im Gegenzug reagiert das weiße Fettgewebe im Falle des Auftretens einer positiven Energiebilanz, z.B. durch Überernährung, mit einer Expansion bzw. vermehrten Energiespeicherung in Form von Triglyzeriden. Dieser Mechanismus begünstigt die Entstehung metabolischer Erkrankungen. Im Rahmen der Expansion des Fettgewebes kommt es sowohl zur Hyperplasie als auch Hypertrophie weißer Adipozyten [21, 22], wobei in Mäusen auf fettreicher Diät gezeigt werden konnte, dass primär hauptsächlich eine Hypertrophie auftritt, auf welche etwa einen Monat später eine Hyperplasie folgt [23]. Wie beschrieben wurde, korreliert insbesondere die Hypertrophie weißer Adipozyten mit dem Auftreten einer Insulinresistenz und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines T2DM [24, 25]. Im Gegenzug kommt es durch hyperplastische Vorgänge, wie durch Proliferation und Differenzierung von Präadipozyten in zahlreiche kleine Adipozyten, zu einer gesunden Expansion des weißen Fettgewebes. Dies ist mit einem geringeren Risiko metabolischer Folgeerkrankungen verbunden [26].

1.2.3 Die Rolle von Vaskularisierung und Hypoxie im weißen Fettgewebe

Eine ausreichende Vaskularisierung spielt eine entscheidende Rolle für Wachstum und Funktion aller Gewebe und Organe, da über diese die Versorgung mit Sauerstoff, Nährstoffen, aber auch Hormonen und Wachstumsfaktoren sichergestellt wird. Die im Vergleich zu anderen Organen nahezu einzigartige Expansionsfähigkeit des Fettgewebes geht auch mit einem hohen angiogenen Potenzial einher, denn ein gesundes Wachstum von Gewebe erfordert stets einen simultanen Ausbau des umgebenden vaskulären Netzwerkes. Demzufolge wird auch die im Rahmen einer fettreichen Diät beobachtete Expansion des weißen Fettgewebes von einer verstärkten Angiogenese begleitet [27, 28]. Hierfür werden zwei verschiedene Mechanismen postuliert [29]. So könnte zum einen die gesteigerte Kalorienaufnahme zu einer krankhaften Hypertrophie des Fettgewebes führen, wodurch eine Hypoxie ausgelöst wird [30-32], die schließlich – ähnlich wie im Bereich des Tumorstwachstums beschrieben – eine Angiogenese induziert. Zum anderen könnte es durch die vermehrte Kalorienzufuhr zur Auslösung metabolischer Signale kommen (z.B. über Insulin-vermittelte Signalwege [33, 34]),

Einleitung

die eine Angiogenese auslösen und erst hierauf die Entstehung einer Hypertrophie folgt – eine Hypoxie wird in diesem Fall vermieden.

Eine tragende Rolle für pro-angiogene Prozesse spielt der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGF-A), dessen Expression beispielsweise durch Hypoxie- oder Insulin-vermittelte Signale induziert wird. In Verbindung mit Adipozyten konnte bereits gezeigt werden, dass eine Blockade des VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) sowohl die Angiogenese als auch die Differenzierung von Präadipozyten hemmt [35]. Der *Knockout* von *Vegf- α* im Mausmodell führt zu vermehrter Inflammation des Fettgewebes und gesteigerter Insulinresistenz, wohingegen eine Überexpression von *Vegf- α* im Fettgewebe die Vaskularisierung verstärkt und zeitgleich die Inflammation im Fettgewebe sowie eine durch fettreiche Diät induzierte Insulinresistenz vermindert [36]. In humanen Studien konnte weiterhin demonstriert werden, dass adipöse, insulinsensitive Patienten eine höhere Expression von *VEGF-A* im weißen Fettgewebe aufweisen als adipöse, insulinresistente Patienten [37]. Zusammenfassend wird angenommen, dass eine insuffiziente Angiogenese im Rahmen einer fettreichen Diät zu einer Hypoxie und der Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 α (HIF-1A) führt, was schließlich eine Inflammation und Dysfunktion des Fettgewebes bewirkt. So konnte zum Beispiel durch eine Überexpression von *Hif-1 α* im Fettgewebe von Mäusen keine pro-angiogene Antwort beobachtet werden, vielmehr kam es zur Induktion von Fibrose und Inflammation [38]. Im Gegenzug führte ein *Knockout* von *Hif-1 α* im Fettgewebe zu einer Reduktion der Fettmasse und erhöhter Insulinsensitivität [39].

1.2.4 Rolle des weißen Fettgewebes für die Adipositas-assoziierte Insulinresistenz

Das weiße Fettgewebe hat neben der Aufgabe der Lipidspeicherung auch eine wichtige Funktion als endokrines, sekretorisches Organ. Beispielsweise ist das hauptsächlich aus reifen Adipozyten freigesetzte Proteohormon Leptin maßgeblich an der Regulation des Hungergefühls beteiligt. Im Rahmen einer Adipositas wird bedingt durch die Hypertrophie im Fettgewebe ein Status chronischer Inflammation ausgelöst, gekennzeichnet durch einen Anstieg der inflammatorischen Genexpression (z.B. *A Disintegrin And Metalloproteinase Domain Protein 8* (ADAM8), Monozyten chemotaktisches Protein 1 (MCP-1), *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1* (F4/80), *Cluster of differentiation 68* (CD68)) sowie einer starken Makrophagen-Akkumulation [40, 41]. Aus dem Fettgewebe werden schließlich Zytokine wie Interleukin 6 (IL-6), MCP-1 und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) in den systemischen Blutkreislauf abgegeben. Studien zu IL-6 bei Adipositas konnten zeigen, dass 30% des im Plasma gemessenen IL-6 aus der erhöhten Expression und

Einleitung

Freisetzung aus dem weißen Fettgewebe stammt und die Plasmakonzentration positiv mit dem Auftreten einer Insulinresistenz korreliert [42, 43]. Auch für eine erhöhte Sekretion von TNF- α und MCP-1 konnte ein kausaler Zusammenhang zur Entstehung einer Insulinresistenz nachgewiesen werden [41, 44, 45]. Bei langfristig bestehender Adipositas werden Makrophagen als Hauptquelle der inflammatorischen Zytokine im Fettgewebe gehandelt. Auf der anderen Seite konnte kürzlich gezeigt werden, dass adipozytäre Progenitorzellen im Fettgewebe bereits zu Beginn einer entstehenden Adipositas für eine verstärkte Produktion von MCP-1 sorgen, wodurch Monozyten angelockt werden, die schließlich in Makrophagen differenzieren [46]. Für die Invasion von Makrophagen in das weiße Fettgewebe werden zudem weitere Mechanismen diskutiert. So könnten diese z.B. durch das Hypertrophie- und Hypoxie-bedingte Absterben von Adipozyten zur Phagozytose [47] oder den gesteigerten Fluss freier Fettsäuren (*free fatty acids*, FFA) angelockt werden.

Besonders den FFA wird in der Entstehung der Insulinresistenz eine tragende Rolle zugesprochen [48]. Im Rahmen der Adipositas kommt es durch die starke Expansion des Fettgewebes zu einer gesteigerten Freisetzung von FFA [49, 50]. Als Signalmoleküle, z.B. als Liganden der *Toll-like*-Rezeptoren TLR2 oder TLR4, tragen FFA zur Inflammation und Inhibition des Insulin-Signalwegs in peripheren Geweben wie Muskel und Leber, aber auch im Fettgewebe selbst bei. Dies erfolgt über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), des JNK oder IKK β Signalwegs, wodurch eine inhibitorische Serin-Phosphorylierung der Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS) und damit eine Hemmung Insulin-vermittelter Signale erfolgt. Auf Ebene des Fettgewebes kann es zu einem *Circulus vitiosus* kommen: FFA lösen eine Insulinresistenz in Adipozyten aus, wodurch die lipolysehemmende Wirkung des Insulins aufgehoben wird und verstärkt weiter FFA in die Zirkulation abgegeben werden.

Auch die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) durch eine gesteigerte β -Oxidation der FFA oder Endoplasmatisches Retikulum (ER)-Stress spielen vermutlich eine Rolle. Der Anteil an FFA, der in periphere Gewebe aufgenommen und nicht über β -Oxidation abgebaut wird, kann zu Triglyzeriden reverestert werden und im Gewebe akkumulieren. Es kommt somit zu einer ektopen Fettspeicherung in Muskel und Leber [51]. Dies kann wiederum einen Funktionsverlust des Gewebes zusammen mit einer verminderten Insulinsensitivität hervorrufen (s. Abbildung 1).

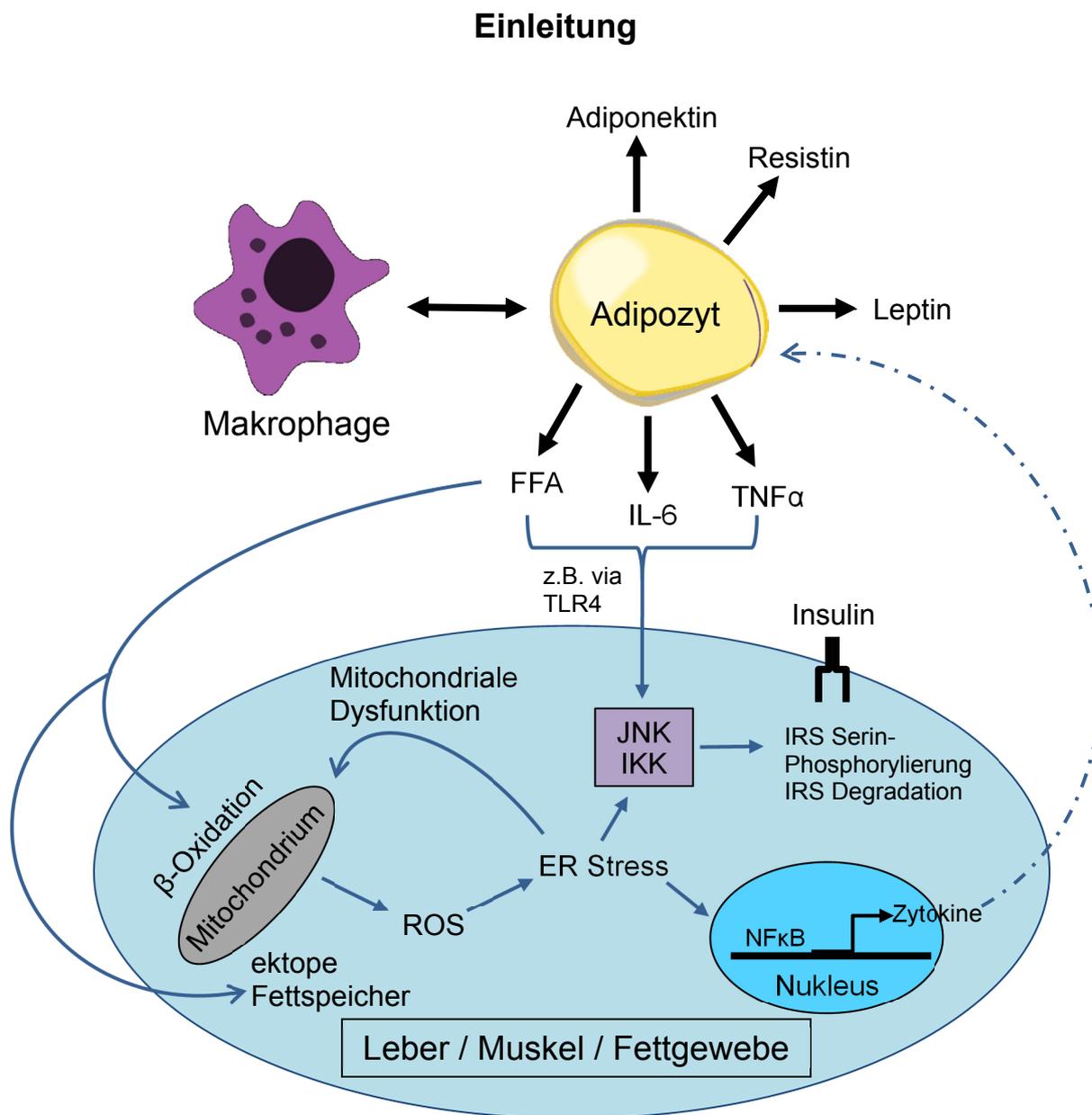


Abbildung 1: Zugrundeliegende Mechanismen einer Adipositas-induzierten Insulinresistenz [52].

1.3 Braunes Fettgewebe

Anders als die weißen Adipozyten, welche eine univakuoläre Morphologie aufweisen, sind braune Adipozyten multivakuolär und besonders reich an Mitochondrien. Der hohe Gehalt an Mitochondrien bedingt die bräunliche Erscheinung des Fettgewebes. Zusätzlich zeichnet sich das braune Fettgewebe durch eine starke Innervation und Vaskularisierung aus. Braunes Fettgewebe ist in der Lage, Energie über den Prozess der zitterfreien Thermogenese in Wärme umzuwandeln. Bei Nagern finden sich braune Fettdepots vor allem in interskapularen, aber auch axillären und periaortalen Bereichen. Lange Zeit wurde angenommen, dass dieses spezialisierte Fettgewebe beim Menschen nur in Neugeborenen vorkommt und daher im Alter

Einleitung

keine Rolle mehr spielt. Jedoch konnten verschiedene Studien der letzten Jahre vermehrt metabolisch aktives braunes Fettgewebe in supraklavikulären Bereichen sowie im Nackenraum bei Erwachsenen nachweisen [53-56]. Aufgrund der Fähigkeit zur zitterfreien Thermogenese (s. 1.3.2) stellt das braune Fettgewebe für die Behandlung der Adipositas und Insulinresistenz ein innovatives und vielversprechendes Target dar.

1.3.1 Abstammung und Differenzierung brauner Adipozyten

Im Gegensatz zum weißen Fettgewebe entwickeln sich Präadipozyten des braunen Fettgewebes aus der myogenen Linie Myf5-positiver Progenitorzellen. Prinzipiell sind in die Differenzierung brauner Fettzellen die gleichen Transkriptionsfaktoren involviert wie bei der Differenzierung weißer Fettzellen, wobei CEBP/β im braunen Fettgewebe deutlich stärker exprimiert wird als im weißen Fettgewebe [57]. Die Entstehung eines braunen Adipozyten scheint neben dem Progenitorzelltyp durch die Beteiligung von spezifischen Koaktivatoren determiniert zu werden. Zum Beispiel sorgt der Koaktivator EBF2 zusammen mit PPARγ für die Expression von PRDM16, welches die Differenzierung zu einem braunen Adipozyten maßgeblich bestimmt [58]. Auch der PPARγ Koaktivator PGC-1α wird als wichtiger Faktor für die Aktivierung von braunen Adipozyten beschrieben. Ausgereifte braune Adipozyten weisen ein spezifisches Expressionsprofil auf, welches die Aktivierungsmarker *UCP-1*, *CIDE-A* und *PGC-1α* beinhaltet [59].

Neben dem klassischen braunen Fettgewebe können braune Adipozyten auch in Form von Nestern im weißen Fettgewebe auftreten. Man bezeichnet den zugrunde liegenden Vorgang als „*Browning*“ und die Zellen aufgrund ihrer von braunen Adipozyten teilweise abweichenden Charakteristik als beigefarbene Adipozyten [60]. Hierbei wurde lange Zeit diskutiert, ob ein *Browning* durch Transdifferenzierung bestehender weißer Adipozyten oder aber durch neue Differenzierung von Progenitorzellen zustande kommt. Zuletzt konnte eine Studie den Nachweis erbringen, dass beigefarbene Adipozyten im weißen Fettgewebe hauptsächlich infolge einer Differenzierung von Myf5-negativen Progenitorzellen entstehen [23]. Sowohl die Aktivierung brauner als auch beigefarbener Adipozyten kann über eine Steigerung der Thermogenese zu einer verbesserten metabolischen Gesundheit führen [59].

1.3.2 Zitterfreie Thermogenese

Das braune Fettgewebe ist an der Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur beteiligt und weist hierzu einen besonderen Mechanismus der Thermoregulation auf: die zitterfreie Thermogenese. Hierbei wird gespeicherte oder direkt aus der Nahrung gewonnene Energie (Kohlenhydrate oder Fettsäuren) zur Generierung von Wärme genutzt. Klassischerweise führt eine Kälteexposition zur Aktivierung der zitterfreien Thermogenese.

Einleitung

Bekannt ist allerdings auch, dass Überernährung bzw. eine gesteigerte Kalorienaufnahme Auslöser für Thermogenese sein können („Diät-induzierte Thermogenese“). Physiologisch erfolgt die Aktivierung der zitterfreien Thermogenese durch eine Stimulation des Sympathikus, wodurch Noradrenalin freigesetzt wird, welches insbesondere über β 3-adrenerge Rezeptoren eine Lipolyse in braunen Adipozyten induziert. Die aus der Lipolyse freigesetzten FFA werden über β -Oxidation weiter abgebaut. Daraufhin entsteht während der Atmungskette im Mitochondrium ein Protonengradient, der nicht zur Gewinnung von Energie in Form von ATP (oxidative Phosphorylierung) genutzt wird, sondern der direkten Transformation in Wärme dient. An diesem Prozess ist das für das braune Fettgewebe spezifische mitochondriale Transmembranprotein UCP-1, auch Thermogenin genannt, entscheidend beteiligt. Protonen aus dem mitochondrialen Intermembranraum werden über den Anionen-Transporter UCP-1 in die Matrix des Mitochondriums eingeschleust. Somit sorgt UCP-1 für eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Die dadurch gewonnene Energie wird schließlich direkt in Wärme umgewandelt (s. Abbildung 2).

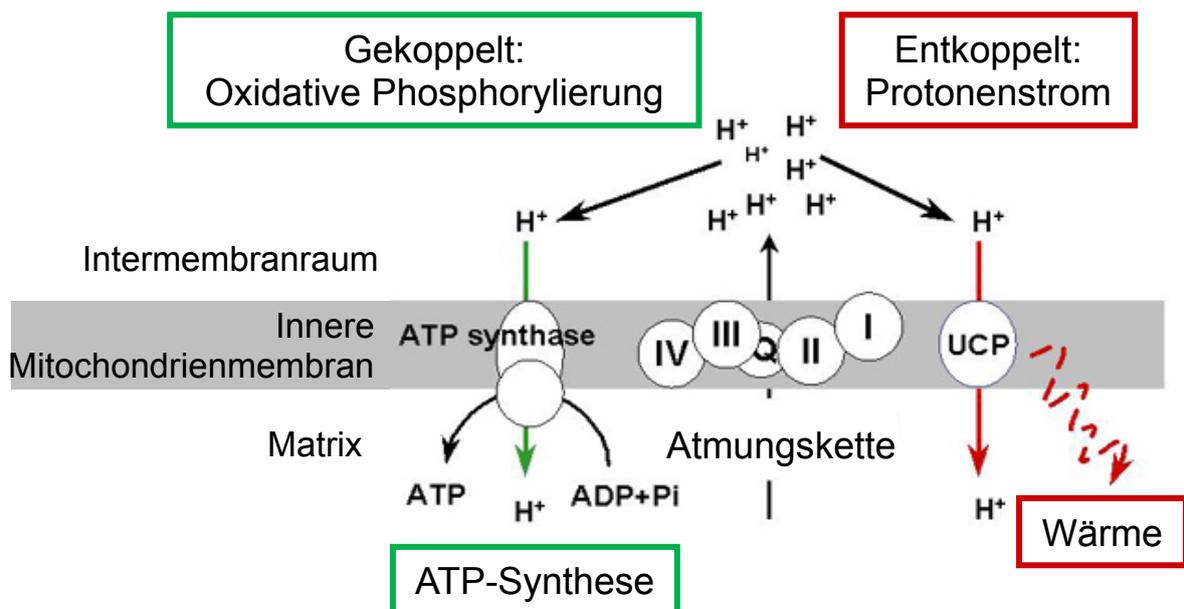


Abbildung 2: Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung durch UCP-1 im braunen Fettgewebe (modifiziert nach Collins, <http://people.duke.edu/~sc9/research.html>).

Die große Bedeutung der zitterfreien Thermogenese für den Metabolismus wird daran deutlich, dass eine Ablation des braunen Fettgewebes in Mäusen zu Adipositas und Insulinresistenz führt [61]. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass die Transplantation von braunem Fettgewebe in Mäusen zu einer Gewichtsreduktion sowie verbesserter Glukose- und Insulintoleranz führt [62]. Eine Aktivierung des braunen Fettgewebes durch einen Kältereiz

Einleitung

verstärkt außerdem die Aufnahme und Oxidation von FFA aus dem Blut in braune Adipozyten, wodurch die Konzentration schädlicher Plasmalipide im Blut gesenkt wird [63].

Weiterhin finden sich in der Literatur Studien zur Rolle der spezifischen Marker des braunen Fettgewebes in Bezug auf die Entwicklung einer Adipositas und Insulinresistenz. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Expression des Thermogenesemarkers *Ucp-1* im Verlauf einer hochkalorischen Diät im braunen Fettgewebe von Mäusen erhöht wird, um mit Hilfe der Diät-induzierten Thermogenese einer Adipositas entgegenzuwirken [64, 65]. Im Umkehrschluss entwickeln *Ucp-1-knockout* Mäuse aufgrund einer defekten Thermogenese unter thermoneutralen Bedingungen eine Adipositas [66, 67]. Für den Zelltod-Aktivator CIDE-A konnte gezeigt werden, dass eine Defizienz im Mausmodell zu einer Resistenz gegenüber einer Diät-induzierten Adipositas führt, vermutlich bedingt durch eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs der Tiere [68]. Im Fall des PPAR γ Koaktivators PGC-1 α wurde beschrieben, dass die Expression thermoregulatorischer Gene wie *Ucp-1* mitunter von PGC-1 α induziert wird [69]. Ferner ist PGC-1 α an der mitochondrialen Biosynthese sowie dem β -oxidativen Metabolismus beteiligt und damit essentiell für eine Aktivierung des braunen Fettgewebes. Ein *Knockout* von *Pgc-1 α* verhindert entsprechend die verstärkte Expression thermoregulatorischer Gene infolge einer hochkalorischen Diät und führt somit zur Auslösung einer Insulinresistenz [70, 71].

1.3.3 Vaskularisierung im braunen Fettgewebe

Kälte und β -adrenerge Signale können auch eine verstärkte Vaskularisierung des braunen Fettgewebes auslösen, mit dem Ziel, den Sauerstofftransport aufgrund des erhöhten Bedarfs zu vereinfachen. Die Steigerung der Vaskularisierung erfolgt über eine vermehrte Produktion von VEGF-A [72-74]. Wie bereits für das weiße Fettgewebe erörtert spielt VEGF-A auch für den Metabolismus im braunen Fettgewebe eine Rolle. So konnte demonstriert werden, dass VEGF-A in braunen Adipozyten *in vitro* das Überleben und die Proliferation der Zellen verbessert, wohingegen ein VEGF-neutralisierender Antikörper Apoptose auslöste [75]. Eine Überexpression von *Vegf- α* im Mausmodell erhöht die Masse des braunen Fettgewebes und kann ferner ein *Browning* des weißen Fettgewebes sowie die Expression von *Ucp-1* induzieren, einhergehend mit einer Verbesserung der metabolischen Aktivität und Gesundheit [76, 77]. Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass es auch im braunen Fettgewebe infolge einer Diät-induzierten Adipositas zu einer Hypoxie und Schädigung der mitochondrialen Funktion durch ROS kommt, vermittelt durch eine Ausdünnung vaskulärer Gefäße bzw. einer verminderten Expression von *Vegf- α* . Daraus resultiert ein „*Whitening*“ des braunen Fettgewebes, gekennzeichnet durch eine verstärkte Lipidakkumulation aufgrund der mitochondrialen Dysfunktion der braunen Fettzellen. Analog führt der adipozytenspezifische

Einleitung

Knockout von *Vegf- α* in Mäusen zu einem *Whitening* und einer Reduktion der Mitochondrienzahl im braunen Fettgewebe. Über eine virale Transduktion von *Vegf- α* in das braune Fettgewebe adipöser Mäuse konnte die Vaskularisierung und die Funktion des braunen Fettgewebes wiederhergestellt werden, zusätzlich zeigte sich eine Verbesserung der Insulinsensitivität. Die verminderte Expression von *Vegf- α* nach Induktion einer Diät-induzierten Adipositas scheint, zumindest in Teilen, die Folge einer Reduktion β -adrenerger Signalwege zu sein, da in adipösen Mäusen eine verringerte Expression von *Adrb1* und *Adrb3* im braunen Fettgewebe gezeigt werden konnte [78].

1.4 Rolle der extrazellulären Matrix im Fettgewebe

Die extrazelluläre Matrix (EZM) stellt ein komplexes Netzwerk aus Proteoglykanen, Polysacchariden, Kollagen- und Elastinfasern sowie Fibronektinen und Lamininen dar, welches dem Gewebe als Strukturgeber und mechanische Stütze dient, aber auch Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen sowie die Vermittlung extrazellulärer Signale beeinflussen kann. Im weißen Fettgewebe kommt es während der Adipogenese sowie der Entwicklung einer Adipositas zu zahlreichen strukturellen Umwandlungen in der EZM, wobei sowohl Synthese- als auch Degradationsprozesse für die Funktion des Gewebes von Bedeutung sind. Es wird vermutet, dass die EZM für das Überleben von weißen Adipozyten eine große Rolle spielt, da der voluminöse Lipidtropfen innerhalb der Zelle z.B. durch mechanischen Stress platzen könnte. Dies kann mit Hilfe der Stützfunktion einer dichtgepackten EZM vermieden werden [79]. Im Rahmen der Differenzierung von Adipozyten erfolgt eine Umwandlung der Fibronektinreichen stromalen Matrix, die Präadipozyten umgibt, zu einer laminaren Basalmembran in reifen Adipozyten [80, 81]. Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Expression von Kollagen IV und verschiedenen Lamininen [82]. Reife Fettzellen investieren viel Energie in die Prozessierung bzw. Aufrechterhaltung ihrer EZM, woran auch die abbauenden Enzyme, vor allem Matrix-Metalloproteinasen (MMP), beteiligt sind. MMP konnten bereits mit metabolischen Dysfunktionen in Verbindung gebracht werden. So führt ein *Knockout* von *Mmp3* im Mausmodell zu einer Hyperplasie und Hypertrophie des Fettgewebes [83], ähnliche Effekte wurden für MMP9 und MMP11 beschrieben [84, 85]. Andererseits zeigen Mäuse, die mit einem globalen MMP-Inhibitor behandelt wurden, eine Reduktion des Fettgewichts nach Fütterung einer hochkalorischen Diät [86].

Ausgereifte Adipozyten müssen im Rahmen der Expansion in der Lage sein, ihre EZM adäquat anzupassen [87]. Gelingt dies nicht bzw. wird ein hypertrophisches Limit erreicht, können Hypoxie sowie anschließend Inflammation und Fibrose des Fettgewebes die Folge sein –

Einleitung

typische Veränderungen des weißen Fettgewebes bei Vorliegen einer Adipositas. Im Rahmen dieser Vorgänge kommt es zu einer verstärkten Expression zahlreicher EZM-Bestandteile, wobei insbesondere Kollagen VI mit metabolischen Dysfunktionen in Zusammenhang gebracht wird [88, 89].

Auch die Angiogenese im Fettgewebe kann von der EZM beeinflusst werden. So inhibiert Kollagen IV das initiale Gefäßwachstum während der Angiogenese, wohingegen eine MMP-vermittelte Degradation der EZM für eine funktionale Angiogenese notwendig sein kann [90]. Das weiße Fettgewebe adipöser Patienten ist gekennzeichnet durch ein verringertes Auftreten kapillärer bzw. einem erhöhten Auftreten großer Gefäße. Dies steht im Zusammenhang mit einer Reduktion von Elastin und korreliert mit dem Auftreten einer Insulinresistenz. Kollagen V hingegen wird bei Adipositas im Fettgewebe stark induziert und findet sich insbesondere in der Umgebung der großen Gefäße. Es konnte nachgewiesen werden, dass Kollagen V zu einer dosisabhängigen Reduktion der Angiogenese führt [91].

Zu den Veränderungen der EZM im braunen Fettgewebe gibt es bis dato keine hinreichenden Untersuchungen.

1.5 Hyaluronsäure

1.5.1 Struktur, Vorkommen und Synthese

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der EZM ist die Hyaluronsäure (HA), ein lineares Glykosaminoglykan bestehend aus alternierenden β -1,3- bzw. β -1,4-glykosidisch verknüpften Disacchariden von D-Glukuronsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin (s. Abbildung 3). Die Größe des HA-Polymers kann zwischen 5 – 20.000 kDa variieren, wobei im gesunden Gewebe hauptsächlich hochmolekulare HA (HMW-HA) in einer Größenordnung von ca. 3000 – 4000 kDa vorliegt. HA kommt ubiquitär in Geweben und Körperflüssigkeiten aller Wirbeltiere sowie einiger Bakterien vor. Die höchsten Konzentrationen des Polysaccharids beim Menschen finden sich in der Nabelschnur, der Gelenkflüssigkeit, der Haut und dem Glaskörper des Auges [92].

Einleitung

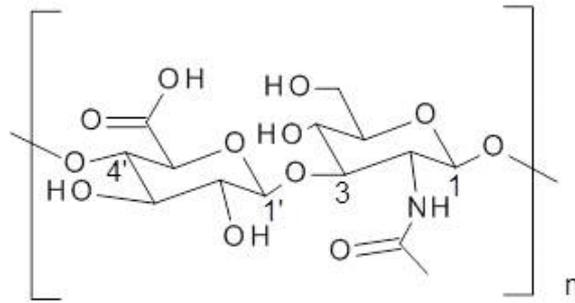


Abbildung 3: Strukturformel der Hyaluronsäure.

Im Gegensatz zur Synthese anderer Glykosaminoglykane findet die Synthese der HA in Eukaryonten nicht im Golgi-Apparat, sondern direkt an der zellulären Plasmamembran statt. An der Synthese der HA sind drei verschiedene membranständige HA-Synthase-(HAS)-Isoenzyme beteiligt: HAS1, HAS2 und HAS3 [93, 94]. Die Synthese erfolgt an der inneren Plasmamembran unter alternierender Verwendung der zytosolischen Substrate UDP- α -D-Glukuronsäure und UDP- α -N-Acetyl-D-Glukosamin. Das entstehende HA-Polymer wird schließlich in den Extrazellularraum extrudiert, wobei hierfür verschiedene Mechanismen postuliert werden. Zunächst wurde angenommen, dass das synthetisierte HA-Polymer über ABC-Transporter aus der Zelle ausgeschleust wird [95], allerdings konnte auch für die HAS nachgewiesen werden, dass eine direkte Translokation der HA in die EZM erfolgen kann [96]. Jede der HAS ist eigenständig in der Lage, HA zu synthetisieren, wobei sich die Länge des HA-Polymers unterscheiden kann [97, 98]. Verschiedene Signalmoleküle, Wachstumsfaktoren und Zytokine können die Expression der HAS beeinflussen. So wird im Rahmen von Verletzungen und inflammatorischen Prozessen die HAS Expression durch Freisetzung von z.B. *Platelet-derived growth factor* (PDGF), *Epidermal growth factor* (EGF), *Transforming growth factor- β* (TGF- β), Interleukin-1 β (IL-1 β), TNF α oder Interferone induziert [99]. Eine besondere Rolle in der embryonalen Entwicklung konnte für HAS2 nachgewiesen werden. Eine vollständige Deletion der Synthase führte im Mausmodell zu schweren kardialen und vaskulären Fehlbildungen, sodass die Embryonen noch im Mutterleib versterben [100]. Has1- und Has3-defiziente Mäuse sind hingegen lebensfähig.

1.5.2 Bindeproteine, Rezeptoren und Degradation

HA kann mit zahlreichen HA-Bindeproteinen und Makromolekülen [101, 102] der EZM interagieren, aber auch als Ligand membranständiger Rezeptoren Signalkaskaden [103] auslösen. Beispiele typischer HA-Bindeproteine sind CD44, *Receptor for hyaluronan mediated motility* (RHAMM, auch HMMR genannt), *TNF-stimulated gene 6 protein* (TSG-6), *Hyaluronan receptor for endocytosis* (HARE), *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor* (LYVE-1), TLR2 und TLR4, Versican oder das kürzlich als HA-Bindeprotein identifizierte KIAA1199 [104].

Einleitung

Über Interaktion mit den Rezeptoren kann HA Einfluss auf Proliferation und Migration, Wundheilung, Inflammation und Tumorentstehung und -progression nehmen. Beispiele intrazellulärer Signalkaskaden von HA-Rezeptoren sowie deren Effekte sind in Abbildung 4 aufgezeigt. HA kann aber auch als freies Polysaccharid in der EZM vorliegen und dient in dieser Form beispielsweise als Wasserspeicher, Schmiermittel oder der Bereitstellung einer pro-migratorischen Matrix [105].

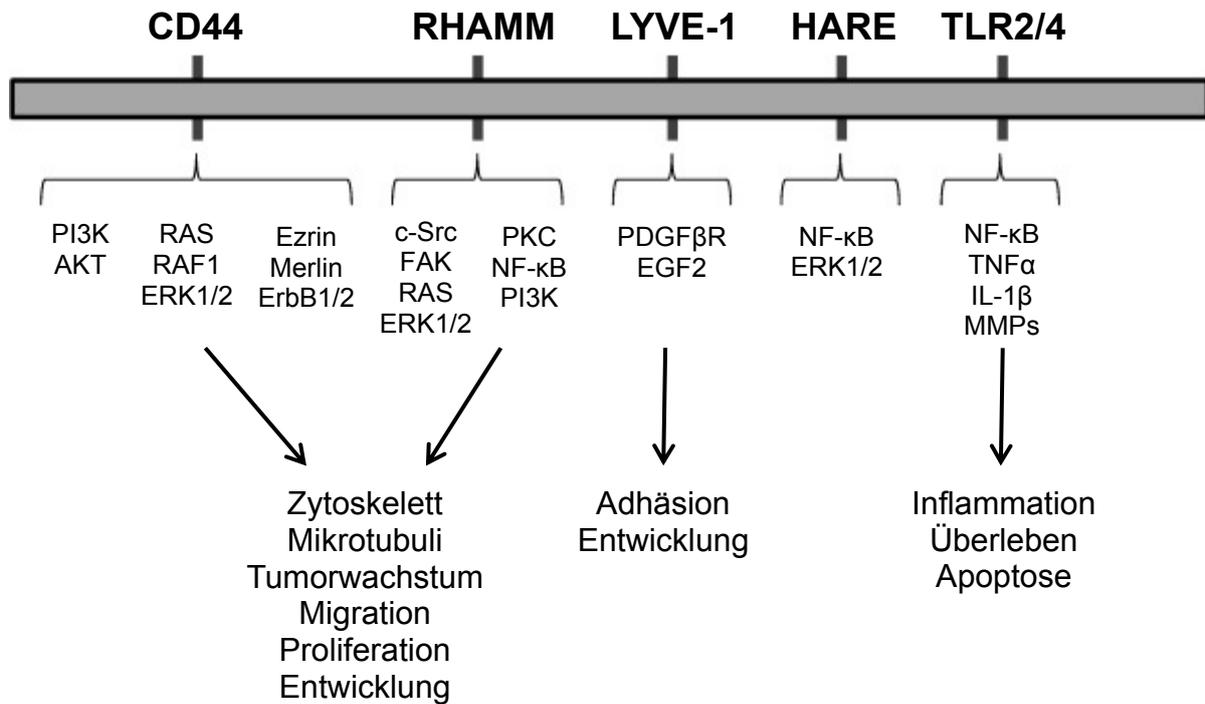


Abbildung 4: Signalwege und Effekte der HA-Rezeptoren auf Zell- und Gewebefunktionen [103].

Die Degradation der HA erfolgt durch Hyaluronidasen (HYAL). Diese sind in der Lage, die β -1,4-glykosidischen Verbindungen zwischen N-Acetyl-D-Glukosamin und D-Glukuronsäure zu hydrolysieren und HA-Fragmente freizusetzen. Zu den insgesamt sechs verschiedenen HYAL, die in Säugetieren identifiziert werden konnten, gehören HYAL1, HYAL2, HYAL3, PH-20 und HYALP1 [106]. Für den Abbau der HA spielen HYAL1 und HYAL2 die größte Rolle, wobei gezeigt werden konnte, dass HYAL2 hauptsächlich HMW-HA in Fragmente einer Größe von 20 kDa spaltet. Der weitere Abbau bis hin zu Oligosacchariden erfolgt schließlich durch PH-20 [107]. Auch die Bildung von ROS kann an einer Degradation der HA und anderen Moleküle der EZM beteiligt sein [108-110]. Durch Fragmentierung entsteht niedermolekulare HA (LMW-HA), deren Funktion sich von HMW-HA unterscheidet. LMW-HA entsteht vor allem im Rahmen einer Gewebeverletzung oder Entzündung, vermutlich durch Dysregulation in der Expression

Einleitung

oder Funktion von HAS und HYAL, und dient als inflammatorisches [111], aber auch Angiogenese-förderndes [112] Signalmolekül.

1.5.3 4-Methylumbelliferon, ein Inhibitor der HA-Synthese

Bei 4-Methylumbelliferon (4-MU), auch Hymecromon genannt, handelt es sich um ein modifiziertes Cumarin (7-Hydroxy-4-methylcumarin), das aufgrund seiner choloretischen und papaverinartigen spasmolytischen Wirkung als Galletherapeutikum eingesetzt wird [113]. Die Strukturformel von 4-MU ist in Abbildung 5 dargestellt. Neben seiner Verwendung als Gallengang-Relaxans konnte nachgewiesen werden, dass 4-MU die Synthese der HA inhibieren kann [114, 115]. Der zugrundeliegende Mechanismus besteht in einer Depletion des zellulären UDP- α -D-Glukuronsäure Pools, da 4-MU selbst kompetitives Substrat der UDP-Glukuronosyltransferase (UGT) ist. Durch die Entstehung des 4-MU-Glukuronids kommt es zu einer Reduktion der UDP- α -D-Glukuronsäure und durch die Substratverarmung zu einer dosisabhängigen Hemmung der HAS-Aktivität [116]. Ferner wird postuliert, dass 4-MU eine reduzierte Expression der *HAS2* und *HAS3* mRNA bewirkt und somit beide Mechanismen zu einer Inhibition der HA-Synthese beitragen [117]. In einer weiteren Studie wird berichtet, dass 4-MU auch in der Lage ist, die Expression der UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (UGPP) sowie der UDP-Glukose-Dehydrogenase (UGDH) zu reduzieren [118]. Beide Enzyme sind essentiell für die Synthese der HA-Vorstufen N-Acetyl-D-Glukosamin und D-Glukuronsäure [119, 120].

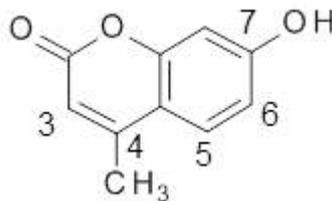


Abbildung 5: Strukturformel von 4-Methylumbelliferon.

Die bis dato meisten Studien zu der Wirkung von 4-MU als Inhibitor der HA-Synthese wurden im Bereich der Tumorforschung durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von 4-MU mit anti-proliferativen, anti-migratorischen, anti-invasiven und Apoptose-induzierenden Eigenschaften verbunden ist [121-126]. Weitere Untersuchungen zeigen einen protektiven Effekt der 4-MU Behandlung auf die Induktion eines akuten Nierenschadens [127], im Bereich autoimmuner Reaktionen des zentralen Nervensystems (ZNS) [128] sowie für entzündliche Prozesse der Lunge [129, 130].

Einleitung

1.5.4 Rolle der Hyaluronsäure im weißen Fettgewebe

Auch Zellen des Fettgewebes sind in der Lage, große Mengen HA zu synthetisieren. So finden sich in der Literatur diverse Studien, die Hinweise zu einer funktionellen Rolle der HA im weißen Fettgewebe liefern. Bereits im Jahr 1993 wurde beschrieben, dass es im Rahmen der adipogenen Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu einer typischen Erhöhung der Viskosität des Zellkulturmediums kommt. Damit einhergehend konnte eine verstärkte Synthese von HA und Proteoglykanen nachgewiesen werden [131]. Die Veränderung der Viskosität des Mediums konnte schließlich eindeutig auf eine gesteigerte HA-Synthese zurückgeführt werden [132]. Zudem zeigten Allingham *et al.*, dass die Phase der klonalen Expansion von 3T3-L1 Zellen mit einer gesteigerten Expression der *Has2*, *Has3* und *Hyal2* mRNA einhergeht, während *Has1* nicht detektierbar war und die Expression der *Hyal1* keinen Veränderungen unterlag. Ebenso wurde eine verstärkte Sekretion von HMW-HA (entsprechend einer Größe > 10.000 kDa) in den Überstand der Zellen beobachtet. Dahingegen wurde während der terminalen Differenzierung der 3T3-L1 Zellen vermehrt LMW-HA einer Größe von 20 kDa detektiert, der angiogene Wirkungen zugeschrieben werden [133]. Auch die Gruppe um Zizola *et al.* konnte eine gesteigerte HA-Synthese in differenzierenden 3T3-L1 Zellen nachweisen [134].

Veränderungen des HA-Systems konnten auch in hypertrophen Adipozyten *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden. Induziert durch hohe Glukosekonzentrationen im Medium reifen 3T3-L1 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, die unter niedrigen Glukosekonzentrationen differenziert werden, zu hypertrophen Adipozyten heran. Dies geht einher mit einer verstärkten Expression von *Serum Amyloid A3 (Saa3)* und *Mcp-1*, welche Marker eines akuten inflammatorischen Geschehens sind. Zeitgleich erfolgt eine verstärkte Synthese von HA und erhöhte Expression der *Has2* mRNA. *Has1* und *Has3* konnten in diesen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Postuliert wurde, dass HA und SAA3 in Form eines Komplexes die Adhäsion von Monozyten an hypertrophe Adipozyten und damit die Inflammation im Fettgewebe verstärken. Durch Vorbehandlung hypertropher 3T3-L1 Zellen mit Hyaluronidase konnte eine Monozytenadhäsion vermieden werden. *In vivo* wurde eine erhöhte Synthese der HA im weißen Fettgewebe von LDL-Rezeptor-(Ldlr)-*knockout* Mäusen nach Diät-induzierter Adipositas nachgewiesen. Ebenso zeigten Leptin-defiziente (*ob/ob*) Mäuse, die ein genetisches Modell eines T2DM darstellen, im Vergleich zu C57BL/6J Kontrollmäusen eine verstärkte Expression der *Has2* mRNA im weißen Fettgewebe [135].

Des Weiteren konnte die Expression des HA-Rezeptors *CD44* im weißen Fettgewebe bereits mit dem Auftreten einer Insulinresistenz und T2DM in Verbindung gebracht werden [136, 137]. Genauere Untersuchungen im Mausmodell zeigten eine Reduktion der Diät-induzierten

Einleitung

Inflammation des Fettgewebes, eine verbesserte Insulinsensitivität sowie eine verringerte Lebersteatose in CD44-defizienten oder anti-CD44-Antikörper-behandelten Tieren [138, 139].

Im Allgemeinen liegt nahe, dass Störungen des HA-Stoffwechsels auch den Glukosemetabolismus und die Insulinsensitivität beeinflussen, da HA aus den Glukose-Derivaten D-Glukuronsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin synthetisiert wird. Auch ist wahrscheinlich, dass eine gestörte Glukoseverwertung und –toleranz zu Veränderungen im HA-System führt.

Zur Rolle der HA im braunen Fettgewebe sind bis dato keine Studien bekannt.

Einleitung

1.6 Zielsetzung

Patienten mit Adipositas haben ein hohes Risiko, eine Insulinresistenz und folglich einen T2DM zu entwickeln. Im Jahr 2012 lag T2DM auf Rang 8 der häufigsten Todesursachen weltweit. Wurde die Adipositas in der Vergangenheit hauptsächlich als Problem reicherer Industrienationen angesehen, so zeigt sich heute auch ein deutlicher Anstieg der Adipositas-Prävalenz in einkommensschwächeren Nationen. Da bislang keine ausreichenden Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen, besteht ein großes Interesse an der Erforschung adäquater Zielstrukturen für die Prävention und Behandlung einer Adipositas. Veränderungen der Funktion im weißen Fettgewebe haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Insulinsensitivität. Im Rahmen der Adipositas kommt es zu einer Hypertrophie und chronischen Inflammation im weißen Fettgewebe, was eine Reduktion der systemischen Insulintoleranz zur Folge hat. Für HA als wichtiger Bestandteil der EZM des Fettgewebes konnte bereits gezeigt werden, dass diese während der Differenzierung und Hypertrophie weißer Adipozyten akkumuliert. Im Gegensatz zum weißen Fettgewebe wird das braune Fettgewebe aufgrund der Fähigkeit zur Steigerung des Energieumsatzes über die zitterfreie Thermogenese als potentiell Adipositas-Präventiv gehandelt. Bis dato gibt es allerdings keine Untersuchungen zu Veränderungen des HA-Systems im braunen Fettgewebe.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Untersuchung des Einflusses der HA-Matrix auf die Funktion von weißem und braunem Fettgewebe im Hinblick auf die Entstehung einer Adipositas und Insulinresistenz. Dazu sollen folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Charakterisierung des HA-System im Fettgewebe während der Differenzierung und der Entstehung von Adipositas
- Einfluss der pharmakologischen Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU auf die Entwicklung einer Adipositas und Insulinresistenz
- Einfluss einer durch genetischen *Knockout* induzierten Inhibition der HAS2- und HAS3-vermittelten HA-Synthese auf die Entwicklung einer Adipositas und Insulinresistenz

Zur Beantwortung der Fragestellungen soll das etablierte Modell der Diät-induzierten Adipositas in Mäusen herangezogen werden. Aufgrund der beschriebenen gegensätzlichen Funktion von weißem und braunem Fettgewebe sollen die Untersuchungen der systematischen Aufklärung der Bedeutung des HA-Systems in den jeweiligen Geweben dienen. Dies ist insbesondere deshalb relevant, da bis dato in Bezug auf die Rolle der HA bzw. EZM im braunen Fettgewebe keine Studien vorliegen.

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Zellversuche

2.1.1 Verwendete Substanzen für die Zellkultur

Tabelle 1: Verwendete Substanzen für die Zellkultur

BEZEICHNUNG	PRODUKT / ZUSAMMENSETZUNG	HERSTELLER
Bradford Reagenz	Bio-Rad Protein Assay Dye	Bio-Rad Laboratories, München
BSA	Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dexamethason	Dexamethason	alles Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose (4,5 g/l)	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, UK
DMEM/F-12	1 : 1 Mix DMEM high glucose (4,5 g/l) / Ham's F-12	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, UK
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, UK
FCS	Fetales Kälberserum	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, UK
Erythrozyten-Lyse- Puffer	150 mM NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA pH 7,2 - 7,4	alles Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HEPES (1,25-fach)	29,8 g HEPES 8,78 g NaCl 4,66 g KCl 1,12 g D-Glucose 18,8 g BSA 0,132 g CaCl ₂ in 1L destilliertem H ₂ O	alles Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HMW-HA	Haelon5 (gelöst zu 100 µg/ml in DPBS)	Abbott Medical Optics, Santa Ana, CA, USA
Hyaluronidase	Hyaluronidase aus Streptomyces hyalurolyticus	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Indomethacin	Indomethacin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Material und Methoden

BEZEICHNUNG	PRODUKT / ZUSAMMENSETZUNG	HERSTELLER
Insulin	Insulin aus bovinem Pankreas (gelöst in H ₂ O mit Eisessig pH2)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	2-Propanol AnalaR NORMAPUR	VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Kollagenase I	Kollagenase I, 295 U/mg	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA
4-MU-Natriumsalz	4-Methylumbelliferon-Natriumsalz (100 µM gelöst in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ölrot O	Ölrot O Pulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PenStrep	Penicillin-Streptomycin (10 000 units/ml)	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, UK
Rosiglitazon	Rosiglitazon	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Roti®-Histofix 4%	säurefreie, phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4 % (pH 7)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
T3	3,3',5-Triiodo-L-thyronin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TE	Trypsin EDTA Lösung	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, UK

2.1.2 Verwendete Zellen

2.1.2.1 3T3-L1 Zellen

Zur Untersuchung der adipogenen Differenzierung wurde die Fibroblasten-ähnliche präadipozytäre Zelllinie 3T3-L1 [140] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet. Um ein ausreichendes Maß an Differenzierung zu erhalten, wurden ausschließlich Zellen der Passagen 8 – 11 eingesetzt und regelmäßig bei Erreichen einer etwa 70-prozentigen Konfluenz passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und durch Zugabe einer TE-Lösung für 3 min bei Raumtemperatur abgelöst. Die Kultivierung der 3T3-L1 Zellen erfolgte in DMEM supplementiert mit 10% FCS und 1% PenStrep bei 37°C und 5% CO₂.

2.1.2.2 Präadipozyten aus dem braunen und weißen Fettgewebe

Für die Isolation der Präadipozyten aus der stromal-vaskulären Fraktion (SVF) des braunen und weißen Fettgewebes [141] wurden 0,25 – 0,5 g supraventrikuläres braunes Fettgewebe sowie 0,5 – 1 g epididymales weißes Fettgewebe aus 8 – 12 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen (Janvier Labs, Le Genest Saint-Isle, Frankreich) entnommen. Mittels eines

Material und Methoden

Skalpells wurden die Gewebestücke bis zum Erreichen einer sehr feinen Konsistenz zerkleinert und in 4,5 ml einer sterilen Lösung, zusammengesetzt aus 0,5 ml Kollagenase I Lösung (5000 U/ml) und 4 ml einer 1,25-fach HEPES Lösung (s. Tabelle 1), bei 37°C für 90 min auf einer Schüttelplatte verdaut. Die so erhaltene Suspension wurde im Reaktionsgefäß mit DMEM/F-12 (1% PenStrep) auf 30 ml aufgefüllt und bei 50×g für 5 min zentrifugiert. Die Interphase, welche die SVF enthält, wurde unterhalb der schwimmenden Lipidfraktion entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In einem nächsten Zentrifugationsschritt bei 200×g für 10 min wurde die SVF pelletiert, der Überstand bis auf 5 ml Restvolumen abgesaugt und die SVF Suspension für 5 min mit 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Lysereaktion mit 15 ml DMEM/F-12 (10% FCS, 1% PenStrep) gestoppt. Um unerwünschte endotheliale Zellen zu entfernen wurde die SVF durch ein Nylonsieb mit 20 µm Porenbreite gefiltert (Merck Millipore, Darmstadt) und abschließend bei 200×g für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet mit Präadipozyten wurde in 1 ml DMEM/F-12 (10% FCS, 1% PenStrep) resuspendiert und die Zellen mittels Trypanblau-Färbung in einem *Countess™ Automated Cell Counter* (Invitrogen™, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) gezählt. Die isolierten Präadipozyten wurden anschließend zu jeweils 50.000 Zellen pro cm² in DMEM/F-12 (10% FCS, 1% PenStrep) ausgesät. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen in DMEM (10% FCS, 1% PenStrep) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.1.3 Differenzierung in Adipozyten

2.1.3.1 3T3-L1

Für die adipogene Differenzierung wurden 20.000 Zellen pro cm² ausgesät und zwei Tage nach Erreichen einer vollständigen Konfluenz mit den differenzierungsinduzierenden Substanzen Insulin (1 µg/ml), IBMX (0,5 mM) sowie Dexamethason (0,25 µM) behandelt. Nach zwei Tagen wurde das Medium gewechselt und für zwei weitere Tage 1 µg/ml Insulin zugesetzt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung im Hinblick auf Genexpression und HA-Sekretion analysiert (s. Abbildung 6).

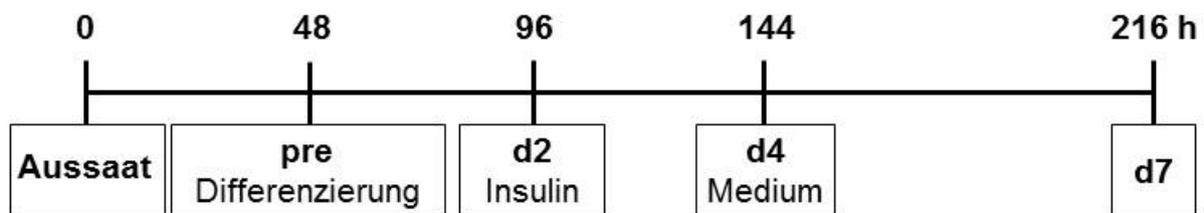


Abbildung 6: Differenzierungsprotokoll der 3T3-L1 Zellen.

Material und Methoden

2.1.3.2 Präadipozyten aus braunem Fettgewebe

Zwei Tage nach Erreichen einer vollständigen Konfluenz wurde die adipogene Differenzierung durch Behandlung mit 2 µg/ml Dexamethason, 5 µg/ml Insulin, 125 µM Indomethacin, 0,5 mM IBMX, 1 nM T3 sowie 0,5 µM Rosiglitazon über einen Zeitraum von zwei Tagen induziert. Fortan wurden bei jedem Mediumwechsel 5 µg/ml Insulin und 1 nM T3 zugesetzt. Sieben Tage nach Induktion der Differenzierung wurden die ausgereiften braunen Adipozyten für Analysen verwendet.

2.1.3.3 Präadipozyten aus weißem Fettgewebe

Zwei Tage nach Erreichen einer vollständigen Konfluenz wurde die adipogene Differenzierung durch Behandlung mit 0,1 µM Dexamethason, 100 µg/l Insulin, 60 µM Indomethacin und 250 µM IBMX über einen Zeitraum von zwei Tagen induziert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und für weitere zwei Tage 100 µg/l Insulin zugesetzt. Sieben Tage nach Induktion der Differenzierung wurden die ausgereiften weißen Adipozyten für Analysen verwendet.

2.1.4 Behandlungen mit 4-MU, HMW-HA und Hyaluronidase

In vitro wurden 3T3-L1 Zellen sowie Präadipozyten aus braunem und weißem Fettgewebe zur Hemmung der HA-Synthese ab Induktion der Differenzierung sowie nachfolgend bei jedem Mediumwechsel mit 100 µM 4-MU-Natriumsalz behandelt. Zur Überprüfung der Reversibilität des 4-MU-vermittelten Effekts wurden 4-MU vorbehandelte 3T3-L1 Zellen 24 h nach Differenzierungsbeginn durch exogene Zugabe von 100 µg/ml hochmolekularer HA (HMW-HA) stimuliert. Die Stimulation mit HMW-HA wurde am nächsten Tag gemeinsam mit dem Wechsel auf DMEM plus 1 µg/ml Insulin wiederholt.

Der HA-Verdau in 3T3-L1 Zellen erfolgte 24 h nach Induktion der Differenzierung durch Zugabe von 2 U/ml Hyaluronidase für 24 h. Am folgenden Tag wurde mit dem Standard-Differenzierungsprotokoll fortgefahren.

2.1.5 Ölrot O Färbung

Die ausgereiften Adipozyten wurden am siebten Tag nach Beginn der Differenzierung mit Roti®-Histofix 4% (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde dreimal mit destilliertem H₂O gewaschen und die Zellkulturplatte für ca. 20 min bei 37°C getrocknet. Zur Herstellung der Ölrot O Stammlösung wurden 300 mg Ölrot O Pulver in 100 ml Isopropanol bei 60°C gelöst. Für die gebrauchsfertige, stets frisch herzustellende Ölrot O Lösung wurden 9 ml der Stammlösung mit 6 ml destilliertem H₂O gemischt und durch einen 0,22 µm Sterilfilter gegeben. Die fixierten Zellen wurden

Material und Methoden

anschließend für 10 min bei Raumtemperatur gefärbt. Hiernach wurde die Ölrot O Lösung abgenommen und die überschüssige Farbe mit destilliertem H₂O ausgewaschen.

Die Intensität der Ölrot O Färbung des Zellrasens wurde durch Analyse der Cy5-Fluoreszenz quantifiziert. Gemessen wurde bei hoher Intensität mit dem roten Laser bei einer Exzitation von 633 nm und einer Emission von 670 nm im *Typhoon Phosphorimager* (GE Healthcare, Uppsala, Schweden).

2.1.6 HA-Bindeprotein Sandwich ELISA-ähnlicher Assay

Zur Messung der Menge an sekretierter HA im Überstand der 3T3-L1 Zellen wurde zu den in Abbildung 1 dargestellten Zeitpunkten der Überstand der Zellen abgenommen und mittels ELISA-ähnlichem Assay (*Hyaluronic Acid Test Kit*, Corgenix, Broomfield, CO, USA) nach Instruktionen des Herstellers analysiert. Die Zellüberstände wurden für die Messung in der Regel im Verhältnis 1:50 mit destilliertem H₂O verdünnt. Für die Quantifizierung wurde zeitgleich eine Eichreihe mit verschiedenen konzentrierter HA (0, 50, 100, 200, 500, 800 ng/ml) gemessen. Die entsprechenden Absorptionen wurden bei 450 nm im ELISA-Plate Reader (*Multiskan™ FC Microplate Photometer*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Die errechnete HA-Konzentration wurde schließlich auf die Gesamt-Proteinkonzentration der Zellen korreliert. Für die Proteinbestimmung wurden die Zellen mit 0,1 M Natronlauge lysiert und mittels Methode nach Bradford quantifiziert [142]. Hierzu wurde das Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:5 mit destilliertem H₂O verdünnt und je 200 µl zusammen mit 10 µl Probe in eine 96-Loch-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) pipettiert. Für die Errechnung der absoluten Proteinkonzentrationen wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe mit BSA gemessen. Die photometrische Messung erfolgte ebenfalls im ELISA-Plate Reader (*Multiskan™ FC Microplate Photometer*) bei 595 nm.

2.1.7 Transfektion von siRNA in 3T3-L1 Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses eines genetischen *Knockdowns* der HA-Synthasen *Has2* und *Has3* sowie der HA-Rezeptoren *Cd44* und *Rhamm (Hmnr)* *in vitro* wurden 3T3-L1 Zellen mit kleiner interferierender RNA (siRNA) transfiziert. Hierzu wurden die 3T3-L1 Zellen einen Tag vor siRNA Behandlung zu jeweils 20.000 Zellen pro cm² in 24-Loch-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausgesät. Für die Transfektion wurde die jeweilige siRNA (s. Tabelle 2, Qiagen, Hilden) mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für 20 min in serum- und antibiotikafreiem DMEM komplexiert. Die finale Konzentration pro Transfektionsansatz betrug 30 nM siRNA, komplexiert mit 1 µl RNAiMAX. Das Medium der zuvor ausgesäten 3T3-L1 Zellen wurde abgesaugt und die

Material und Methoden

Lösung aus komplexierter siRNA zugegeben. Nach 30 min wurde 10% FCS zugesetzt. Am folgenden Tag (*Has2* siRNA, *Has3* siRNA) oder zwei Tage später (*Cd44* siRNA, *Rhamm* siRNA) wurde das Medium abgesaugt und die adipogene Differenzierung nach dem Standardprotokoll gestartet. Die Verifizierung des *Knockdowns* erfolgte 72 h nach Transfektion mittels qPCR.

Tabelle 2: Verwendete siRNA

GEN	SPEZIES	BEZEICHNUNG	ZIEL-mRNA	KATALOGNUMMER
Cd44	<i>Mus musculus</i>	Mm_Cd44_6 FlexiTube siRNA	NM_001039150, NM_001039151, NM_001177785, NM_001177786, NM_001177787, NM_009851	SI02711744
Has2	<i>Mus musculus</i>	Mm_Has2_8 FlexiTube siRNA	NM_008216	SI02732954
Has3	<i>Mus musculus</i>	Mm_Has3_3 FlexiTube siRNA	NM_008217, XM_994700	SI01063125
Rhamm	<i>Mus musculus</i>	Mm_Hmmr_3 FlexiTube siRNA	NM_013552	SI01067997

Material und Methoden

2.2 Tierversuche

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden basierend auf §8 des Tierschutzgesetzes durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen am 11.03.2013 unter dem Aktenzeichen Az. 84-02.04.2012.A398 genehmigt. Zucht und Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.2.1 Verwendete Tiere

C57BL/6J Mäuse wurden entweder direkt von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen oder der hauseigenen C57BL/6J Zucht des ZETT entnommen. Verwendet wurden die Tiere für die 4-MU Behandlung, die Untersuchung der Veränderungen im HA-System bei Diät-induzierter Adipositas sowie als Wildtyp-Kontrollen zu *HAS3-knockout* Mäusen.

Des Weiteren wurden verschiedene *Has-knockout* Mäuse untersucht, welche im Folgenden genauer beschrieben werden:

- Ubiquitäre *Has2-knockout* Maus (*Rosa26CreERT2^{+/-}* / *Has2^{flox/flox}*)

Da die *Has2* in der embryonalen Entwicklung unverzichtbar ist und daher eine kongenitale Deletion des Enzyms im Mausmodell letal verläuft, wurde der *Has2-knockout* erst im adulten Alter induziert. Hierzu wurde sich des Cre/LoxP-Rekombinase-Systems bedient, wobei eine ubiquitäre Tamoxifen-induzierbare *Rosa26CreERT2* Maus [143] (Taconic, Hudson, NY, USA) mit einer *Has2^{flox/flox}* Maus [144] gekreuzt wurde. In Mäusen des Genotyps *Rosa26CreERT2^{+/-}* / *Has2^{flox/flox}* wird durch Tamoxifen-Behandlung die an einen mutierten Östrogenrezeptor (ER) gebundene Cre-Rekombinase aktiviert und schneidet den von loxP-Erkennungssequenzen flankierten („*gefloxten*“) DNA Abschnitt - hier die *Has2* kodierende Sequenz – heraus, welche anschließend degradiert wird. Zur Induktion des *Has2-Knockouts* wurde männlichen *Rosa26CreERT2^{+/-}* / *Has2^{flox/flox}* Mäusen im Alter von 16 – 20 Wochen über 5 Tage eine tägliche Dosis von 4 mg Tamoxifen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oral über eine Schlundsonde verabreicht. Als Kontrolle dienten identisch behandelte *Rosa26CreERT2^{+/-}* Tiere. Nach einer einwöchigen Tamoxifen Auswaschphase wurden die Tiere für die in Abschnitt 2.2.2. beschriebenen Fütterungsexperimente verwendet.

Material und Methoden

- Ubiquitäre HAS3-*knockout* Maus

Zur Generierung humaner HAS3-*knockout* Mäuse (genOway, Lyon, Frankreich) wurde zunächst eine HAS3-*knockin* Maus entwickelt, bei welcher eine humane HAS3 cDNA Sequenz an Stelle des Exons 2 der murinen Has3 eingefügt wurde. Die eingebaute humane HAS3 cDNA wurde zu Selektionszwecken am 5' Ende mit einer FRT-Neomycin-FRT Sequenz flankiert. Weiterhin wurde die humane HAS3 cDNA an den 5' und 3' Enden mit loxP Stellen flankiert. Durch Verpaarung dieser Maus mit einer Maus, die konstitutiv Fip-Rekombinase exprimiert, wurde das FRT-Neomycin-FRT Konstrukt herausgeschnitten und eine HAS3-*knockin*^{lox/lox} Maus generiert. Zum Erhalt der humanen HAS3-*knockout* Maus wurde schließlich die HAS3-*knockin*^{lox/lox} Maus mit einer Maus gekreuzt, welche konstitutiv Cre-Rekombinase exprimiert, wodurch die eingefügte humane HAS3-Sequenz an den geflochten Enden herausgeschnitten und abgebaut wurde. Als Kontrolltiere wurden entweder Wildtyp-Wurfgeschwister oder C57BL/6J Tiere verwendet, auf deren Hintergrund die humane HAS3-*knockout* Maus vor Verwendung über mindestens 6 Generationen zurückgekreuzt wurde.

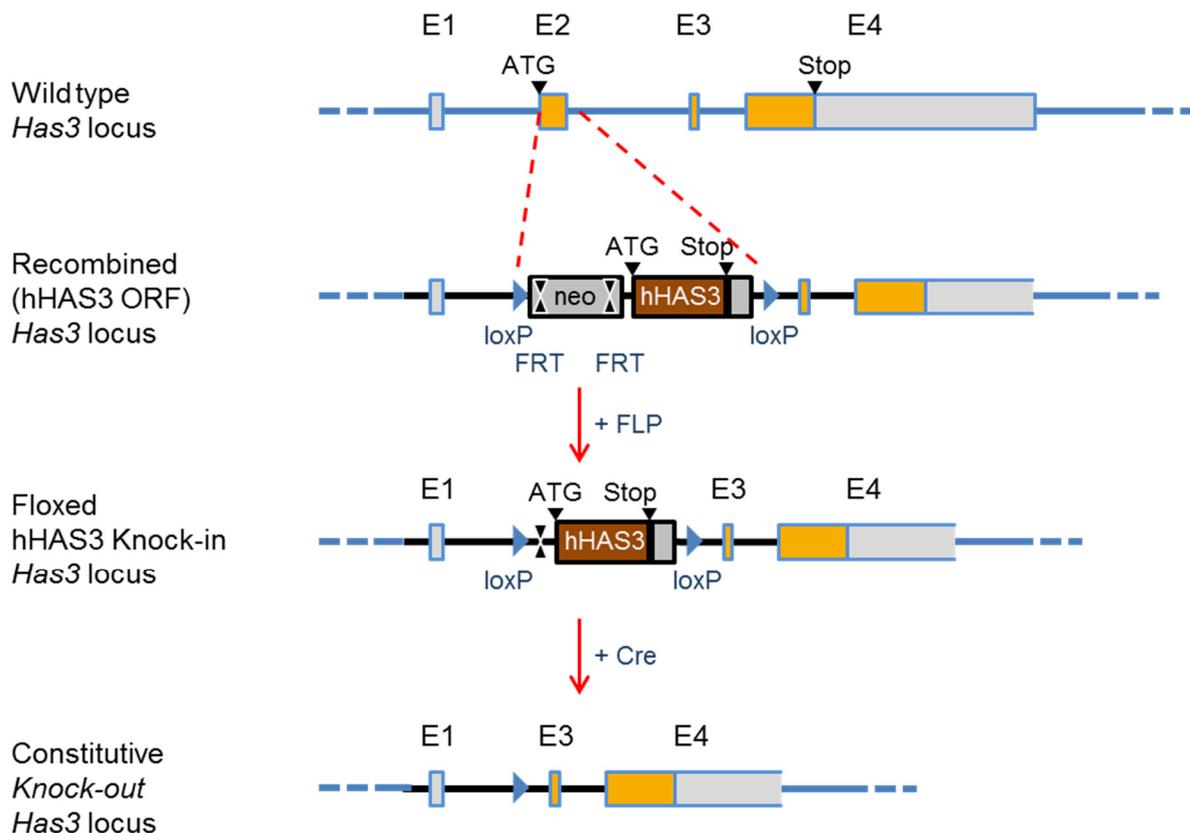


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung der humanen HAS3-*knockout* Maus (modifiziert nach genOway, *Confidential Data* 2009).

Material und Methoden

- Adipozytenspezifische Has2-knockout Maus (Fabp4Cre^{+/-} / Has2^{flox/flox}) und adipozytenspezifische HAS3-knockout Maus (Fabp4Cre^{+/-} / HAS3-knockin^{flox/flox})

Für die Generierung eines adipozytenspezifischen Has2- und HAS3-Knockouts wurden Fabp4Cre^{+/-} Mäuse (Stamm B6.Cg-Tg(Fabp4-cre)1Rev/J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) eingesetzt, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Fabp4-Promotors exprimieren. Dies bedingt, dass nur im braunen und weißen Fettgewebe, wo Fabp4 primär exprimiert wird, eine Cre-Rekombinase Aktivität vorliegt. Nach Verpaarung mit Has2^{flox/flox} bzw. HAS3-knockin^{flox/flox} Tieren entsteht der Knockout in Mäusen des Genotyps Fabp4Cre^{+/-} / Has2^{flox/flox} bzw. Fabp4Cre^{+/-} / HAS3-knockin^{flox/flox} somit ausschließlich im braunen und weißen Fettgewebe. Als Kontrolle für die adipozytenspezifischen Has2- und HAS3-knockout Mäuse wurden parallel Fabp4Cre^{+/-} untersucht.

2.2.2 Fütterung und experimentelles Schema

Für das Modell der Diät-induzierten Adipositas wurden männliche Mäuse aller unter 2.2.1 beschriebenen Tiergruppen ab einem Alter von 8 – 10 Wochen über einen Zeitraum von 22 Wochen mit einer diabetogenen Diät (DD, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert (s. Abbildung 8). Eine Ausnahme bildeten die ubiquitären Has2-knockout Mäuse, bei welchen der Knockout erst im Alter von 16 – 20 Wochen induziert werden konnte. Daher wurde hier erst eine Woche nach letztmaliger Tamoxifengabe (Mausalter 18 – 22 Wochen) mit der Fütterung begonnen (s. Abbildung 9). Die Zusammensetzung der DD ist in Tabelle 3 beschrieben. Die 4-MU Behandlung in der Gruppe der C57BL/6J Tiere erfolgte durch Einarbeitung von 50 g/kg 4-MU (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in die DD. Um den leicht bitteren Geschmack des 4-MU zu überdecken wurde das Futter außerdem mit Schokoladen-Aroma (ssniff) versetzt. Als Kontrolle für die 4-MU-behandelten C57BL/6J Mäuse dienten demzufolge C57BL/6J, die mit DD plus Schokoladen-Aroma gefüttert wurden.

Im Verlauf der Fütterung wurden nukleare Magnetresonanz (NMR) Analysen, metabolische Phänotypisierungen und intraperitoneale Glukose- sowie Insulintoleranztests durchgeführt. Zur Bestimmung des Körpergewichts wurden die Tiere einmal wöchentlich gewogen.

Weiterhin wurden männliche, 8 – 10 Wochen alte C57BL/6J Mäuse für die Analyse der durch Adipositas ausgelösten Veränderungen im HA-System des Fettgewebes (s. 3.1.2) verwendet. Hierzu wurden die Tiere über 16 Wochen mit DD oder Kontrolldiät (Mäuse-Haltungsfutter von ssniff, Zusammensetzung s. Tabelle 3) gefüttert und anschließend die Genexpression im Fettgewebe untersucht.

Material und Methoden

Tabelle 3: Zusammensetzung der DD und Kontrolldiät

DIABETOGENE DIÄT (DD)		KONTROLLDIÄT	
INHALTSSTOFF	GRAMM [%]	INHALTSSTOFF	GRAMM [%]
Casein	22,8	Trockensubstanz	87,7
Maltodextrin	12	Rohprotein	19
Saccharose	24,02	Rohfett	3,3
Schweineschmalz	35,85	Rohfaser	4,9
Mineralien-Mix	4	Rohasche	6,4
Vitamin-Mix	1	N-freie Extraktstoffe	54,1
Cholinchlorid	0,13	Stärke	36,5
DL-Methionin	0,2	Zucker	4,7
KCAL [%]		KCAL [%]	
Kohlenhydrate	26		58
Protein	15		33
Fett	59		9

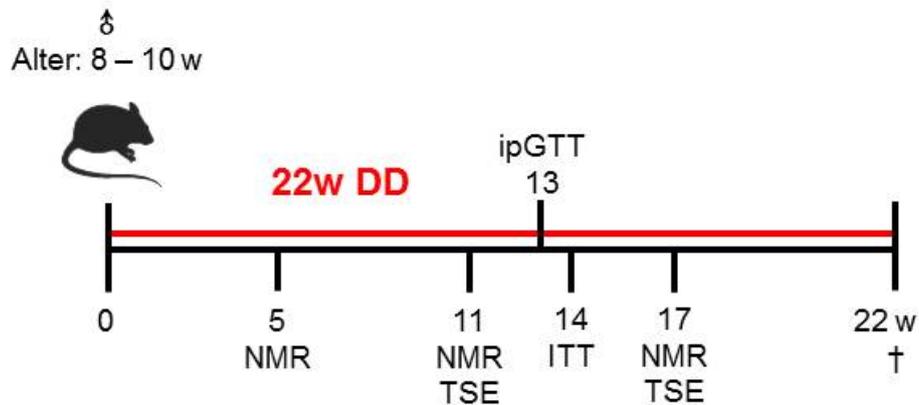


Abbildung 8: Experimentelles Schema der C57BL/6J \pm 4-MU, HAS3-knockout und adipozytenspezifischen Has2- und HAS3-knockout Mäuse.

Material und Methoden

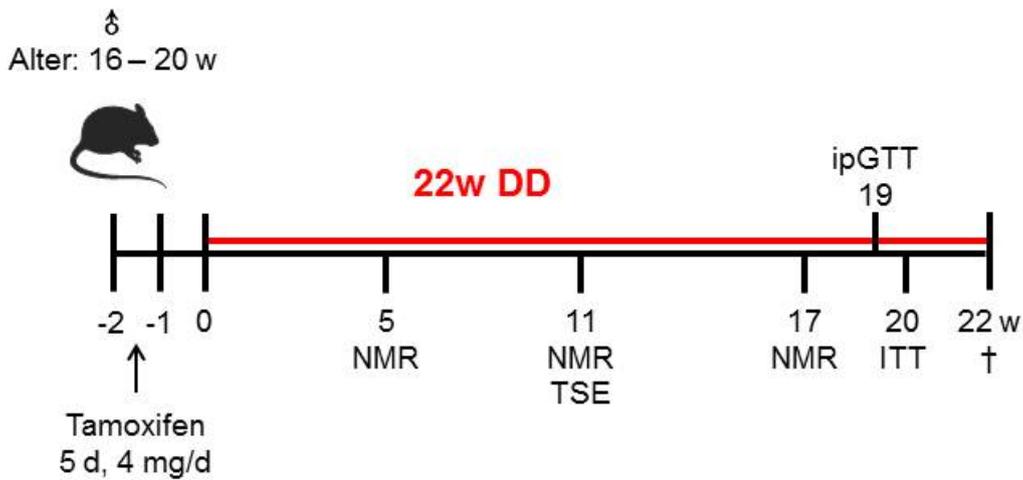


Abbildung 9: Experimentelles Schema der ubiquitären *Has2-knockout* Mäuse.

2.2.3 NMR Messung

Körperfett- und Magermasse der Mäuse wurden mittels NMR im *minispec NMR analyzer* (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) zu den Zeitpunkten 5, 11 und 17 Wochen nach Fütterungsbeginn ermittelt. Zur Berechnung des Körperfettanteils wurden die Werte der Fettmasse durch die Summe aus Fett- und Magermasse dividiert.

2.2.4 TSE Phenomaster

Futteraufnahme, Bewegungsaktivität und Energieumsatz der Mäuse wurden mittels Messung im *TSE Phenomaster* (TSE systems, Chesterfield, MO, USA) bestimmt. Bei den hierfür verwendeten Käfigen handelt es sich um formatgleiche, den Mäusen vertraute Haltungskäfige, die allerdings durch einen technisch modifizierten Deckel verschlossen werden. Am Deckel befinden sich Trinkflasche und Futterraufe, welche mit hochpräzisen Sensoren einer Waage verbunden sind und somit die Wasser- und Futteraufnahme über die Zeit der Messung aufzeichnen. Weiterhin enthält das System ein Modul („CaloSys“) für indirekte Gas-Kalorimetrie, womit der Energieumsatz der Mäuse, gemessen am O₂-Verbrauch des Tiers, ermittelt werden kann.

Vor der eigentlichen Messung wurden die Mäuse zur Gewöhnung an Räumlichkeit, Deckel, Trinkflasche und Futterraufe für drei Tage einzeln in Adaptionenkäfige gesetzt. Die Messung erfolgte anschließend ebenfalls einzeln über drei Tage in den *TSE Phenomaster* Käfigen. Über den Zeitraum der Messung wurden etwa alle 30 min die jeweiligen metabolischen Parameter aufgezeichnet. Da durch das Umsetzen der Tiere von den Adaptionen- in die Messkäfige initial

Material und Methoden

Abweichungen auftreten können, wurden ausschließlich die Messwerte der letzten 48 h mit in die Auswertung einbezogen. Die aufgenommene Futtermenge wurde auf die jeweilige Magermasse der Tiere bezogen. Der O₂-Verbrauch wurde mittels allometrischer Skalierung auf die jeweilige Körperoberfläche (Körpergewicht^{0,75}) der Tiere bezogen [145].

Eine Besonderheit stellte die Messung des kälteinduzierten Energieumsatzes dar. Hierbei wurden die Mäuse über eine Dauer von nur 24 h an die TSE Messkäfige gewöhnt, welche sich in einem temperierbaren Container befanden. Nach der Adaption erfolgte die Umstellung der Temperatur von 24°C auf 4°C für eine Messdauer von 8 h, wobei die Messwerte wiederum alle 30 min aufgezeichnet wurden. Der Zustand der Tiere wurde während der Kältemessung regelmäßig überwacht. Die Analyse des kälteinduzierten Energieumsatzes wurde in Kooperation mit dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Al-Hasani von Frau Dr. Tamara Castañeda am Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ) in Düsseldorf durchgeführt.

2.2.5 Glukose- und Insulintoleranztests

Zur Messung der Glukoseverwertung und Insulinsensitivität der Mäuse wurden intraperitoneale Glukosetoleranztests (ipGTT) sowie Insulintoleranztests (ITT) durchgeführt. Vor den Tests wurde den Mäusen für 6 h das Futter entzogen und anschließend die basale Blutglukosekonzentration ermittelt. Danach wurde den Tieren eine Dosis von 1 g/kg KG Glukose oder 0,75 U/kg KG Insulin injiziert und nach 5 (nur ipGTT), 15, 30, 60 und 120 min erneut die Glukosekonzentration gemessen. Der Blutstropfen für die Messung wurde durch einmaliges Anschneiden der Schwanzspitze gewonnen. Gemessen wurde in Einfachbestimmung mit dem Accu-Chek Compact Plus Blutzuckermessgerät (Roche Diagnostics, Mannheim).

Für die Auswertung wurden die absoluten Werte der zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Blutglukosekonzentration sowie die daraus errechnete AUC verwendet. Falls zwischen den Versuchsgruppen ein signifikanter Unterschied in der basalen (Nüchtern-) Blutglukosekonzentration auftrat, wurden die nachfolgend gemessenen Werte der Blutglukosekonzentration von dem basalen Wert subtrahiert. Die Darstellung erfolgte entsprechend als Veränderung der basalen Blutglukosekonzentration, woraus dann auch die zugehörige AUC errechnet wurde.

2.2.6 Entnahme und Aufbereitung der Proben

Um vergleichbare Nüchternwerte für die Plasma-Analysen zu erhalten wurde den Tieren 6 h vor der Tötung erneut das Futter entzogen. Nach der Tötung wurden die Mäuse mit 70%

Material und Methoden

Ethanol desinfiziert und das Abdomen geöffnet. Das epididymale weiße Fettgewebe des rechten Nebenhodens, der kaudale Teil des Lobus lateralis sinister der Leber, der rechte Teil des interskapularen braunen Fettgewebes sowie das subkutane weiße Fettgewebe der rechten Flanke wurden herauspräpariert und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung bei -80°C . Das linke epididymale weiße Fettgewebe, ein zu dem bereits entnommenen Lebergewebe angrenzendes Stück des Lobus lateralis sinister, der linke Teil des interskapularen braunen Fettgewebes und das subkutane weiße Fettgewebe der linken Flanke wurden entnommen und mit Roti®-Histofix 4% für 24 h fixiert, anschließend entwässert und in Paraffin eingebettet. Am Leica RM2255 Rotationsmikrotom (Leica Biosystems GmbH, Nussloch) wurden aus den Paraffinblöcken 5 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen, wobei die ersten ca. 1000 – 1500 μm bis zum Erhalt eines großflächig zusammenhängenden Gewebes in der Schnittfläche verworfen wurden. Um eine möglichst repräsentative Analyse des epididymalen weißen Fettgewebes durchführen zu können wurden hier pro Objektträger insgesamt drei Gewebeschnitte unterschiedlicher Tiefe aufgezogen, wobei zwischen den einzelnen Schnitten stets 300 μm verworfen wurden bevor der nächste Schnitt aufgezogen wurde. Das Gewebe wurde abschließend für 1 h bei 60°C auf dem Objektträger hitzefixiert.

2.2.7 Histochemische Färbungen

Das auf Objektträger aufgezogene Gewebe wurde durch dreimalige Behandlung mit Roticlear® (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) für 15 min sowie aufeinanderfolgend für jeweils 2 min mit Ethanol absolut, 96% (V/V) Ethanol und 70% (V/V) Ethanol entparaffiniert. Im Anschluss wurden die Schnitte dreimal mit 1xPBS (Zusammensetzung: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,3 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4) gewaschen und mit den ab Abschnitt 2.2.7.2 detailliert beschriebenen Färbungen fortgefahren.

Nach erfolgter Färbung wurde das Gewebe abschließend durch Behandlung mit der aufsteigenden Alkoholreihe (70% (V/V) Ethanol, 96% (V/V) Ethanol, Ethanol absolut für jeweils 2 min) sowie Roticlear® (5 min) entwässert und mit Roti®-Mount (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) Medium eingedeckt.

Material und Methoden

2.2.7.1 Verwendete Antikörper und Bindeproteine

Tabelle 4: In der Histochemie verwendete Antikörper und Bindeproteine

ANTIKÖRPER / BINDEPROTEIN	KATALOGNUMMER	FIRMA	EINGESETZTE KONZENTRATION
anti-Maus MAC2 (Ratte)	CL8942AP	Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada	1 : 600
anti-Maus UCP-1 (Kaninchen)	ab10983	Abcam, Cambridge, MA, USA	1 : 500
biotinyliertes GSL I - Isolectin B4	B-1205	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	1 : 100
anti-Kaninchen-IgG2a HRP (Ziege)	NB7126	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	1 : 600
anti-Kaninchen IgG-HRP (Ziege)	sc2004	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	1 : 200
Streptavidin-CY5 (ZyMax™)	43-8316	Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MO, USA	1 : 50

2.2.7.2 Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung

Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für 1 min mit Hämalaun-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) behandelt und über 5 min mit Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgte die Färbung mit einer 1% (m/V) Eosin-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) für 1 min.

2.2.7.3 MAC2 Färbung

Die Gewebeschnitte wurden für 1 h mit einer Lösung aus 2% BSA / 10% FCS in 1xPBS bei Raumtemperatur blockiert und danach über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit dem anti-Maus-MAC2 Primärantikörper (s. Tabelle 4) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit 1xPBS gewaschen und zur Inaktivierung von Peroxidasen für 5 min mit einer 3% H₂O₂-Lösung blockiert. Erneut wurde dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit dem anti-Kaninchen IgG2a HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (s. Tabelle 4) in einer feuchten Kammer für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligen Waschen mit 1xPBS und 10-minütiger Behandlung mit 50 mM Trispuffer (pH 7,6) wurde mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB Reagenz, Zytomed, Berlin) detektiert. Die Kernfärbung erfolgte wiederum mit Hämalaun-Lösung.

Für die Auswertung der MAC2-Färbung im epididymalen Fettgewebe wurden am Axioimager.M2 Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) 6 Bilder divergierender

Material und Methoden

Gewebeareale aufgenommen. Die Anzahl der MAC2-positiven kronenartigen Strukturen wurden auf die Gesamtzahl der ausgewerteten Adipozyten korrigiert.

2.2.7.4 UCP-1 Färbung

Vor der Blockierung mit 2% BSA / 10% FCS in 1xPBS wurde eine hitzeinduzierte Antigen-Demaskierung durchgeführt, wozu die Gewebeschnitte für 15 min mit Citratpuffer (*HIER Citrate Buffer pH 6,0*, Zytomed, Berlin) im Dampfgarer gekocht wurden. Nach Abkühlung und dreimaligem Waschen mit 1xPBS wurde wiederum für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Mit Ausnahme des hier verwendeten anti-Maus-UCP-1 als Primär- bzw. anti-Kaninchen IgG HRP als Sekundärantikörper (s. Tabelle 4) wurde im weiteren Verlauf der Färbung wie unter 2.2.7.2. beschrieben verfahren.

2.2.7.5 Isolectin B4 Färbung

Wie im Fall der UCP-1 Färbung wurden zunächst die Antigene durch 25 min Kochen im Dampfgarer demaskiert. Da zur Färbung der α -Galactose Epitope auf Endothelzellen biotinyliertes Isolectin B4 (s. Tabelle 4) eingesetzt wurde, musste vorerst für jeweils 10 min mit Avidin und Biotin (*Avidin Biotin Blocking System*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) blockiert werden. Im Anschluss erfolgte die Blockierung mit 2% BSA / 10% FCS in 1xPBS für 1 h. Danach wurden die Gewebeschnitte über Nacht bei 4°C mit dem biotinylierten Isolectin B4 inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit 1xPBS gewaschen und zur Detektion der Biotinreste am Isolectin B4 für 1 h im Dunkeln mit Cy5-gekoppeltem Streptavidin (s. Tabelle 4) behandelt. Im Gegensatz zu den anderen Färbungen wurden die Objektträger hier nach der Entwässerung mit der aufsteigenden Alkoholreihe und Roticlear® mit Roti®-Mount FluorCare DAPI (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) eingedeckt, wodurch zeitgleich eine Färbung der Kerne mit DAPI erfolgte.

Für die Auswertung wurden am Axioimager.M2 Mikroskop pro Maus 5 Bilder unterschiedlicher Areale des braunen Fettgewebes aufgenommen. Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Fiji (*Fiji is Just ImageJ*) sowie dem Zusatzprogramm Biovoxxel wurde die Isolectin B4 positive Fläche pro Bildausschnitt quantifiziert und als Mittelwert der 5 ausgewerteten Aufnahmen dargestellt.

2.2.8 Analyse der Adipozytengröße

Für die Analyse der Adipozytengröße wurde das H&E gefärbte Fettgewebe verwendet.

Material und Methoden

2.2.8.1 Adipozyten des epididymalen weißen Fettgewebes

Pro Objektträger wurden von jedem der drei aufgezogenen Schnitte 2 Aufnahmen am Axiomager.M2 Mikroskop angefertigt, sodass für jedes Gewebe insgesamt 6 Aufnahmen aus unterschiedlichen Arealen für die Analyse zur Verfügung standen. Die Auswertung erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm Fiji (*Fiji is Just ImageJ*) sowie dem Zusatzprogramm Biovoxxel. In die Auswertung inkludiert wurden Adipozyten, die mindestens eine Fläche von 400 μm^2 und eine möglichst runde Form aufwiesen. Manuell wurden alle nicht-adipozytären Strukturen sowie abgestorbene Adipozyten, erkennbar an den umliegenden kronenartigen Strukturen, aussortiert. Für die Auswertung wurde die mittlere Adipozytengröße (Fläche) pro Maus dargestellt. Weiterhin wurde ein Histogramm erstellt, welches die Größenverteilung der Adipozyten in Form der prozentualen Häufigkeit zeigt.

2.2.8.2 Adipozyten des interskapularen braunen Fettgewebes

Für die Analyse der Adipozytengröße im braunen Fettgewebe wurden 5 Aufnahmen unterschiedlicher Areale am Axiomager.M2 Mikroskop angefertigt. Mit Hilfe der AxioVision Software Version 4.8.3.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH; Jena) wurde pro Aufnahme die Fläche von 10 repräsentativen Adipozyten gemessen und am Ende der Mittelwert aus den insgesamt 50 analysierten Zellen berechnet.

2.2.9 Herstellung und Analyse des Mäuseplasmas

Das Blut für die Plasmagewinnung wurde mittels Herzpunktur entnommen, durch Zugabe von 1 mM EDTA (Merck KGaA, Darmstadt) in 0,9% NaCl (B. Braun AG, Melsungen) antikoaguliert und auf Eis gelagert. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte durch zweifache Zentrifugation. Zunächst wurden die Proben bei 4°C und 800×g für 15 min zentrifugiert und das im Überstand befindliche Plasma in ein neues Reagenzgefäß überführt. Im zweiten Schritt wurde das Plasma für 5 min bei 15.700×g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bis zur Messung bei -20°C eingefroren.

Die Plasmakonzentration von Cholesterolem, HDL und LDL + VLDL wurde mit dem *HDL and LDL/VLDL Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit* (Biovision, Inc., Milpitas, CA, USA) bestimmt. Für die Quantifizierung der Triglyzeride wurde das *Triglyceride Colorimetric Assay Kit* (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) und für die Bestimmung der FFA das *MaxDiscovery™ Non-esterified Fatty Acid (NEFA) Assay Kit* (Bioo Scientific, Austin, TX, USA) verwendet. Die Insulinkonzentration im Plasma wurde mittels *Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit* (Crystal Chem, Inc., Downers Grove, IL, USA) analysiert. Alle genannten Analysen wurden entsprechend der Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Material und Methoden

2.3 Analyse der Genexpression

2.3.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die Isolation der RNA aus Zellen und Gewebe erfolgte nach der Phenol-Chloroform-Methode [146] unter Verwendung des peqGOLD TriFast™ Reagenzes (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml peqGOLD TriFast™ für 15 min lysiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das bei -80°C zwischengelagerte Gewebe wurde durch Zugabe von 1 ml des Reagenzes sowie einer RNase-freien Wolframcarbid-Mahlkugel in einer MM 400 Schwingmühle (beides Retsch GmbH, Haan) dissoziiert. Die RNA-Isolation des Fettgewebes erforderte aufgrund des hohen Lipidgehalts, der sich störend auf die Analyse auswirken kann, einen Zwischenschritt, in dem die dissoziierten Proben bei 12.000×g für 10 min bei 4°C zentrifugiert wurden [141]. Hiernach lassen sich im Reaktionsgefäß drei Phasen unterscheiden: Die obere Phase enthält überschüssige Lipide, die leicht gelblich bis pinkfarbene Interphase enthält die RNA und im Pellet finden sich Extrazellulärmembranen, Polysaccharide und hochmolekulare DNA. Für die weiteren Schritte wurde die RNA-haltige Interphase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im weiteren Verlauf wurden Zellen und Gewebe gleich behandelt. Die lysierten Proben wurden mit 200 µl Chloroform (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich) vermischt und bei 15.700×g für 15 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde die wässrige Phase abpipettiert und in einem neuen Reaktionsgefäß zu gleichen Teilen mit Isopropanol (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich) gemischt. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die gefällte RNA für 45 min bei 15.700×g in der Zentrifuge pelletiert, der Überstand abgesaugt und das RNA-Pellet einmal mit 75% (V/V) Ethanol gewaschen. Abschließend wurde das Pellet erneut bei 15.700×g für 30 min sedimentiert und nach Absaugen des Überstands für 5 – 10 min bei 37°C getrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde die RNA in 15 – 30 µl RNase freiem Wasser (Merck Millipore, Darmstadt) aufgenommen und bei 65°C für 5 min unter Schütteln gelöst. Die Messung von Quantität und Qualität der RNA wurde am NanoDrop 1000 Spektrophotometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) vorgenommen, wobei anschließend nur solche RNA in cDNA umgeschrieben wurde, bei der die [260 nm / 280 nm] und [260 nm / 230 nm] Absorptionsquotienten einen Wert > 1,8 aufwiesen. Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des *QuantiTect Reverse Transcription Kits* (Qiagen, Hilden) mit 1000 ng RNA nach dem Protokoll des Herstellers.

2.3.2 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Analyse der mRNA Genexpression erfolgte am Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) oder StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life

Material und Methoden

Technologies™, Singapur). Für die qPCR wurde der Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) mit zugesetztem ROX-Farbstoff eingesetzt. Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Primer3Plus Software [147] sowie NCBI Primer-BLAST [148] entworfen und über Invitrogen™ (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) bezogen. Die Sequenzen der Primerpaare sind in Tabelle 5 aufgelistet. In den finalen qPCR-Ansätzen betrug die Konzentration des *Forward*- und *Reverse*-Primers jeweils 0,625 µM. Die Konzentration der Proben im Ansatz betrug 2,083 ng/µl, wobei jede Probe als Duplikat gemessen wurde. Die Reaktionsbedingungen für den qPCR-Lauf und die anschließende Dissoziationskurve wurden dem Herstellerprotokoll des Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG entnommen.

Die Auswertung erfolgte mit der jeweils zugehörigen 7300 Real-Time PCR System RQ Study Software Version 1.4 (Applied Biosystems) bzw. StepOne™ Software Version 2.3 (Life Technologies™). Für die relative Quantifizierung wurde nach der $\Delta\Delta C_q$ -Methode [149] vorgegangen, wobei die mRNA Expression der Zielgene auf die Expression der endogenen Kontrolle (18S rRNA) korrigiert wurde.

Tabelle 5: Für die qPCR verwendete Primer und deren Sequenzen

GEN	FORWARD PRIMER 5'-3'	REVERSE PRIMER 5'-3'
18S	GCAATTATCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
Cd44	GACCGGTTACCATAACTATTGTC	CATCGATGTCTTCTTGGTGTG
Cidea	GCAGCCTGCAGGAACCTTATC	TCATGAAATGCGTGTTGTCC
Has1	TATGCTACCAAGTATACCTCG	TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC
Has2	CAAAAATGGGGTGGAAAGAG	ACAGATGAGGCAGGGTCAAG
Has3	CTCAGTGGACTACATCCAGG	GACATCTCCTCCAACACCTC
Hyal1	GAAATGACAGATTATCTTCTGCC	TTGTCTGAGCTTAGCCAGAG
Hyal2	GGTGGACCTTATCTCTACCAT	TATTGGCAGGTCTCCATACTT
Il-1β	GGATGAGGACATGAGCACCT	CGTCACACACCAGCAGGTTA
Il-6	GATGGATGCTACCAAAGTGGG	GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA
Leptin	CAGGGAGGAAAATGTGCTGGAG	CCGACTGCGTGTGTGAAATGTC
Mcp-1	TTCCTTCTTGGGGTCAGCAC	GGCTGGAGAGCTACAAGAGG
Pgc-1α	GCGGACAGAATTGAGAGACC	CATTCTCAAGAGCAGCGAAA
Rhamm	GCAGAAGGAGGAGCAGAGTG	GGCGTGAGCAGCAATATGT
Tnf-α	TCGAGTGACAAGCCTGTAGC	AAGGTACAACCCATCGGCTG
Ucp-1	TCAGGATTGGCCTCTACGAC	TGCCACACCTCCAGTCATTA
Vegf-α	AGCTTCCTACAGCACAGCAG	TGAGAGGTCTGGTTCCCGAA

Material und Methoden

2.4 Statistische Auswertung

Die statische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der GraphPad Prism Software Version 6.02 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Prinzipiell wurde zum Vergleich zweier Datensätze der ungepaarte *Student's t-test* und zum Vergleich mehrerer Datensätze eine *One-way ANOVA* mit zugehörigem *Dunnet's multiple comparisons test* durchgeführt. Bei Vorliegen von zwei beeinflussenden Variablen (z.B. Zeit und Behandlung bei Toleranztests oder Gewichtsverläufen) wurde eine *Two-way ANOVA* mit anschließendem *Sidak's multiple comparison test* angewandt. Im Fall von Zellkultur-Versuchen, bei denen die Werte als Vielfaches einer Kontrolle mit konstantem Wert dargestellt wurden, diente der gepaarte *Wilcoxon signed-rank test* dem Vergleich von zwei gepaarten Datensätzen sowie der *Friedman test* (gepaarte Datensätze) oder der *Kruskal-Wallis test* (nicht gepaarte Datensätze) mit anschließendem *Dunn's multiple comparisons test* dem Vergleich mehrerer Datensätze. Um von einer Normalverteilung ausgehen zu können, wurden die auf einer exponentiellen Funktion beruhenden Daten der mRNA Genexpression für die statistische Auswertung logarithmiert.

Mit Hilfe des Grubb's Tests wurden Ausreißer identifiziert und von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Bei Vorliegen eines p-Wertes $< 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant unterschiedlich gewertet.

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des HA-Systems während der adipogenen Differenzierung und der Entstehung von Adipositas

Zunächst sollte charakterisiert werden, ob bzw. inwiefern HA und HA-assoziierte Gene im Rahmen der Adipozytendifferenzierung sowie der Entstehung von Adipositas und Insulinresistenz Veränderungen unterliegen. Die Veränderungen während der Adipogenese wurden an der etablierten Zelllinie 3T3-L1 *in vitro* untersucht. *In vivo* wurde der Einfluss einer Adipositas und Insulinresistenz sowohl im braunen als auch im weißen Fettgewebe in C57BL/6J Mäusen analysiert.

3.1.1 Veränderungen im HA-System während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen

Zur Charakterisierung des HA-Systems im Verlauf der adipogenen Differenzierung wurden 3T3-L1 Zellen nach dem beschriebenen Standardprotokoll differenziert und zu verschiedenen Zeitpunkten im Hinblick auf HA-Sekretion und mRNA Expression der *Has*, *Hyls* und HA-Rezeptoren *Cd44* und *Rhamm* untersucht. Im Einklang mit anderen Studien zu 3T3-L1 Zellen, welche einen Anstieg der HA-Synthese [132, 134] sowie der *Has2* mRNA [133] im Verlauf der Differenzierung beschreiben, konnte auch hier eine signifikant gesteigerte HA-Sekretion im Überstand der 3T3-L1 Zellen 48 h nach Induktion der Adipogenese detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Differenzierung sank die HA-Konzentration im Überstand wieder auf Basalniveau (s. Abbildung 10A). Weiterhin konnte ebenfalls eine Induktion der *Has2* mRNA sowie der *Rhamm* mRNA 48 h nach Differenzierung gezeigt werden (s. Abbildung 10B und D). Im Fall der *Has3*, *Cd44*, *Hyal1* und *Hyal2* mRNA konnten keine signifikanten Veränderungen im Zeitverlauf der Differenzierung festgestellt werden (s. Abbildung 10C, E-G). Die Expression der *Has1* mRNA war in 3T3-L1 Zellen nicht nachweisbar.

Ergebnisse

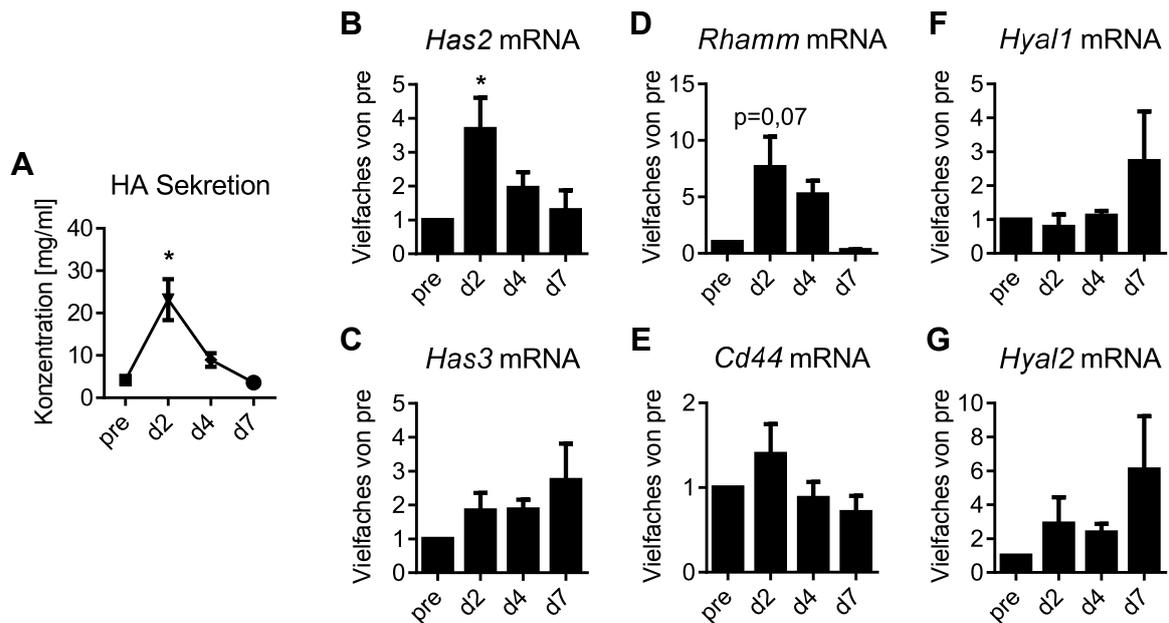


Abbildung 10: Veränderungen im HA-System während der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen.

A, Konzentration der innerhalb von 24 h sekretierten HA im Überstand von 3T3-L1 Zellen, gemessen mittels HA-Bindeprotein Sandwich ELISA-ähnlichem Assay, $n = 4-5$. **B-G**, Expression der *Has2*, *Has3*, *Rhamm*, *Cd44*, *Hyal1* und *Hyal2* mRNA im Zeitverlauf der Differenzierung der 3T3-L1 Zellen, $n = 5-7$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$. pre = Präadipozyten, d2 = Tag 2 (48 h nach Differenzierung), d4 = Tag 4 (96 h nach Differenzierung) und d7 = Tag 7 (168 h nach Differenzierung).

3.1.2 Genexpression der Has und HA-Rezeptoren im Modell der Diät-induzierten Adipositas in C57BL/6J Mäusen

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss einer Adipositas und Insulinresistenz auf die Genexpression der HAS und HA-Rezeptoren im Fettgewebe *in vivo* untersucht werden. Zunächst sollte verifiziert werden, dass durch Fütterung einer diabetogenen Diät (DD) in C57BL/6J Mäusen tatsächlich eine Adipositas und Insulinresistenz induziert wird. Hierzu wurden Mäuse über 16 Wochen mit einer DD vs. Kontrolldiät gefüttert. Während der Fütterung über 16 Wochen konnte eine deutliche Steigerung der Gewichtszunahme unter DD im Vergleich zur Kontrolldiät beobachtet werden (s. Abbildung 11A). Außerdem zeigte sich nach 13 Wochen Fütterung im Glukosetoleranztest eine signifikant verschlechterte Glukosesensitivität in der Gruppe DD-gefütterter Mäuse (s. Abbildung 11B). Somit konnte bestätigt werden, dass das vorliegende Modell für Untersuchungen einer Diät-induzierten Adipositas geeignet ist. Nach 16 Wochen Fütterung wurde schließlich das braune interskapulare sowie das weiße epididymale Fettgewebe aus C57BL/6J Mäusen entnommen und die Genexpression mittels qPCR analysiert.

Ergebnisse

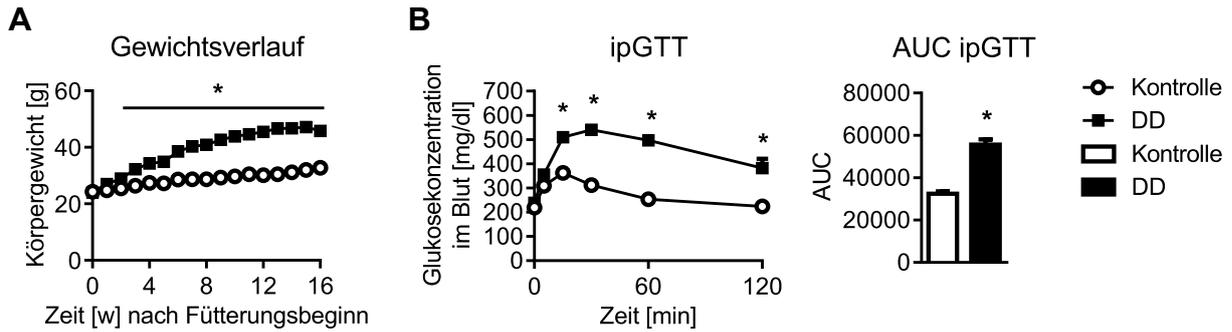


Abbildung 11: Induktion einer Adipositas und Insulinresistenz in C57BL/6J Mäusen nach Fütterung einer DD vs. Kontrolldiät.

A, Körpergewicht während der Fütterung über 16 Wochen, $n = 4-6$. **B**, Absolute Blutglukosekonzentration im Verlauf des ipGTT nach 13 Wochen Fütterung sowie zugehörige AUC, $n = 7$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $*p < 0,05$.

3.1.2.1 Genexpression im braunen interskapularen Fettgewebe

Nach 16 Wochen Fütterung konnte im braunen Fettgewebe der DD-gefütterten Tiere eine signifikante Induktion der *Has1* und *Has2* mRNA, jedoch keine Veränderung der *Has3*, *Hyal1* und *Hyal2* mRNA beobachtet werden. Die Genexpression der HA-Rezeptoren *Cd44* und *Rhmm* wurde unter diabetogenen Bedingungen wiederum stark induziert.

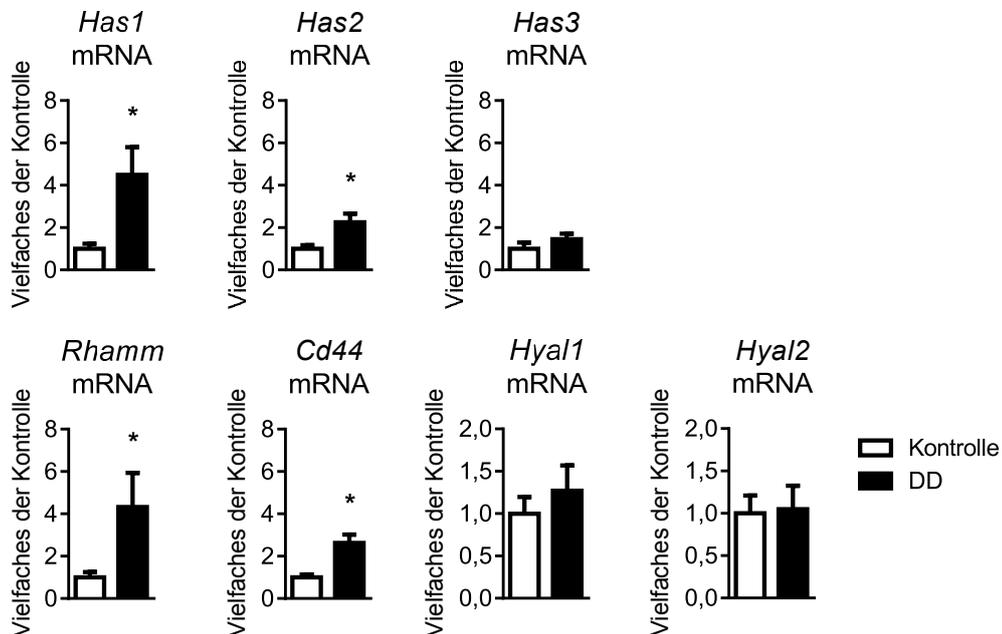


Abbildung 12: Veränderungen der mRNA Expression HA-assoziiierter Gene im braunen Fettgewebe adipöser C57BL/6J Mäuse.

Has1-3, *Rhmm*, *Cd44*, *Hyal1* und *Hyal2* mRNA Expression nach 16 Wochen Fütterung einer DD vs. Kontrolldiät, $n = 8-9$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, $*p < 0,05$.

Ergebnisse

3.1.2.2 Genexpression im weißen epididymalen Fettgewebe

Analog zu den Ergebnissen aus dem braunen Fettgewebe konnte auch im epididymalen weißen Fettgewebe nach 16 Wochen Fütterung ein deutlicher Trend zu einer gesteigerten *Has1* mRNA Expression sowie eine signifikant erhöhte *Has2* mRNA Expression in adipösen Mäusen gezeigt werden. Erneut zeigte sich keine Veränderung der *Has3* mRNA Expression in Folge der diabetogenen Fütterung, wohl aber eine starke Induktion der HA-Rezeptoren *Rhmm* und *Cd44*. Für die *Hyal1* und *Hyal2* mRNA Expression konnte eine tendenziell verstärkte Expression nach Diät-induzierter Adipositas beobachtet werden.

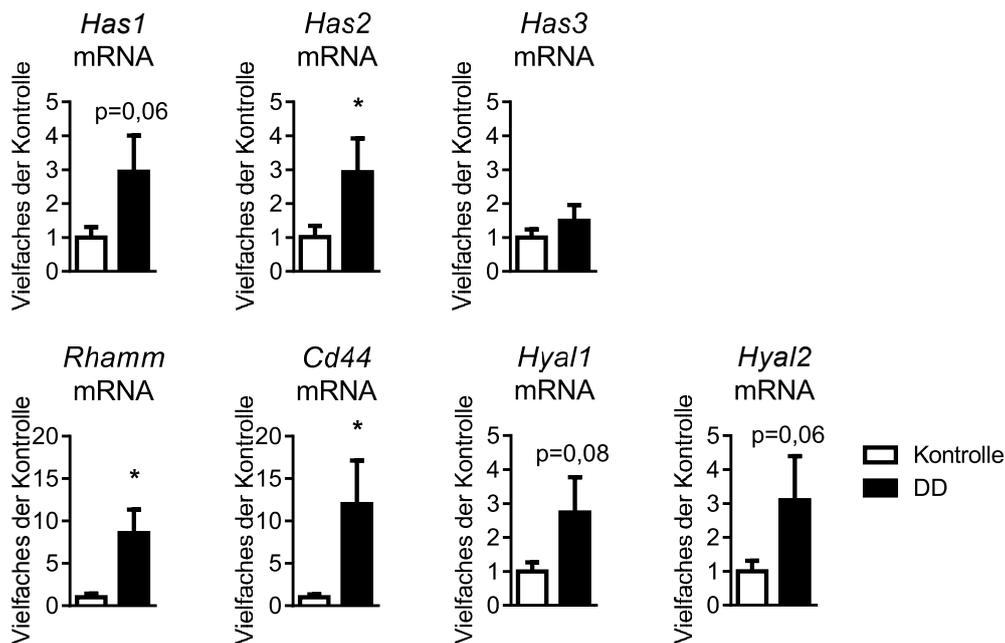


Abbildung 13: Veränderungen der mRNA Expression HA-assoziiierter Gene im weißen Fettgewebe adipöser C57BL/6J Mäuse.

Has1-3, *Rhmm*, *Cd44*, *Hyal1* und *Hyal2* mRNA Expression nach 16 Wochen Fütterung einer DD vs. Kontrolldiät, n = 8-9. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *p < 0,05.

3.2 Inhibition der HA-Synthese und des HA-Signalings *in vitro*

Im Folgenden sollte aufgeklärt werden, inwieweit die beobachtete Steigerung der HA-Synthese sowie ein HA-Signaling über die verstärkt exprimierten Rezeptoren RHAMM und CD44 für die Differenzierung und Lipidakkumulation von Adipozyten essentiell ist.

3.2.1 Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU-Natriumsalz

Zunächst wurden Präadipozyten aus stromal-vaskulären Zellen des braunen und weißen Fettgewebes isoliert und der Einfluss einer Inhibition der HA-Synthese auf die Differenzierung analysiert. Hierzu wurden die Zellen ab Induktion der Differenzierung kontinuierlich mit 100 μ M

Ergebnisse

4-MU-Natriumsalz behandelt. Eine Woche nach Differenzierung wurden die ausgereiften braunen und weißen Adipozyten mit dem fettlöslichen Farbstoff Ölrot O angefärbt. Die 4-MU-behandelten Zellen zeigten eine signifikant reduzierte Lipidakkumulation (s. Abbildung 14A und B). Die mikroskopischen Aufnahmen verdeutlichen, dass unter 4-MU eine geringere Anzahl ausdifferenzierter Adipozyten vorlag. Die Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU führte in isolierten Präadipozyten somit zu einer Reduktion der Adipogenese und Lipidakkumulation.

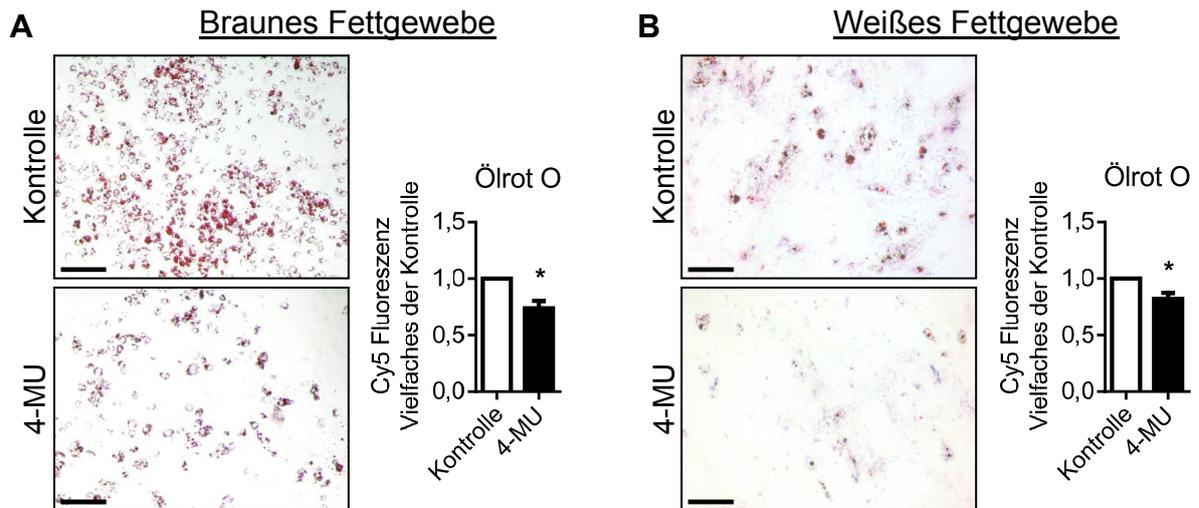


Abbildung 14: Differenzierung isolierter Fettgewebs-Präadipozyten unter Behandlung mit 4-MU-Natriumsalz.

Repräsentative Aufnahmen der Ölrot O Färbung differenzierter brauner (A) und weißer (B) Adipozyten mit zugehöriger quantitativer Auswertung der Ölrot O Intensität, n = 7 (A), n = 6 (B). Maßstabsbalken entspricht 200 μ m. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *p < 0,05.

Um zu verifizieren, dass der beobachtete 4-MU Effekt tatsächlich im Zusammenhang mit einer reduzierten HA-Konzentration steht, wurden weiterführende Experimente an 3T3-L1 Zellen vorgenommen. Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass auch die Behandlung der 3T3-L1 Zellen mit 100 μ M 4-MU zu einer verringerten Differenzierung der Adipozyten führt. Allerdings konnte der inhibitorische Effekt von 4-MU durch exogene Zugabe hochmolekularer HA (HMW-HA) zu Zellen, die bereits für 24 h mit 4-MU behandelt waren, aufgehoben werden. In einem weiteren Ansatz wurden 3T3-L1 Zellen 24 h nach Induktion der Adipogenese mit Hyaluronidase (2 U/ml) behandelt, um so dem beschriebenen Anstieg der HA-Konzentration in der frühen Phase der Differenzierung entgegenzuwirken. Auch die somit ausgelöste Degradation der HA konnte eine Reduktion der adipogenen Differenzierung hervorrufen (s. Abbildung 15A). Für die beschriebenen Experimente in 3T3-L1 Zellen wurde neben der Ölrot O Färbung auch eine Analyse der mRNA Expression des Adipozytenmarkers *Leptin*

Ergebnisse

durchgeführt (s. Abbildung 15B). Leptin wird von 3T3-L1 Präadipozyten kaum, im Verlauf der Adipozytenreifung jedoch immer stärker exprimiert. Die Reduktion der *Leptin* Genexpression in 4-MU und Hyaluronidase behandelten 3T3-L1 Zellen bestärkt damit die Ergebnisse der Ölrot O Färbung sowie die Hypothese, dass die Anwesenheit von HA für die adipogene Differenzierung und damit einhergehend für die Speicherung von Lipiden in Adipozyten *in vitro* notwendig ist.

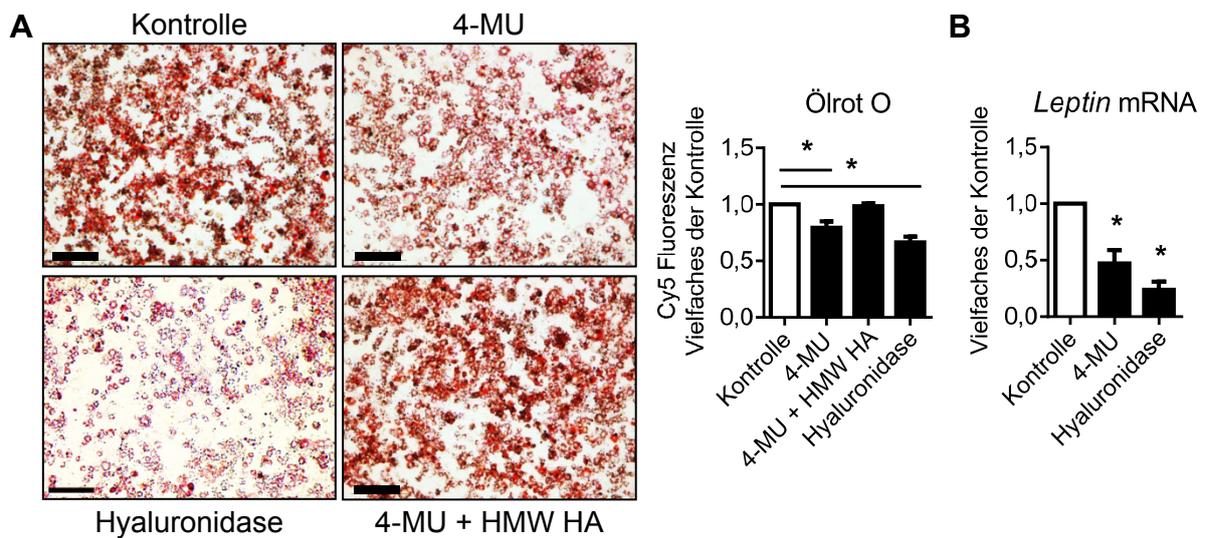


Abbildung 15: Behandlung mit 4-MU, HMW-HA und Hyaluronidase in 3T3-L1 Zellen.

A, Ölrot O Färbung differenzierter 3T3-L1 Zellen, unbehandelte Kontrolle vs. 4-MU, Hyaluronidase und 4-MU + HMW-HA Behandlung. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen (Maßstabsbalken 200 μ m) sowie die quantitative Auswertung der Färbung, n = 6. **B**, Analyse der *Leptin* mRNA Expression in differenzierten 3T3-L1 Zellen unter 4-MU und Hyaluronidase Behandlung, n = 4-5. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *p < 0,05.

3.2.2 Transfektion von siRNA in 3T3-L1 Zellen

Für eine genauere mechanistische Untersuchung zur Rolle der HA in der Adipogenese wurden 3T3-L1 Zellen mit siRNA transfiziert. Es ist bekannt, dass 3T3-L1 Präadipozyten für die Konversion in reife Adipozyten zu Beginn ein Stadium des Wachstumsarrests [140, 150] sowie direkt im Anschluss eine klonale Expansion [19] durchlaufen müssen. Damit der *Knockdown* der Zielgene bereits in diesen kritischen Stadien der Adipogenese vorliegt, wurde die Transfektion der 3T3-L1 Zellen noch vor Induktion der Differenzierung durchgeführt. Nach 72 h erfolgte die Bestimmung der Knockdown-Effizienz mittels qPCR (s. Abbildung 16A). Die ausgereiften Adipozyten wurden schließlich wieder mit Hilfe der Ölrot O Färbung analysiert (s. Abbildung 16B). Der *Knockdown* der *Has2* führte zu einer signifikanten Abnahme der Differenzierung von 3T3-L1 Zellen. Dahingegen konnte durch den *Knockdown* der *Has3* kein

Ergebnisse

Effekt auf die Adipogenese detektiert werden. Dies untermauert die eingangs formulierte Hypothese, dass insbesondere die HAS2-vermittelte HA-Synthese für die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen von Nöten ist. Des Weiteren zeigte sich eine verminderte Lipidakkumulation nach *Knockdown* der HA-Rezeptoren *Rhmm* und *Cd44*, was zudem die Annahme einer pro-adipogenen HA-Signaltransduktion im Rahmen der frühen Differenzierung der 3T3-L1 Zellen weiter bestärkt.

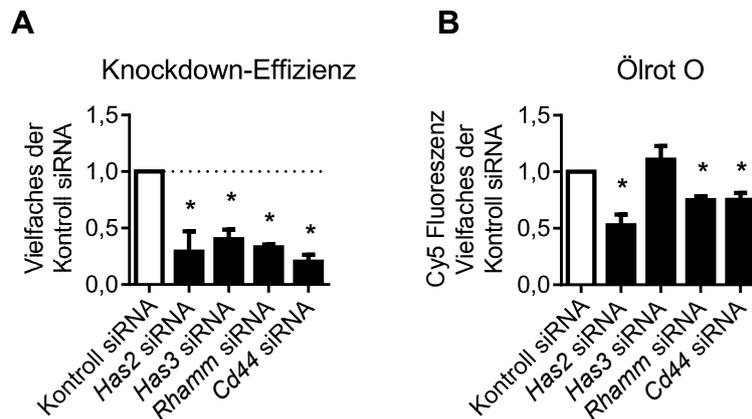


Abbildung 16: Transfektion von siRNA in 3T3-L1 Zellen.

A, Bestimmung der *Knockdown*-Effizienz 72 h nach Transfektion der *Has2*, *Has3*, *Rhmm* oder *Cd44* siRNA, n = 4 (*Has2*, *Rhmm*, *Cd44* siRNA), n = 6 (*Has3* siRNA). **B**, Quantitative Analyse der Ölrot O Färbung in differenzierten 3T3-L1 Zellen nach siRNA Transfektion mittels RNAiMAX, n = 7 (*Has2* siRNA), n = 9 (*Has3*, *Rhmm*, *Cd44* siRNA). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *p < 0,05.

3.3 Effekt einer 4-MU-vermittelten Inhibition der HA-Synthese *in vivo*

Weiterführend sollte der Effekt einer 4-MU-vermittelten Inhibition der HA-Synthese in einem *in vivo* Modell untersucht werden. Hierzu wurde in 8 – 10 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen durch diabetogene Fütterung über 22 Wochen eine Adipositas ausgelöst. Die Tiere wurden dazu entweder mit diabetogener Diät (DD) als Kontrolle oder DD plus 50 g/kg 4-MU (DD 4-MU) gefüttert. Im Zeitverlauf wurden die Gewichts- und Körperfettzunahme, die Glukose- und Insulintoleranz sowie der Energieumsatz der Tiere untersucht. Nach Tötung der Mäuse erfolgte die morphologische und molekularbiologische Analyse des braunen und weißen Fettgewebes sowie der Leber. Weiterhin wurde die Insulin- und Lipidkonzentration im Plasma untersucht.

Ergebnisse

3.3.1 Analyse der Gewichts- und Körperfettzunahme unter Behandlung mit 4-MU

Zur Analyse der Gewichtszunahme wurden die Mäuse einmal wöchentlich gewogen. Dabei zeigte sich in der Gruppe der DD 4-MU-behandelten Tiere bereits nach 5 Wochen eine signifikant geringere Gewichtszunahme als in den DD-gefütterten Kontrolltieren. Der Gewichtsunterschied blieb im Folgenden über die gesamte Fütterungszeit bestehen (s. Abbildung 17A). Weiterhin konnten NMR Untersuchungen der Tiere nach 5, 11 und 17 Wochen Fütterung bestätigen, dass der Körperfettanteil in Bezug auf die Gesamtkörpermasse der Tiere (= Körperfett- plus Magermasse) in der 4-MU-behandelten Gruppe deutlich reduziert war (s. Abbildung 17B). Um auszuschließen, dass die detektierten Unterschiede nur auf einer verringerten Futteraufnahme der 4-MU-behandelten Mäuse beruhen, wurde im Rahmen der metabolischen Untersuchung im *TSE Phenomaster* die Menge des aufgenommenen Futters pro Maus kontrolliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass keine nachweisbaren Unterschiede in der Futteraufnahme zwischen den Gruppen vorlagen (s. Abbildung 17C). Folglich schien der positive Effekt auf die Gewichtszunahme und Fettakkumulation spezifisch durch die Behandlung der C57BL/6J Mäuse mit 4-MU zustande zu kommen.

Ergebnisse

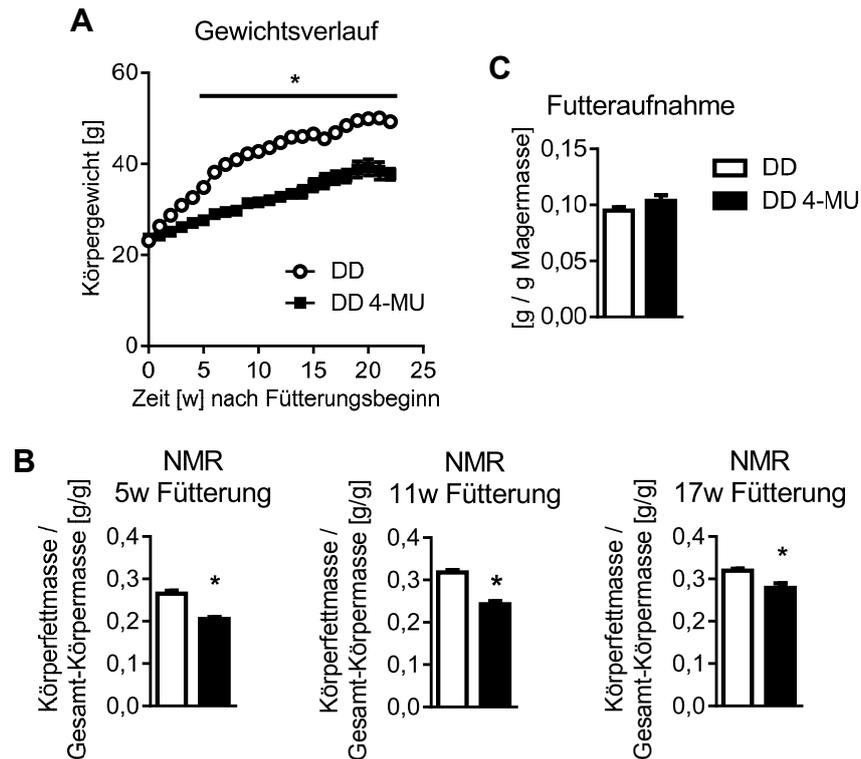


Abbildung 17: Körpergewicht, Körperfettmasse und Futtermenge von C57BL/6J Mäusen gefüttert mit DD ± 4-MU.

A, Gewichtsverlauf während der diabetogenen Fütterung über 22 Wochen, n = 8-9. **B**, NMR Analysen zur Bestimmung des Körperfettanteils pro Gesamt-Körpermasse, bestimmt nach 5 (n = 12-14), 11 und 17 Wochen (n = 8-9) Fütterung. **C**, Analyse der innerhalb von 24 h aufgenommenen Futtermenge während der Messung im *TSE Phenomaster* nach 11 Wochen Fütterung, korrigiert für die Magermasse des jeweiligen Tiers, n = 5-6. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, *p < 0,05.

3.3.2 Effekt von 4-MU auf die Glukose- und Insulintoleranz

Anknüpfend wurde die Frage adressiert, ob sich die demonstrierten Gewichtsunterschiede auch auf die systemische Glukose- und Insulintoleranz der Mäuse auswirken. Hierzu wurde nach 13 Wochen Fütterung ein ipGTT sowie nach 14 Wochen Fütterung ein ITT durchgeführt. In den Tests konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit 4-MU zu einer verbesserten Glukosetoleranz führt, gekennzeichnet durch einen geringeren Anstieg der Blutglukosekonzentration nach Injektion der Glukose (1 g/kg KG) sowie einer geringeren zugehörigen AUC in der 4-MU-behandelten Gruppe (s. Abbildung 18A). Auch die Insulinsensitivität schien unter 4-MU Behandlung verbessert, da die Tiere der 4-MU Gruppe im ITT auf das injizierte Insulin (0,75 U/kg KG) mit einem stärkeren Abfall der Blutglukosekonzentration reagierten, einhergehend mit einer signifikant geringeren AUC (s. Abbildung 18B). Da bekannt ist, dass Adipositas und Insulinresistenz gegenregulatorisch

Ergebnisse

zu einer verstärkten Freisetzung von Insulin aus dem Pankreas führen [151, 152], wurde zusätzlich die Insulinkonzentration im Plasma der diabetogen gefütterten Tiere untersucht. Dabei konnte demonstriert werden, dass die 4-MU Behandlung zu einer reduzierten Insulin-Plasmakonzentration im Vergleich zur Kontrolle führt (s. Abbildung 18C). Dies wiederum lässt auf verringerte Insulinresistenz in 4-MU-behandelten Mäusen schließen.

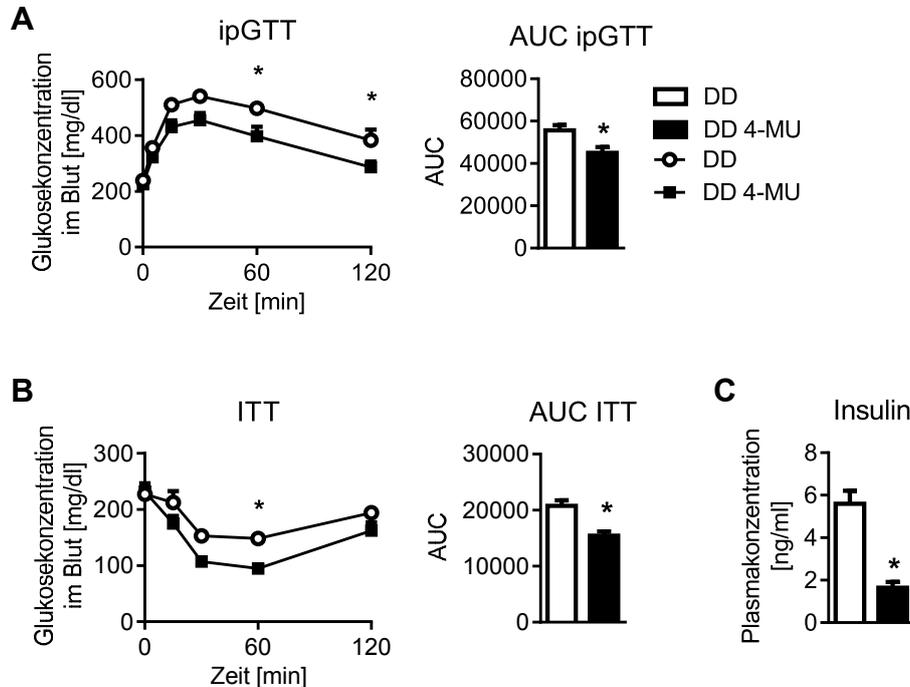


Abbildung 18: Bestimmung der Glukose- und Insulintoleranz in C57BL/6J gefüttert mit DD ± 4-MU.

A, Absolute Blutglukosekonzentration sowie zugehörige AUC des ipGTT nach 13 Wochen Fütterung, n = 7-8. **B**, Absolute Blutglukosekonzentration sowie zugehörige AUC des ITT nach 14 Wochen Fütterung, n = 8. **C**, Mittels ELISA bestimmte Insulinkonzentration im Plasma nach 22 Wochen Fütterung, n = 6-7. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, *p < 0,05.

3.3.3 Analyse der Hypertrophie und Inflammation im weißen Fettgewebe

Durch Adipositas ausgelöste pathologische Veränderungen im weißen Fettgewebe, wie beispielsweise exzessive Hypertrophie, Hypoxie und Inflammation, können maßgeblich zu der Entwicklung einer Insulinresistenz beitragen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Inhibition der HA-Akkumulation durch 4-MU auch auf Ebene des epididymalen weißen Fettgewebes einer Insulinresistenz entgegenwirkt. Nach 22 Wochen Fütterung DD ± 4-MU wiesen Tiere, die mit 4-MU behandelt wurden, ein signifikant geringeres Gewicht des linken epididymalen Fettablappens auf (s. Abbildung 19A). Darüber hinaus zeigte sich unter Fütterung mit 4-MU auch eine Reduktion der Adipozytengröße (s. Abbildung 19B), was besonders in der

Ergebnisse

prozentualen Größenverteilung der weißen Adipozyten deutlich wird: In 4-MU-behandelten Mäuse konnten im Vergleich zur Kontrolle prozentual mehr kleine, jedoch weniger große Adipozyten detektiert werden (s. Abbildung 19C).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die reduzierte Adipozytenhypertrophie nach 4-MU Behandlung auch auf inflammatorische Prozesse des weißen Fettgewebes Einfluss nimmt. Entzündetes Fettgewebe ist gekennzeichnet durch das Auftreten sogenannter kronenartiger Strukturen, welche positiv für den auf Makrophagen zu findenden Oberflächenmarker MAC2 sind. In der immunhistochemischen MAC2 Färbung zeigte sich tatsächlich eine reduzierte Anzahl der kronenartigen Strukturen im epididymalen Fettgewebe 4-MU-behandelter Tiere (s. Abbildung 19D). Unterstützend konnte außerdem demonstriert werden, dass die Genexpression der inflammatorischen Marker *Mcp-1* und *Il-1 β* im epididymalen Fettgewebe signifikant sowie *Tnf- α* und *Il-6* tendenziell reduziert war (s. Abbildung 19E).

Zusammenfassend scheint also die verringerte Gewichtszunahme und verbesserte Insulintoleranz in 4-MU-behandelten Mäusen mitunter in einer reduzierten Adipozytenhypertrophie und –inflammation begründet zu sein.

Ergebnisse

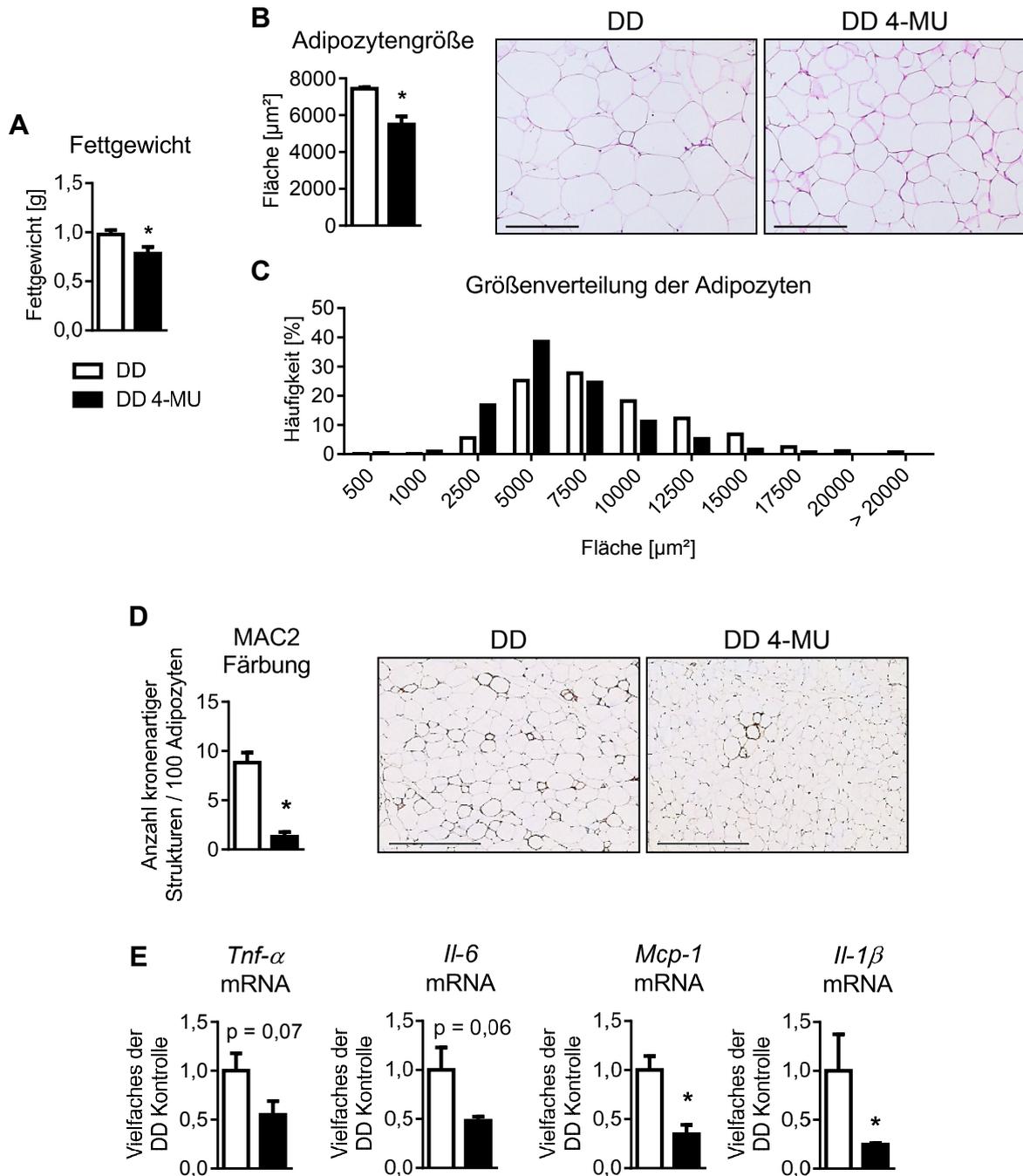


Abbildung 19: Effekt der 4-MU Behandlung auf Hypertrophie und Inflammation im weißen Fettgewebe von DD-gefütterten C57BL/6J.

A, Gewicht des linken epididymalen Fettablappens bei Entnahme nach 22 Wochen Fütterung, n = 11. **B**, Analyse der Adipozytengröße im epididymalen weißen Fettgewebe nach 22 Wochen Fütterung sowie repräsentative Aufnahmen der zugrunde liegenden H&E Färbung (Maßstabsbalken = 200 µm). **C**, Prozentuale Größenverteilung der Adipozyten. **D**, Quantitative Auswertung sowie repräsentative Aufnahmen der MAC2 Färbung aus dem epididymalen Fettgewebe. Maßstabsbalken entspricht 500 µm. **E**, mRNA Expression der inflammatorischen Gene *Tnf-α*, *Il-6*, *Mcp-1* und *Il-1β*. Daten aus **B-E** beruhen auf n = 6-7. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM, *p < 0,05.

Ergebnisse

3.3.4 Untersuchung der Lipidakkumulation der Leber sowie des basalen Energieumsatzes der Mäuse

Wie zuvor beschrieben, konnte kein Unterschied in der aufgenommenen Futtermenge zwischen Kontrolle und 4-MU-gefütterten C57BL/6J Mäusen nachgewiesen werden. Daher stellte sich die Frage, was in den 4-MU-behandelten Tieren mit der überschüssigen Menge an aufgenommenen Kalorien passiert, wenn deren Speicherung in Form von Triglyzeriden im Fettgewebe offenbar deutlich reduziert ist. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Leber der beiden Versuchsgruppen analysiert, da bekannt ist, dass bei mangelnder oder erschöpfter Triglyzeridspeicherung im Fettgewebe eine ektope Lipidakkumulation in der Leber erfolgen kann [153, 154]. In der H&E Färbung der Leberpräparate konnte eine deutliche Leberverfettung der DD-gefütterten Tieren demonstriert werden, welche in der 4-MU-gefütterten Gruppe jedoch nahezu vollständig unterdrückt war (s. Abbildung 20A). Auch das Gewicht der Leber war nach 16 Wochen Fütterung mit DD plus 4-MU reduziert (s. Abbildung 20B). Demzufolge führte die Behandlung der Mäuse mit 4-MU nicht zu einer ektope Lipidakkumulation in der Leber, sondern schien vielmehr auch vor der Entstehung einer durch Adipositas und Insulinresistenz hervorgerufenen Fettleber zu schützen.

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob die Fütterung mit 4-MU zu Veränderungen im basalen Energieumsatz der Mäuse und damit zu einer verstärkten Kalorienverbrennung führt. Hierzu wurden die Tiere nach 11 Wochen Fütterung mittels Messung im *TSE Phenomaster* indirekt kalorimetrisch untersucht. Tatsächlich konnte in der nächtlichen, aktiven Phase der Mäuse eine signifikante Steigerung des Sauerstoffverbrauchs als Maß für eine Erhöhung des basalen Energieumsatzes gemessen werden (s. Abbildung 20C). Daraus kann geschlossen werden, dass die Reduktion von Adipositas und Insulinresistenz unter Behandlung mit 4-MU mit einer erhöhten Verbrennung aufgenommener Kalorien einhergeht.

Ergebnisse

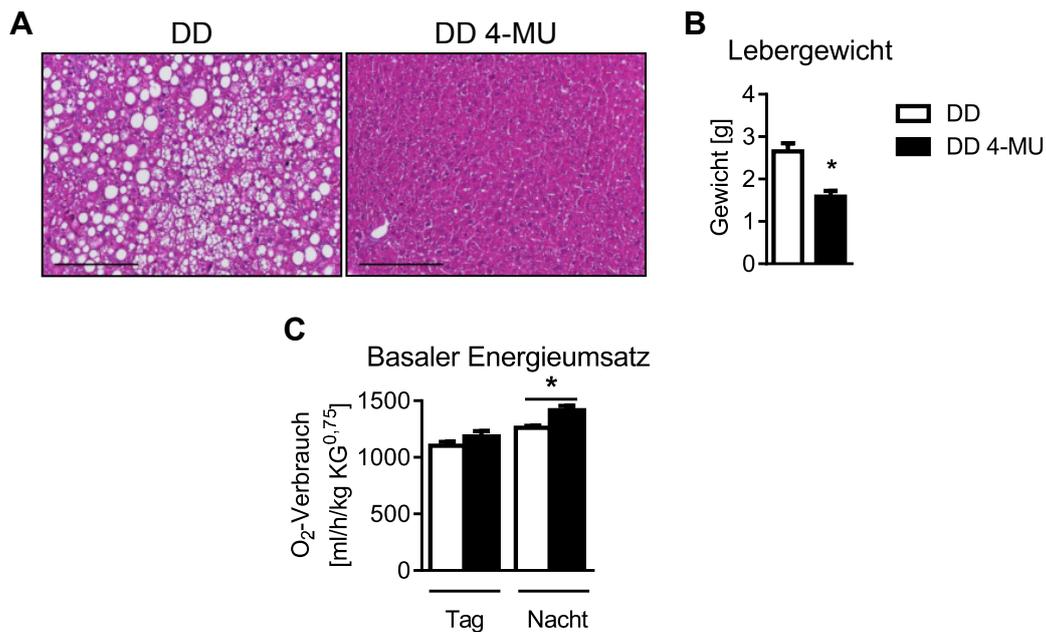


Abbildung 20: Lipidakkumulation in der Leber und basaler Energieumsatz von C57BL/6J Mäusen gefüttert mit DD ± 4-MU.

A, Repräsentative Aufnahmen der H&E Färbung der Leber (Maßstabsbalken = 200 µm) und **B**, Bestimmung des Lebergewichts nach 16 Wochen Fütterung DD ± 4-MU, n = 10-11. **C**, Analyse des basalen Energieumsatzes mittels indirekter Kalorimetrie nach 11 Wochen Fütterung, n = 4-6. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, *p < 0,05.

3.3.5 Veränderungen im braunen Fettgewebe unter Behandlung mit 4-MU

Um aufzuklären, ob die beschriebene Veränderung des Energieumsatzes unter 4-MU Behandlung aus einer erhöhten Aktivität des braunen Fettgewebes und damit einer gesteigerten Thermogenese resultiert, wurde im Folgenden das braune Fettgewebe der C57BL/6J Mäuse analysiert. Passend zu den *in vitro* Daten, die eine Hemmung der Differenzierung brauner Adipozyten durch 4-MU zeigten, konnte *in vivo* ein verringertes Gewicht des braunen Fettgewebes detektiert werden (s. Abbildung 21A). Nicht nur das Gewebe an sich, auch die braunen Adipozyten waren unter 4-MU Behandlung im Vergleich zur Kontrolle deutlich kleiner und zeigten weniger Lipidakkumulation (s. Abbildung 21B). Mit Hilfe der qPCR konnte eine signifikante Induktion der mRNA Expression der Aktivierungsmarker *Ucp-1*, *Cidea* und *Pgc-1α* demonstriert werden (s. Abbildung 21C). Auch die immunhistochemische Färbung für UCP-1 zeigte eine deutliche Steigerung des mitochondrialen Markers im braunen Fettgewebe 4-MU-behandelter Tiere (s. Abbildung 21D).

Ergebnisse

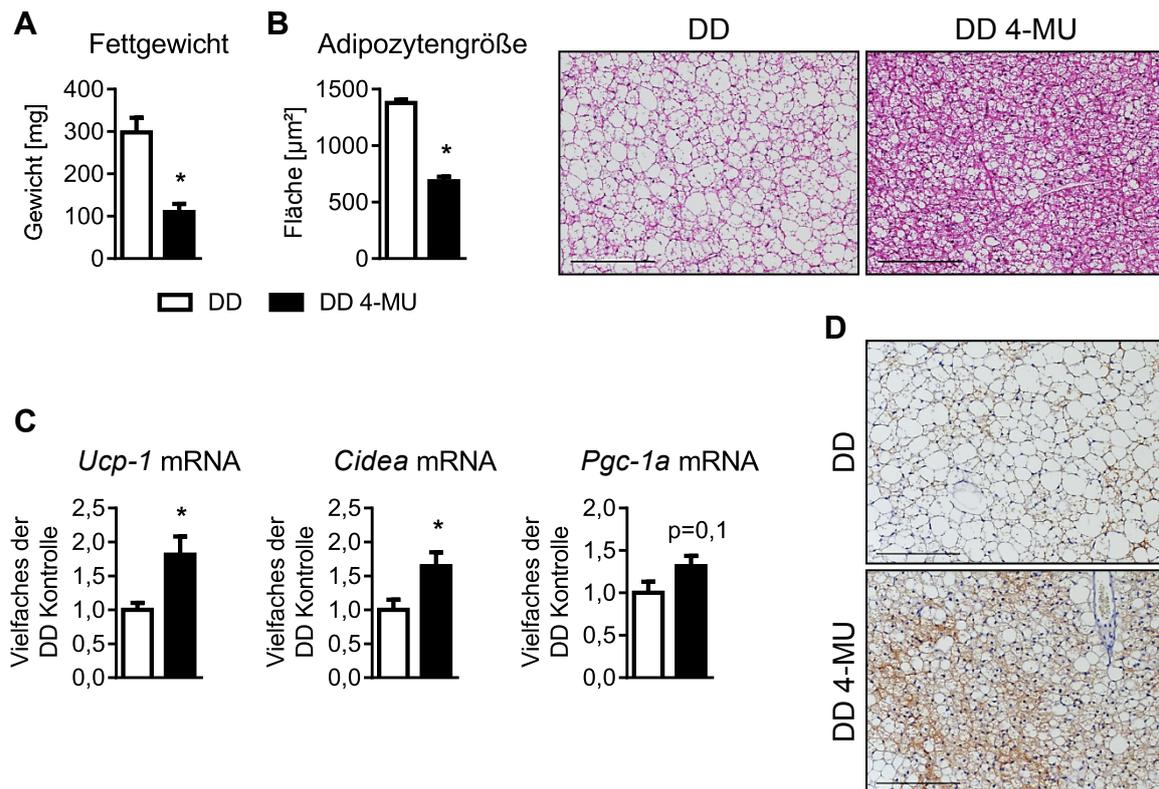


Abbildung 21: Effekt der 4-MU Behandlung auf Lipidakkumulation und Aktivität im braunen Fettgewebe.

A, Gewicht des braunen Fettgewebes nach 22 Wochen Fütterung DD \pm 4-MU, n = 5. **B**, Quantitative Auswertung der Adipozytengröße sowie repräsentative Aufnahmen der zugrundeliegenden H&E Färbung. Maßstabsbalken definiert 200 μm , n = 5-6. **C**, mRNA Expression der Aktivierungsmarker des braunen Fettgewebes *Ucp-1*, *Cidea* und *Pgc-1 α* , n = 6-7. **D**, Repräsentative Aufnahmen der UCP-1 Färbung, Maßstabsbalken entspricht 200 μm . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$.

Wie in vorherigen Studien publiziert wurde, spielen Angiogenese und Vaskularisierung, einhergehend mit einer erhöhten Expression von *Vegf- α* , für die Steigerung der Aktivität bzw. Thermogenese im braunen Fettgewebe eine besondere Rolle [76, 78, 155]. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Vaskularisierung des braunen Fettgewebes der DD \pm 4-MU-gefütterten Tiere untersucht. Tatsächlich zeigte sich infolge der 4-MU Behandlung eine gesteigerte Expression der *Vegf- α* mRNA im braunen Fettgewebe (s. Abbildung 22A). Ferner konnte mit Hilfe der Isolectin B4 Färbung eine erhöhte Dichte von Blutgefäßen nach Behandlung mit 4-MU demonstriert werden (s. Abbildung 22B).

Abschließend wurde analysiert, ob die Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU auch nach Auslösung eines Stimulus zu einer verstärkten Aktivierung des braunen Fettgewebes führt. Hierzu wurden die Tiere im *TSE Phenomaster* für 8 h der Kälte (4°C), einem bekannten Induktor der Aktivität des braunen Fettgewebes, ausgesetzt und in dieser Zeit indirekt

Ergebnisse

kalorimetrisch untersucht. Als physiologische Reaktion zeigt sich mit Absinken der Umgebungstemperatur ein gegenregulatorischer Anstieg des Sauerstoffverbrauchs der Tiere. Dieser Anstieg war über die gemessenen 8 h Kälteexposition höher in 4-MU-behandelten Tieren als in den Kontrollen (s. Abbildung 22C). Somit scheint 4-MU neben der Erhöhung des basalen Energieumsatzes auch zu einer stärkeren Aktivierbarkeit des braunen Fettgewebes behandelter Mäuse zu führen.

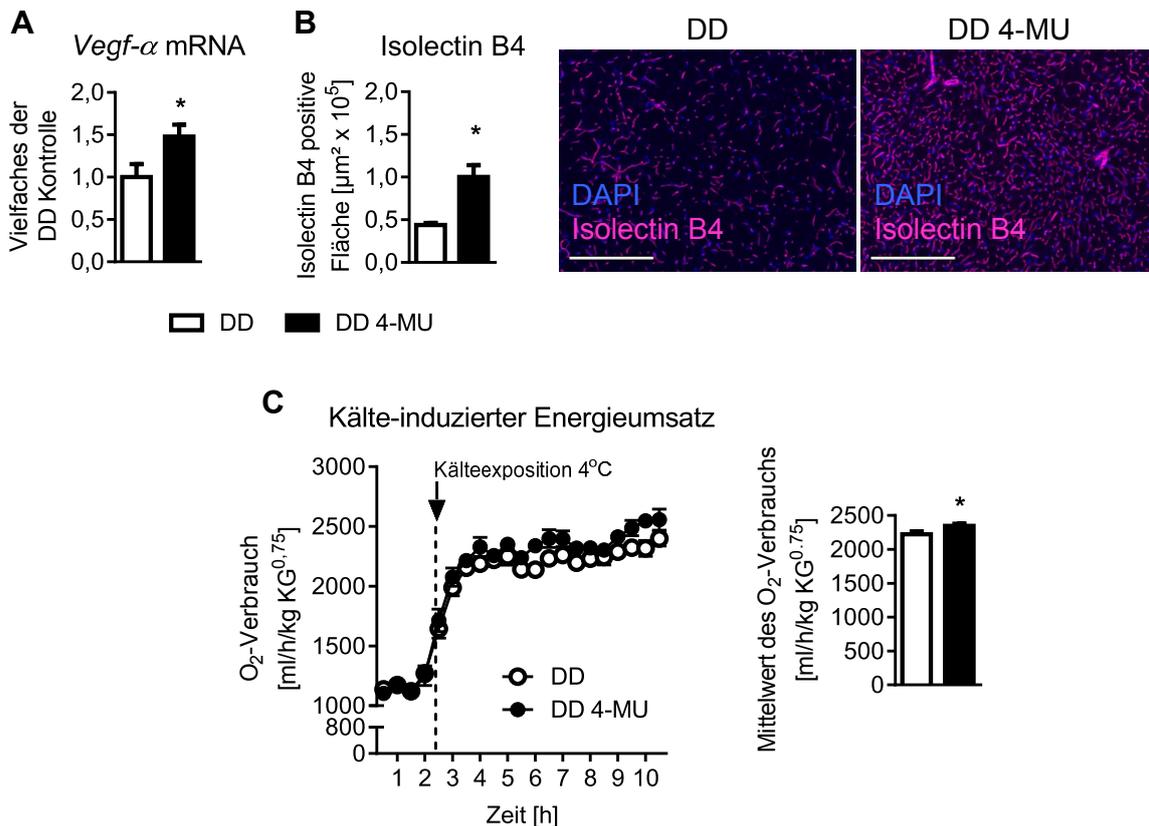


Abbildung 22: Vaskularisierung des braunen Fettgewebes und Kälte-induzierter Energieumsatz von C57BL/6J Mäusen gefüttert mit DD \pm 4-MU.

A, Vegf- α mRNA Expression im braunen Fettgewebe, n = 6-7. **B**, Quantitative Analyse der Isolectin B4 Färbung im braunen Fettgewebe, dargestellt als Isolectin B4 positive Fläche pro Bildausschnitt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Färbung. Maßstabsbalken definiert 200 μm , n = 5-6. **C**, Messung des Kälte-induzierten Sauerstoffverbrauchs während 8 h Kälteexposition im TSE Phenomaster. Die Messung und Analyse erfolgte durch Dr. Tamara Castañeda am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie des Deutschen Diabetes Zentrums (DDZ) in Düsseldorf. Gezeigt sind Absolutwerte zu den einzelnen Messzeitpunkten sowie der Mittelwert aus 8 h Kälteexposition, n = 10-12. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *p < 0,05.

Als Fazit kann postuliert werden, dass die Behandlung der Mäuse mit 4-MU zusammen mit einer verstärkten Vaskularisierung zu einer Steigerung der thermogenetischen Aktivität des

Ergebnisse

braunen Fettgewebes führt. Dies resultiert schließlich in einem erhöhten Energieumsatz, sprich einer gesteigerten Verbrennung der mit der Nahrung aufgenommenen Kalorien.

3.3.6 Effekt der 4-MU Behandlung auf *Browning* und Vaskularisierung des weißen Fettgewebes

Neben der direkten Aktivierung des braunen Fettgewebes kann auch eine Transformation der weißen Adipozyten, das sogenannte *Browning*, zu einer Steigerung der Thermogenese und damit einem schlanken Phänotyp führen. Um aufzuklären, ob sich eine Behandlung mit 4-MU in den Mäusen auch in einem *Browning* des weißen Fettgewebes äußert, wurde das subkutane Fettgewebe der DD ± 4-MU-gefütterten Tiere analysiert. Die Analyse der Genexpression der Marker des braunen Fettgewebes zeigte signifikante Steigerung der *Pgc-1 α* mRNA im subkutanen Fettgewebe 4-MU-behandelter Mäuse, allerdings keinen Effekt auf die Expression von *Ucp-1* und *Cidea* (s. Abbildung 23A). Weiterhin konnte in der UCP-1 Färbung des subkutanen Fettgewebes weder in der DD Kontrolle, noch in den DD 4-MU-gefütterten Mäusen ein positives Signal detektiert werden (s. Abbildung 23B). Dennoch scheint 4-MU analog zu den Ergebnissen aus dem braunen Fettgewebe auch die mRNA Expression von *Vegf- α* , allerdings nicht die Isolectin B4 positive Gefäßdichte im subkutanen Fettgewebe zu erhöhen (s. Abbildung 23C und D).

Ergebnisse

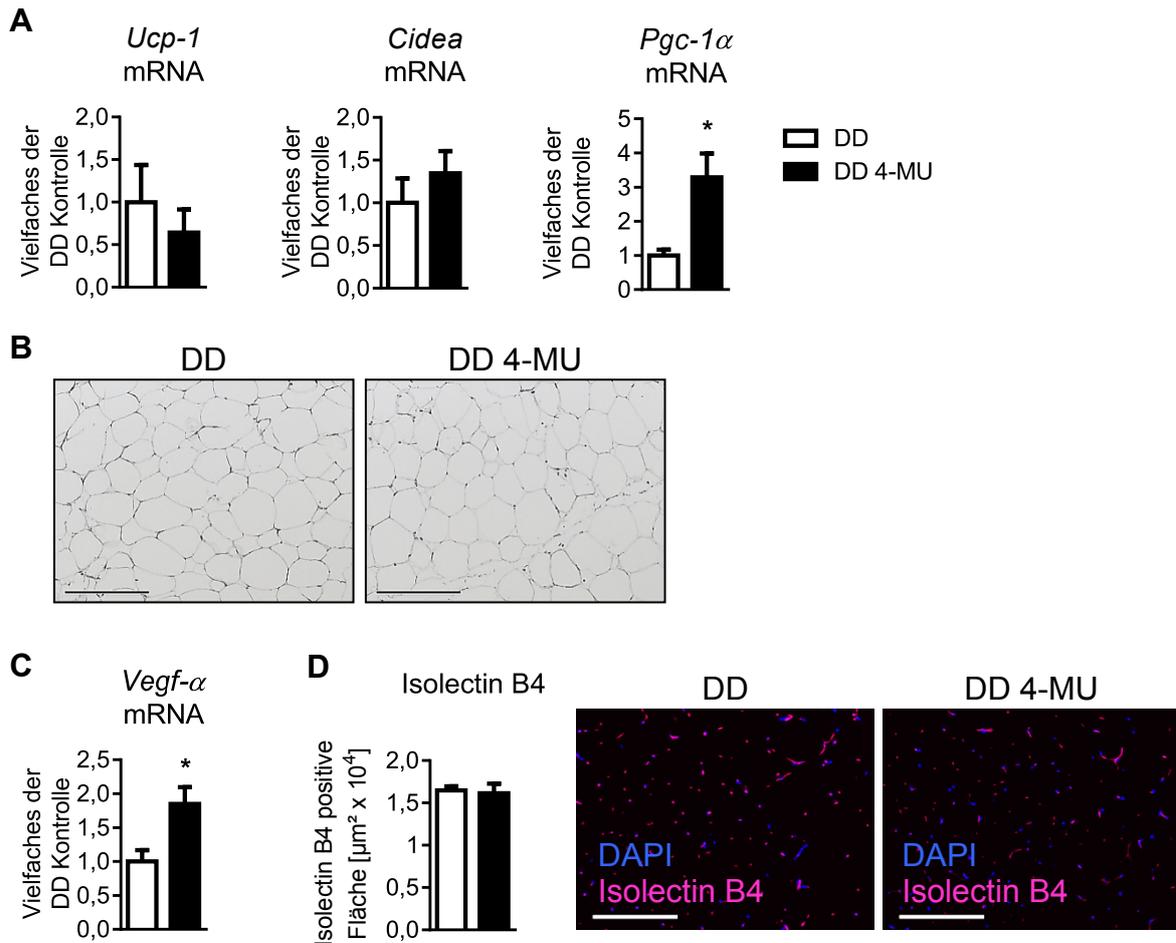


Abbildung 23: Analyse des Brownings und der Vaskularisierung im subkutanen Fettgewebe von C57BL/6J gefüttert mit DD ± 4-MU.

A, mRNA Expression der Aktivierungsmarker des braunen Fettgewebes *Ucp-1*, *Cidea* und *Pgc-1α*, n = 6-8. **B**, Ucp-1 Färbung, Maßstabsbalken entspricht 200 μm, n = 6-7. **C**, *Vegf-α* mRNA Expression, n = 6-8. **D**, Isolectin B4 Färbung des subkutanen Fettgewebes. Quantitative Analyse der Isolectin B4 positiven Fläche pro Feld sowie repräsentative Aufnahmen. Maßstabsbalken definiert 200 μm, n = 6-7. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, *p < 0,05.

3.3.7 Plasma-Lipidprofil 4-MU-gefütterter Mäuse

Im weiteren Verlauf wurde analysiert, ob die gesteigerte Aktivität des braunen Fettgewebes eine Konzentrationsänderung der Plasmalipide in den DD + 4-MU-gefütterten Mäusen hervorruft. Wie bekannt ist, geht eine Steigerung der Aktivität und Thermogenese im braunen Fettgewebe mit einer erhöhten Lipolyse bzw. vermehrten Oxidation freier Fettsäuren (FFA) einher. In der Zirkulation kann daraufhin eine Reduktion der Plasmalipidkonzentration festgestellt werden [63]. Nach 22 Wochen Fütterung mit DD ± 4-MU zeigte sich allerdings kein Unterschied in der Plasmakonzentration der Triglyzeride oder FFA (s. Abbildung 24A). Auch

Ergebnisse

in die Cholesterin-, LDL + VLDL- und HDL-Konzentration im Plasma war unter Behandlung mit 4-MU im Vergleich zur Kontrolle unverändert (s. Abbildung 24B).

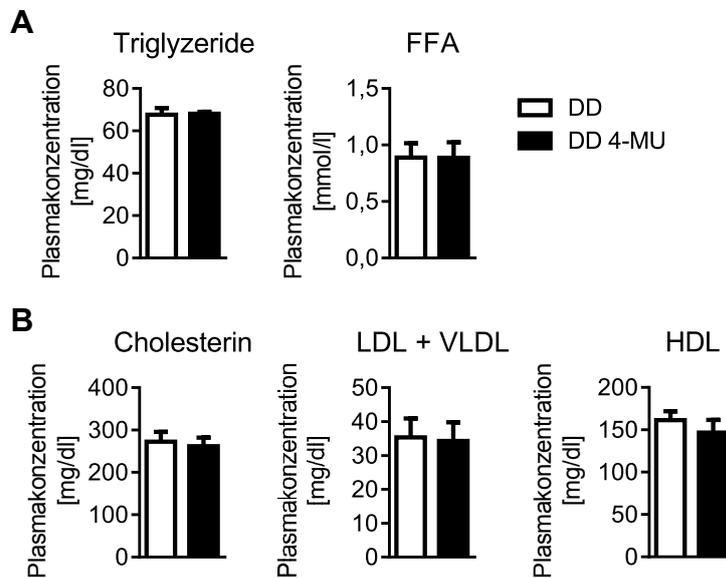


Abbildung 24: Analyse der Plasmalipide von C57BL/6J Mäusen nach 22 Wochen Fütterung mit DD \pm 4-MU.

Konzentration der Triglyzeride und FFA (**A**, n = 6-7) sowie des Cholesterins, LDL + VLDL und HDL (**B**, n = 8) im Plasma der Mäuse. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Ergebnisse

3.4 Untersuchung von Has-*knockout* Mäusen im Hinblick auf einen metabolischen Phänotyp

Um genauer aufzuschlüsseln, über welchen Mechanismus die beobachtete protektive Wirkung von 4-MU *in vivo* vermittelt wird, wurden verschiedene Has-*knockout* Mäuse im Modell der Diät-induzierten Adipositas untersucht. Da 4-MU ein Inhibitor aller HA-Synthasen ist, sollte hierbei unter anderem aufgeklärt werden, ob die 4-MU-vermittelten Effekte tatsächlich spezifisch einem HAS-Isoenzym zuzuschreiben sind, oder ob möglicherweise direkte, HA-unabhängige Effekte eine Rolle spielen. Analysiert wurden sowohl ubiquitäre Has2- und HAS3-*knockout* Mäuse als auch adipozytenspezifische Has2- und HAS3-*knockout* Mäuse, wodurch Erkenntnisse darüber gewonnen werden können, ob eine spezifische Deletion der Has im Fettgewebe oder aber der *Knockout* der *Has* in weiteren Geweben bzw. Zellen zur Entstehung eines möglichen Phänotyps beitragen. Zu diesem Zweck wurden die Schlüsselexperimente aus den Untersuchungen der DD ± 4-MU-gefütterten C57BL/6J Mäuse in den Has-*knockout* Mäusen wiederholt.

3.4.1 Has2-*knockout* Mäuse

Aufgrund der Letalität des embryonalen Has2-*Knockouts* konnte erst im adulten Alter der Mäuse ein *Knockout* induziert und dessen Effekt untersucht werden. Rosa26CreER^{T2+/-} / Has2^{flox/flox} Mäuse (Has2-*knockout*) und entsprechende Rosa26CreER^{T2+/-} Mäuse (Kontrolle) wurden im Alter von 16 – 20 Wochen mit Tamoxifen behandelt und eine Woche nach letztmaliger Tamoxifengabe über 22 Wochen mit DD gefüttert.

3.4.1.1 Analyse der Gewichts- und Körperfettzunahme

Über den Zeitraum der Fütterung konnte kein signifikanter Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen Has2-*knockout* und den entsprechenden Rosa26CreER^{T2+/-} Kontrollen detektiert werden (s. Abbildung 25A). Auch der Körperfettgehalt der Has2-*knockout* Tiere war im Vergleich zur Kontrolle unverändert (s. Abbildung 25B). Eine Veränderung der Futteraufnahme als möglicher beeinflussender Faktor konnte wiederum ausgeschlossen werden, da auch hier kein Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar war (s. Abbildung 25C). Folglich scheint der ubiquitäre *Knockout* der Has2 im Mausmodell keine Auswirkung auf die Entstehung einer Diät-induzierten Adipositas zu haben.

Ergebnisse

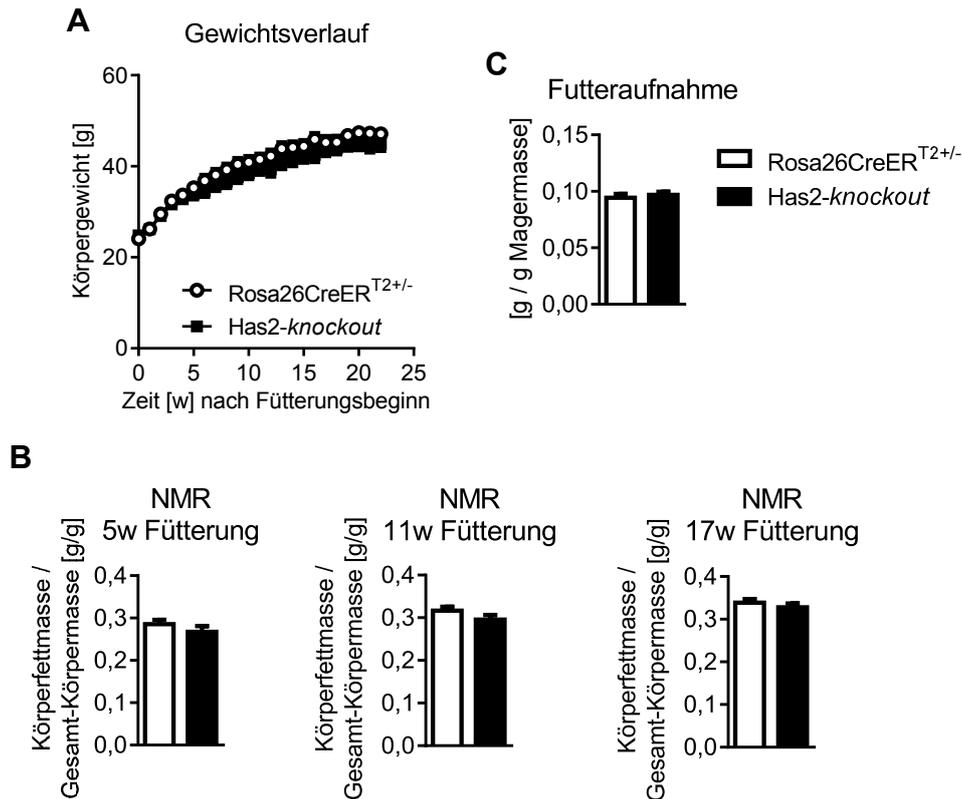


Abbildung 25: Körpergewicht, Körperfettmasse und Futteraufnahme von DD-gefütterten Has2-knockout vs. Rosa26CreER^{T2+/-} Mäusen.

A, Gewichtsverlauf während der diabetogenen Fütterung über 22 Wochen. **B**, NMR Analysen zur Bestimmung des Körperfettanteils pro Gesamt-Körpermasse, bestimmt nach 5, 11 und 17 Wochen Fütterung. **C**, Analyse der innerhalb von 24 h aufgenommenen Futtermenge während der Messung im *TSE Phenomaster* nach 11 Wochen Fütterung, korrigiert für die Magermasse des jeweiligen Tiers. Alle Daten beruhen auf $n = 9-11$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

3.4.1.2 Untersuchung der Glukose- und Insulintoleranz

Ogleich der Has2-Knockout zu keiner Veränderung der Gewichts- und Fettzunahme der diabetogen gefütterten Mäuse führte, sollte im Folgenden analysiert werden, ob unabhängig davon ein Effekt auf die systemische Glukose- und Insulintoleranz vorlag. Hierzu wurde nach 19 Wochen Fütterung ein ipGTT und nach 20 Wochen Fütterung ein ITT durchgeführt. In Has2-knockout Mäusen zeigte sich im ITT eine signifikante Verbesserung der Insulinsensitivität (s. Abbildung 26B). Der ipGTT nach 19 Wochen Fütterung wies jedoch auf eine unveränderte Glukoseverwertung in Has2-knockout Mäusen hin (s. Abbildung 26A). Des Weiteren konnte nach 22 Wochen Fütterung nur eine tendenzielle Reduktion der Insulinkonzentration im Plasma von Has2-knockout im Vergleich zu Rosa26CreER^{T2+/-} Mäusen festgestellt werden (s. Abbildung 26C).

Ergebnisse

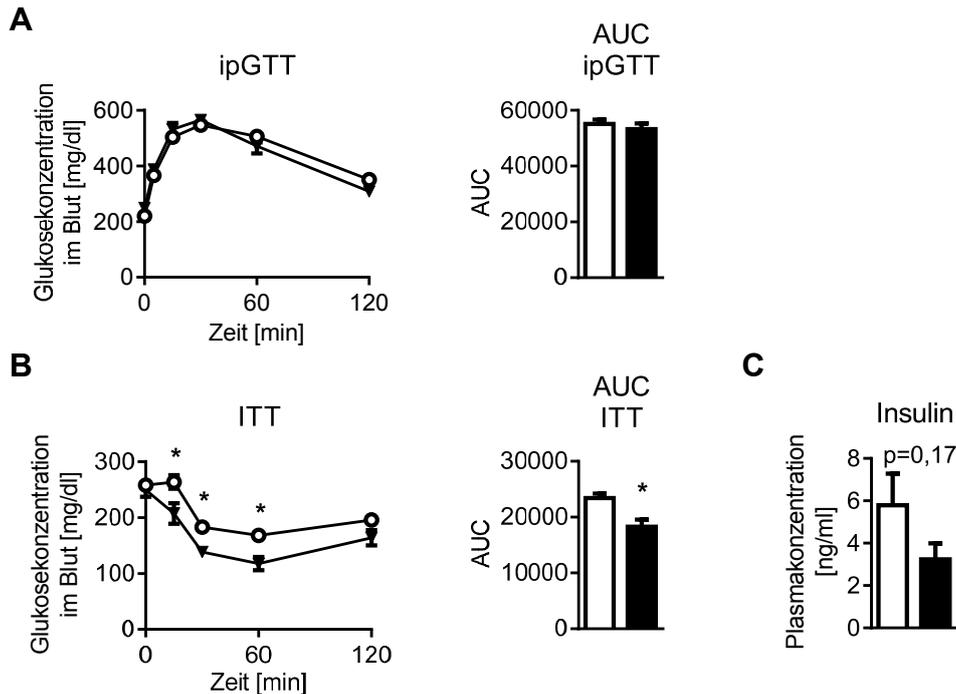


Abbildung 26: Glukose- und Insulintoleranz in DD-gefütterten *Has2-knockout* vs. *Rosa26CreER^{T2+/-}* Mäusen.

Absolute Blutglukosekonzentration sowie zugehörige AUC von **A**, ipGTT nach 19 Wochen Fütterung und **B**, ITT nach 20 Wochen Fütterung. **C**, Insulinkonzentration im Plasma nach 22 Wochen Fütterung. Alle Daten beruhen auf n = 9-11. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, *p < 0,05.

3.4.1.3 Analyse der Hypertrophie und Inflammation im weißen Fettgewebe

Aufgrund der beobachteten verbesserten Insulinsensitivität in *Has2-knockout* Mäusen wurde im nächsten Schritt das weiße Fettgewebe im Hinblick auf Hypertrophie und Inflammation untersucht. Das Gewicht sowie die Adipozytengröße des epididymalen Fettgewebe waren in *Has2-knockout* Mäusen signifikant reduziert (s. Abbildung 27A und B). In der Größenverteilung der Adipozyten zeigte sich eine leichte Steigerung der prozentualen Häufigkeit von kleineren Adipozyten sowie eine Abnahme der Häufigkeit hypertropher Adipozyten in der Gruppe der *Has2-knockout* Tiere (s. Abbildung 27C). Die Analyse der Inflammation im weißen Fettgewebe demonstrierte zudem eine signifikante Abnahme der MAC2-positiven kronenartigen Strukturen in *Has2-knockout* Mäusen (s. Abbildung 27D). Damit einhergehend war auch eine Reduktion der mRNA Expression der inflammatorischen Marker *Mcp-1* und *Il-1 β* im weißen Fettgewebe detektierbar (s. Abbildung 27E). Die Ergebnisse der Analyse von Hypertrophie und Inflammation in *Has2-knockout* Mäusen sind vergleichbar mit den Beobachtungen, die in der Gruppe 4-MU-behandelter C57BL/6J Mäuse gemacht wurden. So scheint ein kausaler Zusammenhang zwischen dem ubiquitären *Knockout* der *Has2* und dem verbesserten

Ergebnisse

Ansprechen der Mäuse auf Insulin bzw. der reduzierten Inflammation im epididymalen Fettgewebe zu bestehen.

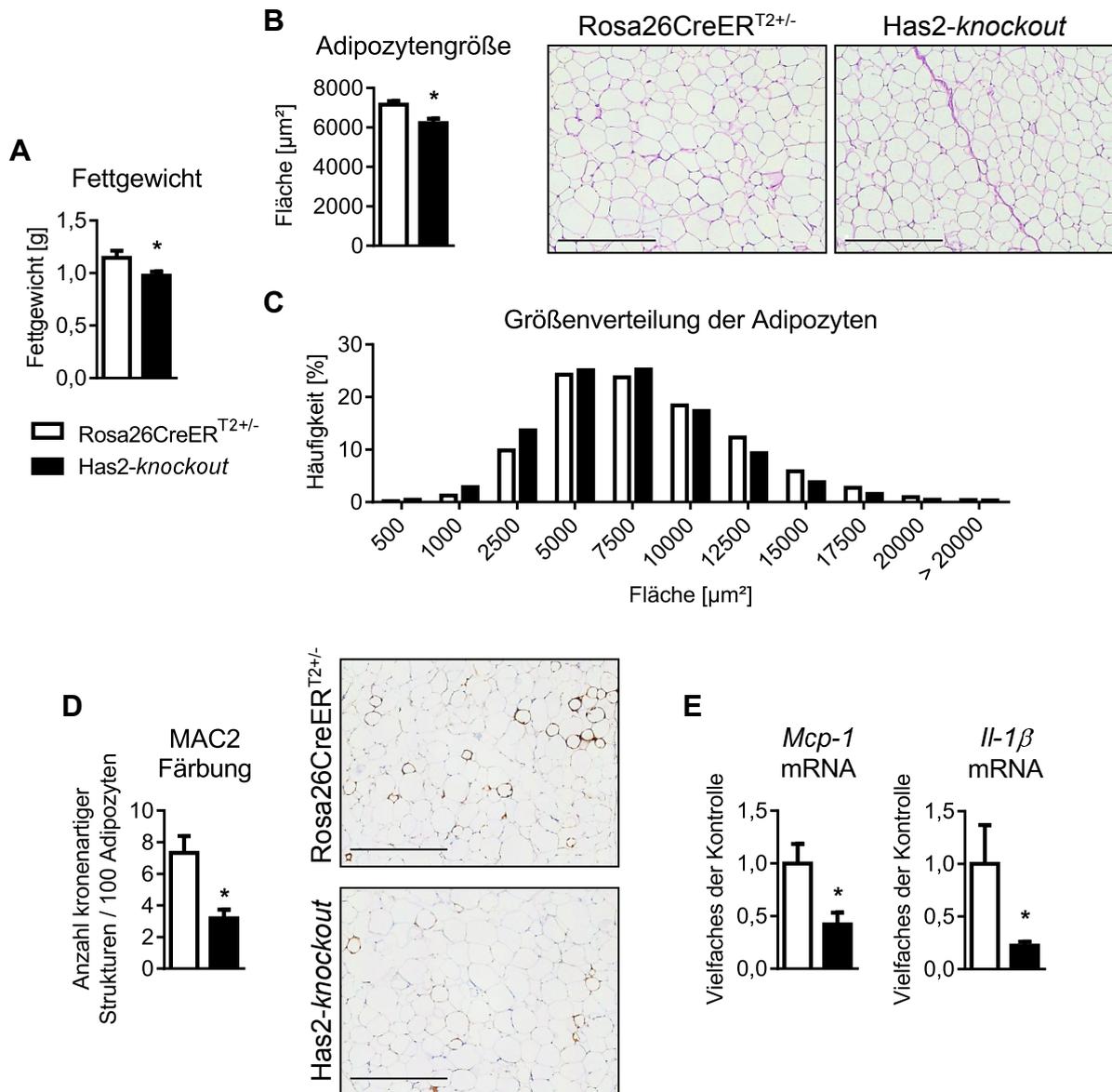


Abbildung 27: Hypertrophie und Inflammation im epididymalen Fettgewebe von Has2-knockout und Rosa26CreER^{T2+/-} Mäusen gefüttert mit DD.

A, Gewicht des linken epididymalen Fettablappens bei Entnahme nach 22 Wochen Fütterung, n = 9-10. **B**, Analyse der Adipozytengröße nach 22 Wochen Fütterung sowie repräsentative Aufnahmen der zugrunde liegenden H&E Färbung (Maßstabsbalken = 500 μm), n = 9-11. **C**, Prozentuale Größenverteilung der Adipozyten, n = 9-11. **D**, Quantitative Auswertung sowie repräsentative Aufnahmen der MAC2 Färbung aus dem epididymalen Fettgewebe. Maßstabsbalken entspricht 500 μm , n = 9-11. **E**, mRNA Expression der inflammatorischen Gene *Mcp-1* und *Il-1 β* , n = 7-8. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, *p < 0,05.

Ergebnisse

3.4.1.4 Effekt des *Has2-Knockouts* auf den basalen Energieumsatz und die Funktion des braunen Fettgewebes

In Analogie zu den in 4-MU-behandelten C57BL/6J Mäusen durchgeführten Experimenten wurde auch der Effekt des *Has2-Knockouts* auf den Energieumsatz mit Hilfe indirekter Kalorimetrie untersucht. Hierbei konnten keine Veränderungen im Sauerstoffverbrauch zwischen *Has2-knockout* und *Rosa26CreER^{T2+/-}* Mäusen detektiert werden (s. Abbildung 28A). Der ubiquitäre *Has2-Knockout* im Mausmodell hatte folglich keinen Einfluss auf den Energieumsatz der Mäuse. Im Einklang mit dieser Feststellung konnten auch bei der Analyse des braunen Fettgewebes von *Has2-knockout* Mäusen im Vergleich zur *Rosa26CreER^{T2+/-}* Kontrolle keine relevanten Unterschiede festgestellt werden. Obwohl in *Has2-knockout* Mäusen das Gewicht des braunen Fettgewebes signifikant und die Adipozytengröße im braunen Fettgewebe tendenziell reduziert waren (s. Abbildung 28B und C), konnte kein Einfluss auf die Aktivität und Vaskularisierung im braunen Fettgewebe durch den *Has2-Knockout* beobachtet werden. Dies konnte anhand der unveränderten mRNA Expression von *Ucp-1*, *Cidea*, *Pgc-1 α* sowie *Vegf- α* demonstriert werden (s. Abbildung 28D und E).

Ergebnisse

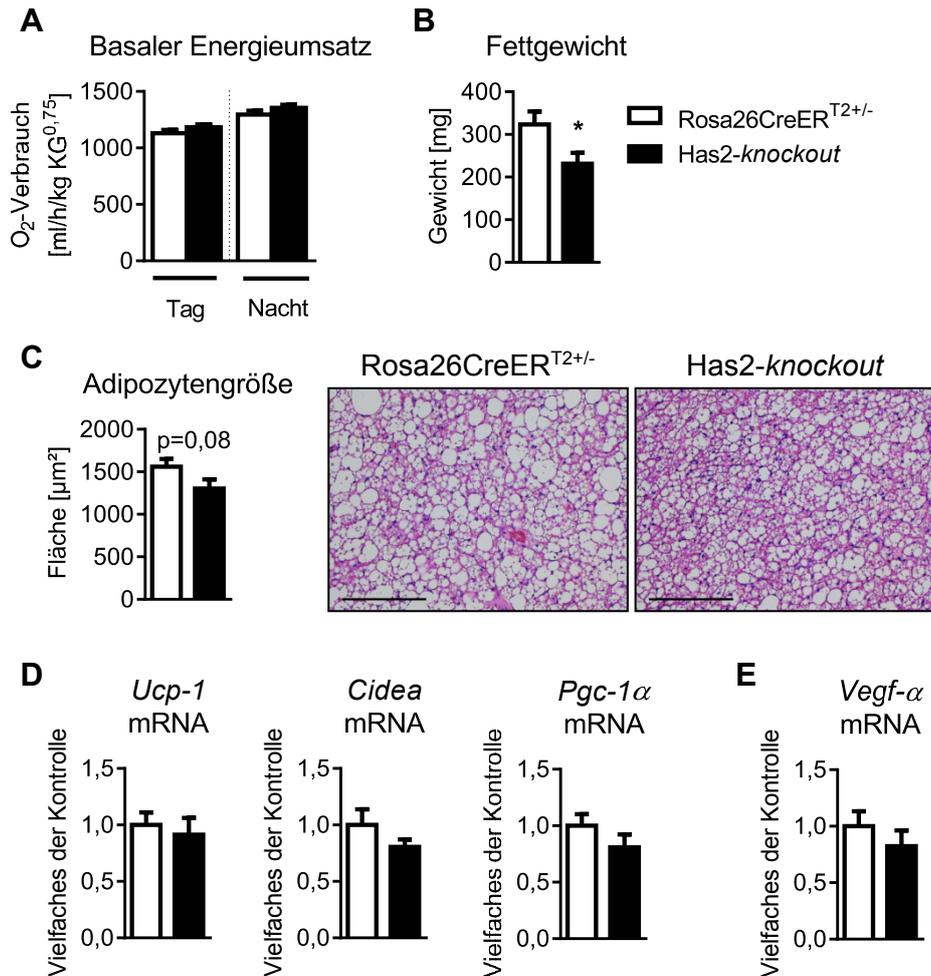


Abbildung 28: Analyse des basalen Energieumsatzes sowie der Veränderungen im braunen Fettgewebe von Has2-knockout vs. Rosa26CreER^{T2+/-} Mäusen.

A, Basaler Energieumsatz, gemessen mittels indirekter Kalorimetrie nach 11 Wochen Fütterung, n = 9-11. **B**, Gewicht des braunen Fettgewebes nach 22 Wochen Fütterung, n = 9-11. **C**, Quantitative Auswertung der Adipozytengröße sowie repräsentative Aufnahmen der zugrundeliegenden H&E Färbung. Maßstabsbalken definiert 200 μm , n = 9-11. **D**, mRNA Expression der Aktivierungsmarker des braunen Fettgewebes *Ucp-1*, *Cidea* und *Pgc-1 α* sowie **E**, mRNA Expression von *Vegf- α* im braunen Fettgewebe, n = 8-10. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *p < 0,05.

3.4.2 Adipozytenspezifische Has2-knockout Mäuse

Die Problematik der Letalität des kongenitalen Has2-Knockouts kann umgangen werden, indem der *Knockout* der *Has2* spezifisch im Fettgewebe ausgelöst wird. Adipozytenspezifische Has2-knockout Mäuse waren lebensfähig und ohne phänotypische Auffälligkeiten. Im verwendeten Modell der *Fabp4Cre*-Maus wurde sowohl im weißen als auch im braunen Fettgewebe ein *Knockout* induziert. Mit Hilfe des gewebespezifischen *Knockouts* konnte außerdem untersucht werden, welche Effekte spezifisch durch die Deletion in Adipozyten

Ergebnisse

vermittelt werden, wohingegen bei ubiquitären *Knockout*-Modellen häufig sekundäre Effekte durch die veränderte Genexpression in anderen Zielzellen beobachtet werden.

Im Alter von 8 Wochen wurde mit der diabetogenen Fütterung der adipozytenspezifischen *Has2-knockout* und der *Fabp4Cre* (Kontrolle) Mäuse begonnen. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die adipozytenspezifischen *Has2-knockout* Mäuse keinen Gewichtsunterschied zu den Kontrollen auf.

3.4.2.1 Analyse der Gewichts- und Körperfettzunahme

Während der diabetogenen Fütterung über 22 Wochen konnte kein Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen adipozytenspezifischen *Has2-knockout* und *Fabp4Cre* Mäusen gezeigt werden (s. Abbildung 29A). Allerdings konnte nach 17 Wochen Fütterung im NMR eine signifikante Reduktion des Körperfettgehalts von adipozytenspezifischen *Has2-knockout* Mäusen nachgewiesen werden, welche nach 5 und 11 Wochen Fütterung jedoch noch nicht sichtbar war (s. Abbildung 29B). Die mit Hilfe des *TSE Phenomasters* durchgeführte Analyse der Futteraufnahme zeigte wiederum keinen Unterschied zwischen den untersuchten Tiergruppen (s. Abbildung 29C). Somit kann ausgeschlossen werden, dass der reduzierte Körperfettanteil der adipozytenspezifischen *Has2-knockout* Mäuse durch eine verringerte Futteraufnahme zustande kam.

Ergebnisse

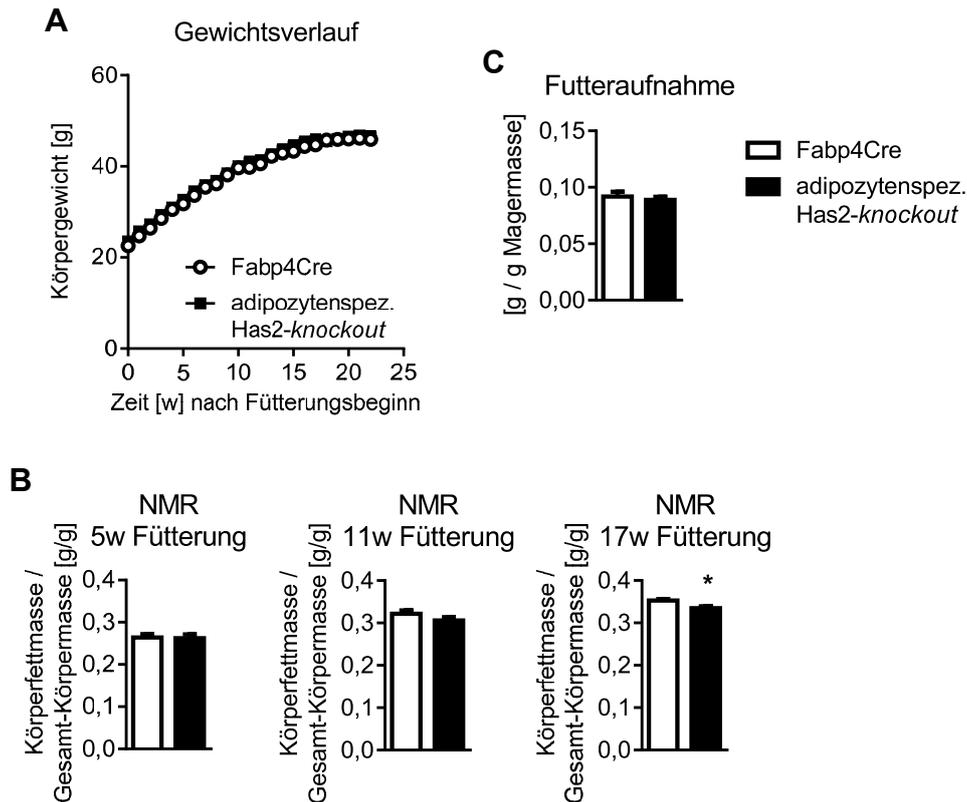


Abbildung 29: Körpergewicht, Körperfettmasse und Futteraufnahme von DD-gefütterten adipozytenspezifischen Has2-knockout vs. Fabp4Cre Mäusen.

A, Gewichtsverlauf während der diabetogenen Fütterung über 22 Wochen, $n = 13$. **B**, NMR Analysen zur Bestimmung des Körperfettanteils pro Gesamt-Körpermasse, bestimmt nach 5 ($n = 13$), 11 ($n = 12-15$) und 17 Wochen ($n = 9-11$) Fütterung. **C**, Analyse der innerhalb von 24 h aufgenommenen Futtermenge während der Messung im *TSE Phenomaster* nach 11 Wochen Fütterung, korrigiert für die Magermasse des jeweiligen Tiers, $n = 5-7$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$.

3.4.2.2 Untersuchung der Glukose- und Insulintoleranz

Die Glukose- und Insulintoleranz der Mäuse wurde wie zuvor mit Hilfe des ipGTT und ITT nach 13 bzw. 14 Wochen Fütterung analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass weder die Glukoseverwertung noch die Insulinsensitivität zwischen adipozytenspezifischen Has2-knockout Mäusen und Fabp4Cre Kontrolltieren verändert war (s. Abbildung 30A und B). Gleichwohl konnte kein Unterschied in der Insulinkonzentration im Plasma detektiert werden (s. Abbildung 30C).

Ergebnisse

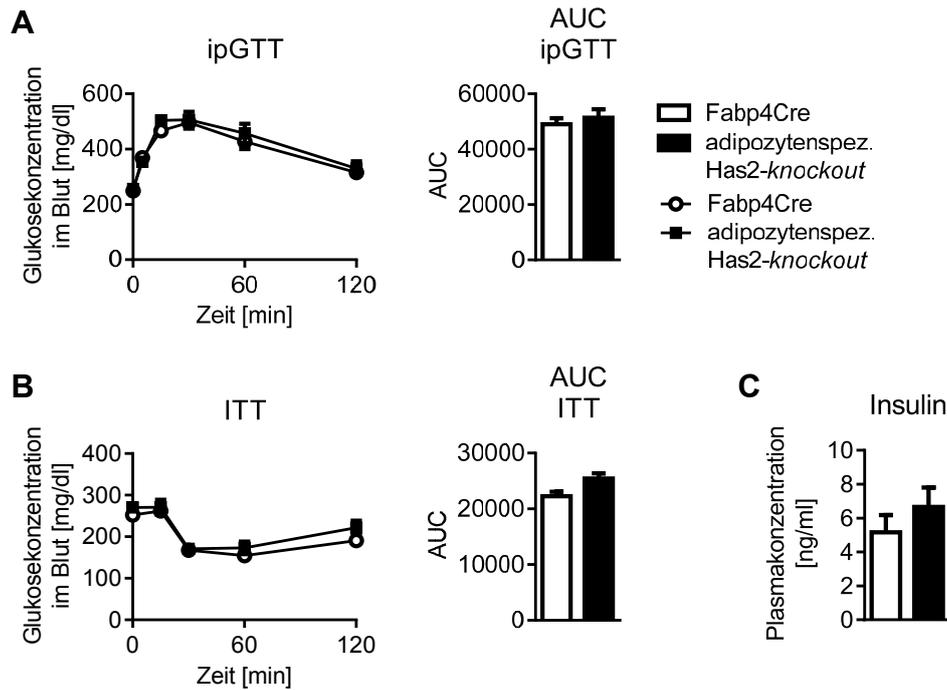


Abbildung 30: Glukose- und Insulintoleranz in DD-gefütterten adipozytenspezifischen Has2-knockout vs. Fabp4Cre Mäusen.

A, Absolute Blutglukosekonzentration sowie zugehörige AUC des ipGTT nach 13 Wochen Fütterung, n = 10-13. **B**, Absolute Blutglukosekonzentration sowie zugehörige AUC des ITT nach 14 Wochen Fütterung, n = 9-12. **C**, Mittels ELISA bestimmte Insulinkonzentration im Plasma nach 22 Wochen Fütterung, n = 6-7. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

3.4.2.3 Analyse der Hypertrophie und Inflammation in weißen Fettgewebe

Da der adipozytenspezifische Has2-Knockout nach 17 Wochen diabetogener Fütterung zu einer signifikanten Reduktion der Körperfettmasse führte, wurde im Folgenden analysiert, inwiefern diese Beobachtung mit Veränderungen der Hypertrophie und Inflammation im weißen Fettgewebe einhergeht. Tatsächlich konnte gefunden werden, dass sowohl das Gewicht (s. Abbildung 31A) als auch die Adipozytengröße (s. Abbildung 31B) des epididymalen weißen Fettgewebes in adipozytenspezifischen Has2-knockout Mäusen reduziert war. Entsprechend konnte auch eine deutliche Verschiebung zu kleineren Adipozyten in der prozentualen Verteilung der Adipozytengröße demonstriert werden (s. Abbildung 31C). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der beobachteten Reduktion in Masse und Größe des epididymalen Fettgewebes der 4-MU-behandelten C57BL/6J sowie der Has2-knockout Mäuse. Allerdings führte der adipozytenspezifische Has2-Knockout nicht zu einer veränderten Inflammation des weißen Fettgewebes (s. Abbildung 31D und E), was in 4-MU-behandelten C57BL/6J sowie ubiquitären Has2-knockout Mäusen der Fall war.

Ergebnisse

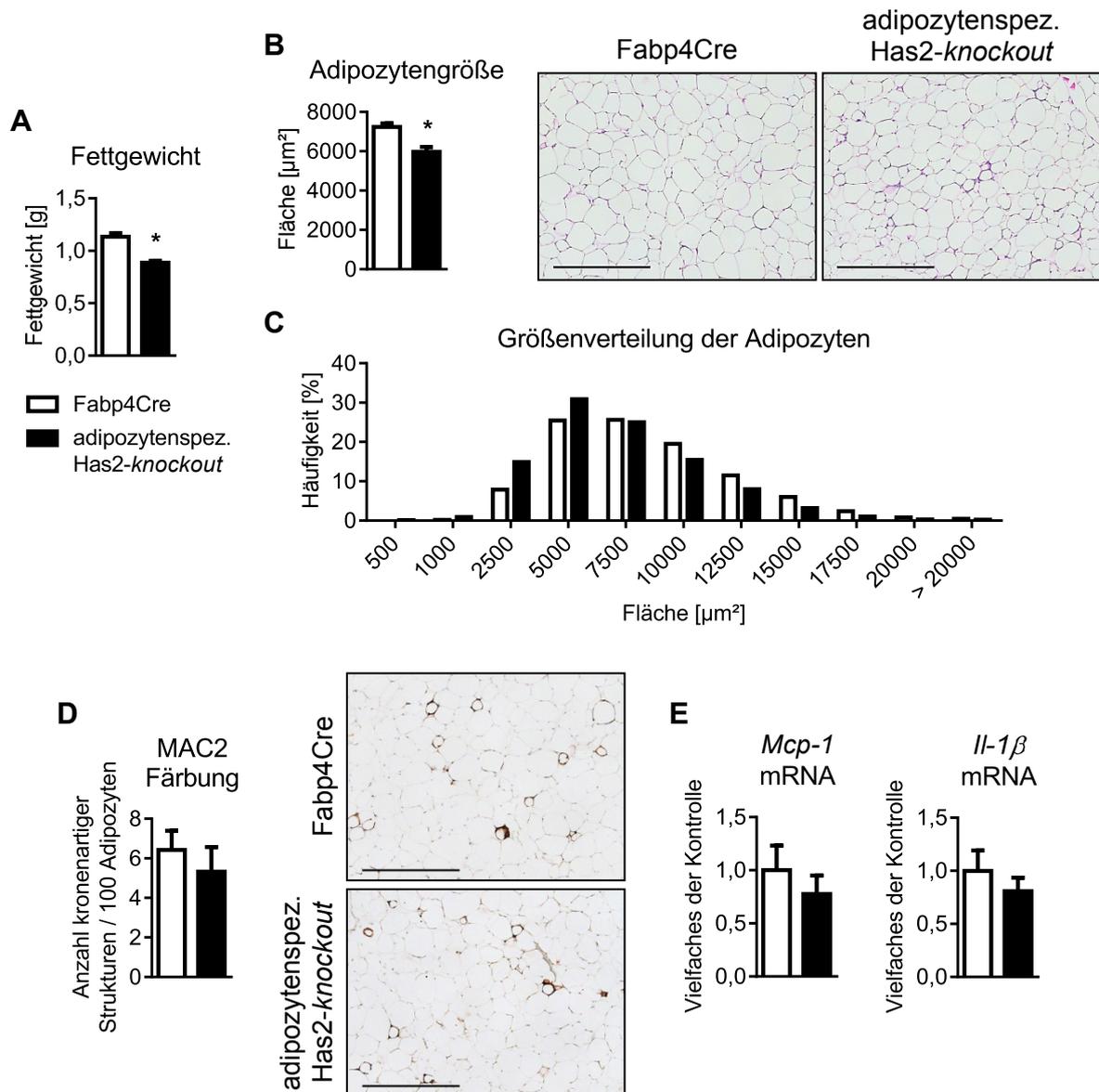


Abbildung 31: Hypertrophie und Inflammation im epididymalen Fettgewebe von adipozytenspezifischen *Has2-knockout* und *Fabp4Cre* Mäusen gefüttert mit DD.

A, Gewicht des linken epididymalen Fettablappens bei Entnahme nach 22 Wochen Fütterung, $n = 17$. **B**, Analyse der Adipozytengröße nach 22 Wochen Fütterung sowie repräsentative Aufnahmen der zugrunde liegenden H&E Färbung (Maßstabsbalken = 500 μm). **C**, Prozentuale Größenverteilung der Adipozyten. **D**, Quantitative Auswertung sowie repräsentative Aufnahmen der MAC2 Färbung aus dem epididymalen Fettgewebe. Maßstabsbalken entspricht 500 μm . **E**, mRNA Expression der inflammatorischen Gene *Mcp-1* und *Il-1β*. Daten aus **B-E** beruhen auf $n = 8-10$. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$.

Ergebnisse

3.4.2.4 Effekt des adipozytenspezifischen Has2-Knockouts auf den basalen Energieumsatz und die Funktion des braunen Fettgewebes

Wie bereits in den ubiquitären Has2-knockout Mäusen gezeigt, konnte auch der adipozytenspezifische Has2-Knockout den basalen Energieumsatz der Mäuse nicht signifikant beeinflussen (s. Abbildung 32A). Ferner waren weder das Gewicht, noch die Adipozytengröße des braunen Fettgewebes in adipozytenspezifischen Has2-knockout Mäusen im Vergleich zur Kontrolle verändert (s. Abbildung 32B und C). Im Einklang mit diesen Befunden konnte ebenfalls kein Unterschied in der mRNA Expression der Aktivierungsmarker *Ucp-1*, *Cidea* und *Pgc-1 α* beobachtet werden (s. Abbildung 32D). Gleichwohl zeigte sich kein Effekt auf die Expression der *Vegf- α* mRNA (s. Abbildung 32E).

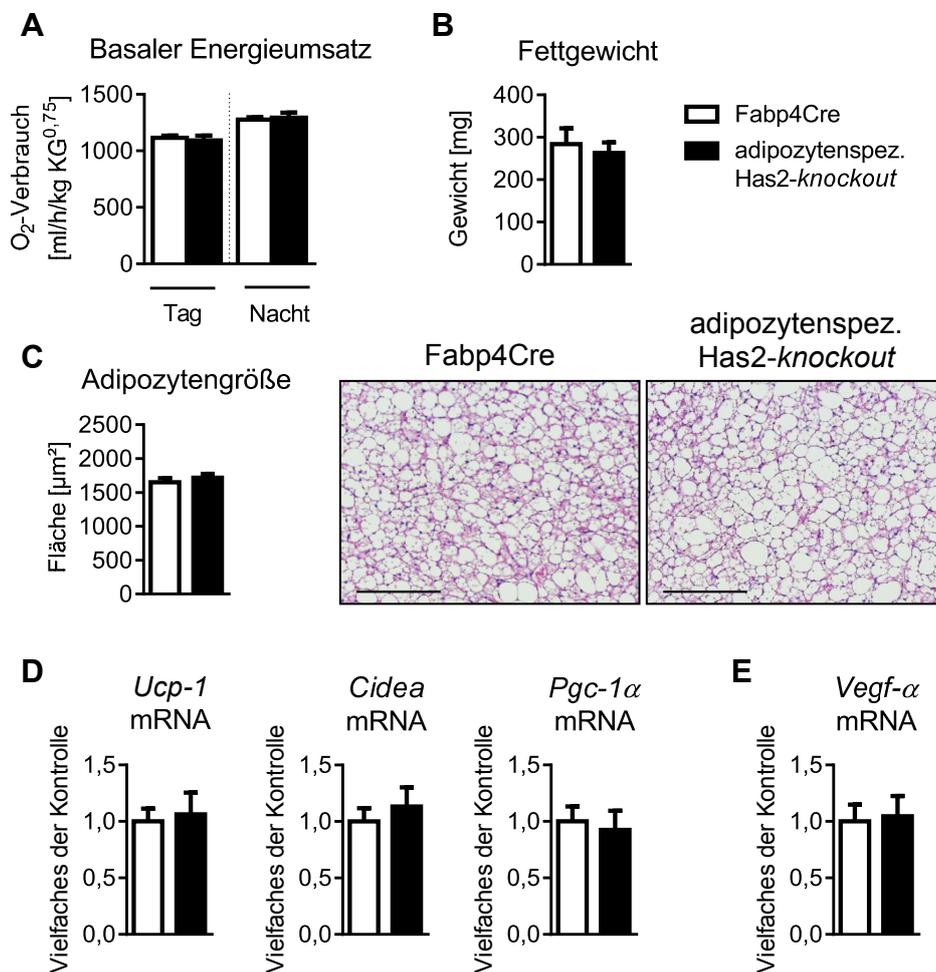


Abbildung 32: Analyse des basalen Energieumsatzes sowie der Veränderungen im braunen Fettgewebe von adipozytenspezifischen Has2-knockout vs. Fabp4Cre Mäusen.

A, Basaler Energieumsatz, gemessen mittels indirekter Kalorimetrie nach 11 Wochen Fütterung, n = 5-7. **B**, Gewicht des braunen Fettgewebes nach 22 Wochen Fütterung, n = 6-8. **C**, Quantitative Auswertung der Adipozytengröße sowie repräsentative Aufnahmen der zugrundeliegenden H&E Färbung. Maßstabsbalken definiert 200 μm , n = 7-8. **D**, mRNA Expression der Aktivierungsmarker des braunen Fettgewebes *Ucp-1*, *Cidea* und *Pgc-1 α* sowie **E**, mRNA Expression von *Vegf- α* im braunen Fettgewebe, n = 5-11. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Ergebnisse

3.4.3 HAS3-knockout Mäuse

Wie *in vitro* und *in vivo* Analysen demonstriert haben, trat weder im Rahmen der Adipozytendifferenzierung noch während der Diät-induzierten Adipositas eine Regulation der *Has3* mRNA Expression auf. In der Literatur finden sich jedoch Hinweise, dass die Anwesenheit der HAS3 für verschiedene inflammatorische Prozesse von Bedeutung ist [156, 157]. Diesbezüglich konnte trotz fehlender Regulation auf Ebene der mRNA Expression ein Einfluss des HAS3-Knockouts auf die Entstehung einer Diät-induzierten Adipositas nicht ausgeschlossen werden und sollte daher im Folgenden genauer untersucht werden.

3.4.3.1 Analyse der Gewichts- und Körperfettzunahme

Verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (WT) konnte kein Effekt des HAS3-Knockouts auf die Gewichtszunahme während der 22 Wochen Fütterung mit DD beobachtet werden (s. Abbildung 33A). Weiterhin konnte zwischen HAS3-knockout und WT Mäusen kein Unterschied im Körperfettanteil nach 5, 11 und 17 Wochen Fütterung detektiert werden (s. Abbildung 33B). Unterschiede im Fressverhalten konnten wiederum durch Bestimmung der aufgenommenen Futtermenge mit Hilfe der Messung im *TSE Phenomaster* nach 17 Wochen Fütterung ausgeschlossen werden (s. Abbildung 33C). Somit scheint der ubiquitäre *Knockout* der *HAS3* ebenfalls nicht zu der unter Behandlung mit 4-MU beobachteten anti-adipösen Wirkung zu führen.

Ergebnisse

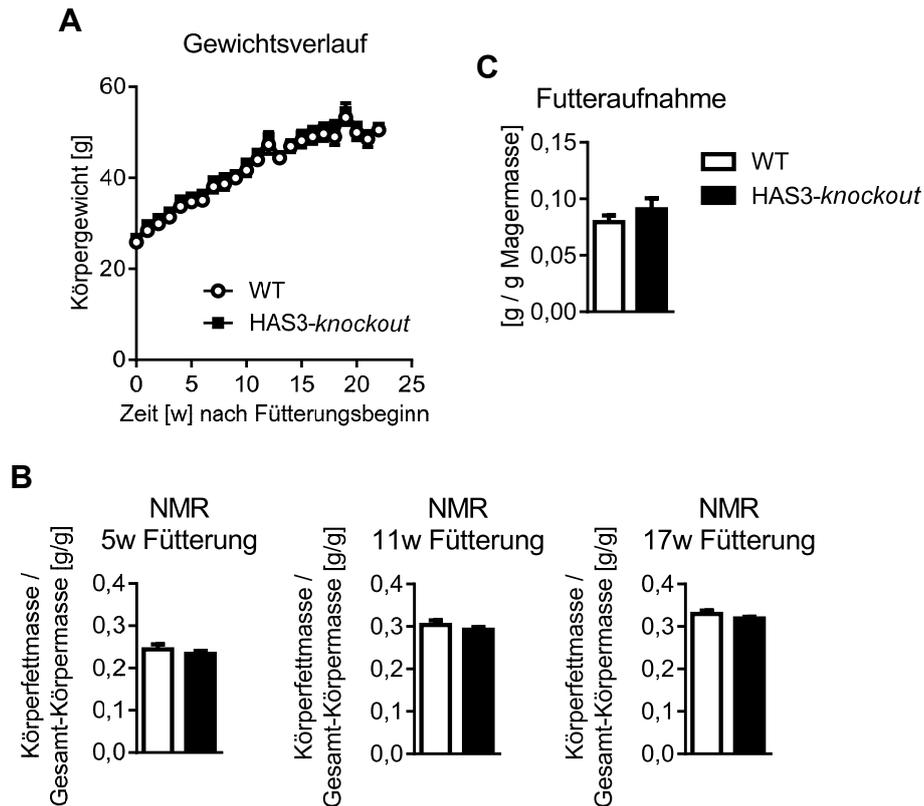


Abbildung 33: Körpergewicht, Körperfettmasse und Futteraufnahme von DD-gefütterten HAS3-knockout vs. Wildtyp Mäusen.

A, Gewichtsverlauf während der diabetogenen Fütterung über 22 Wochen, $n = 8$. **B**, NMR Analysen zur Bestimmung des Körperfettanteils pro Gesamt-Körpermasse, bestimmt nach 5, 11 und 17 Wochen Fütterung, $n = 8$. **C**, Analyse der innerhalb von 24 h aufgenommenen Futtermenge während der Messung im *TSE Phenomaster* nach 17 Wochen Fütterung, korrigiert für die Magermasse des jeweiligen Tiers, $n = 5-6$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

3.4.3.2 Untersuchung der Glukose- und Insulintoleranz

Auch die Glukose- und Insulintoleranz, bestimmt mit Hilfe des ipGTT nach 13 Wochen und des ITT nach 14 Wochen Fütterung, war zwischen HAS3-knockout und WT Mäusen nicht signifikant verändert (s. Abbildung 34A und B). Außerdem konnte kein Unterschied in der Insulinkonzentration im Plasma zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden (s. Abbildung 34C).

Ergebnisse

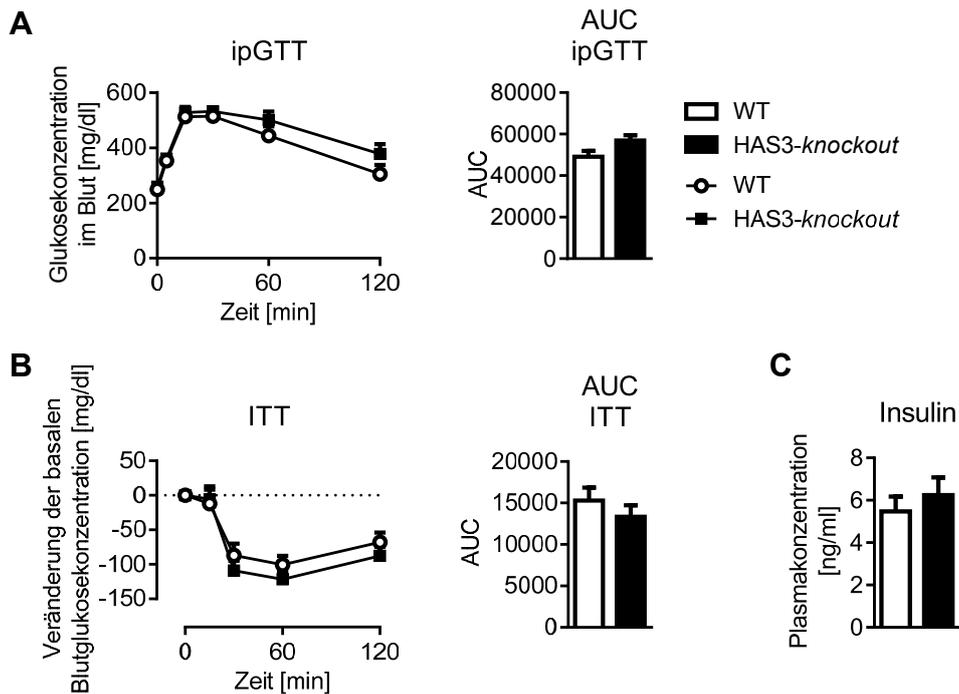


Abbildung 34: Glukose- und Insulintoleranz in DD-gefütterten HAS3-knockout vs. Wildtyp Mäusen.

A, Absolute Blutglukosekonzentration sowie zugehörige AUC des ipGTT nach 13 Wochen Fütterung. **B**, Absolute Blutglukosekonzentration sowie zugehörige AUC des ITT nach 14 Wochen Fütterung. **C**, Mittels ELISA bestimmte Insulinkonzentration im Plasma nach 22 Wochen Fütterung. Alle Daten basieren auf $n = 8$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

3.4.3.3 Analyse der Hypertrophie und Inflammation in weißen Fettgewebe

Obwohl keine Veränderung des Körperfettgehalts von HAS3-knockout Mäusen im Vergleich zur Kontrolle detektierbar war, zeigte sich sowohl im Gewicht des linken epididymalen Fettablappens wie auch in der Adipozytengröße des epididymalen Fettgewebes von HAS3-knockout Tieren eine signifikante Reduktion (s. Abbildung 35A und B). Die Reduktion der Adipozytengröße konnte wiederum durch einen gesteigerten Anteil kleinerer Adipozyten in der Darstellung der Größenverteilung deutlich gemacht werden (s. Abbildung 35C). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den zuvor erhobenen Daten aus den 4-MU-gefütterten C57BL/6J sowie den ubiquitären und adipozytenspezifischen Has2-knockout Mäusen. Trotz verringerter Hypertrophie in den HAS3-knockout Mäusen zeigte sich kein Effekt auf die Inflammation des weißen Fettgewebes. Weder in der MAC2 Färbung noch in der mRNA Expression der inflammatorischen Marker *Mcp-1* und *Il-1 β* konnte ein Unterschied detektiert werden (s. Abbildung 35D und E).

Ergebnisse

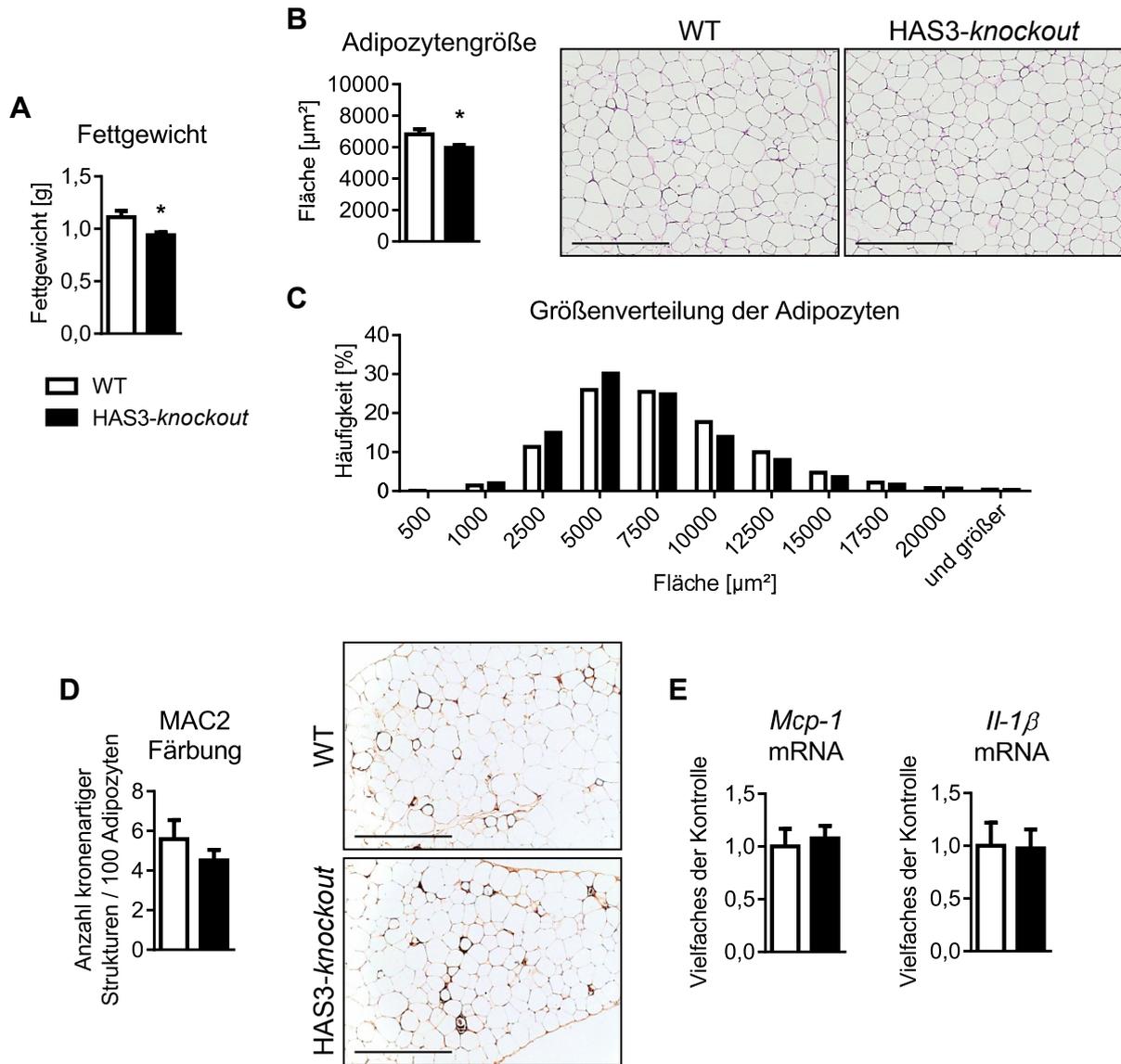


Abbildung 35: Hypertrophie und Inflammation im epididymalen Fettgewebe von HAS3-knockout und Wildtyp Mäusen gefüttert mit DD.

A, Gewicht des linken epididymalen Fettablappens bei Entnahme nach 22 Wochen Fütterung, $n = 8$. **B**, Analyse der Adipozytengröße nach 22 Wochen Fütterung sowie repräsentative Aufnahmen der zugrunde liegenden H&E Färbung. Maßstabsbalken entspricht $500 \mu\text{m}$, $n = 8-9$. **C**, Prozentuale Größenverteilung der Adipozyten. **D**, Quantitative Auswertung sowie repräsentative Aufnahmen der MAC2 Färbung aus dem epididymalen Fettgewebe. Maßstabsbalken entspricht $500 \mu\text{m}$, $n = 8-9$. **E**, mRNA Expression der inflammatorischen Gene *Mcp-1* und *Il-1 β* , $n = 8$. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$.

Ergebnisse

3.4.3.4 Effekt des HAS3-Knockouts auf den basalen Energieumsatz und die Funktion des braunen Fettgewebes

Analog zu den vorherigen Experimenten wurde auch in HAS3-*knockout* Mäusen eine Analyse des basalen Energieumsatzes durchgeführt. Hierbei konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen den Gruppen beobachtet werden (s. Abbildung 36A). Ferner zeigte sich erneut kein Unterschied in der Adipozytengröße und Morphologie des braunen Fettgewebes (s. Abbildung 36B). Basierend auf der unveränderten mRNA Expression der Aktivierungsmarker *Ucp-1*, *Cidea* und *Pgc-1 α* sowie des Vaskularisierungsmarkers *Vegf- α* schien ebenfalls die Funktion des braunen Fettgewebes durch den HAS3-*Knockout* unbeeinflusst (s. Abbildung 36C und D).

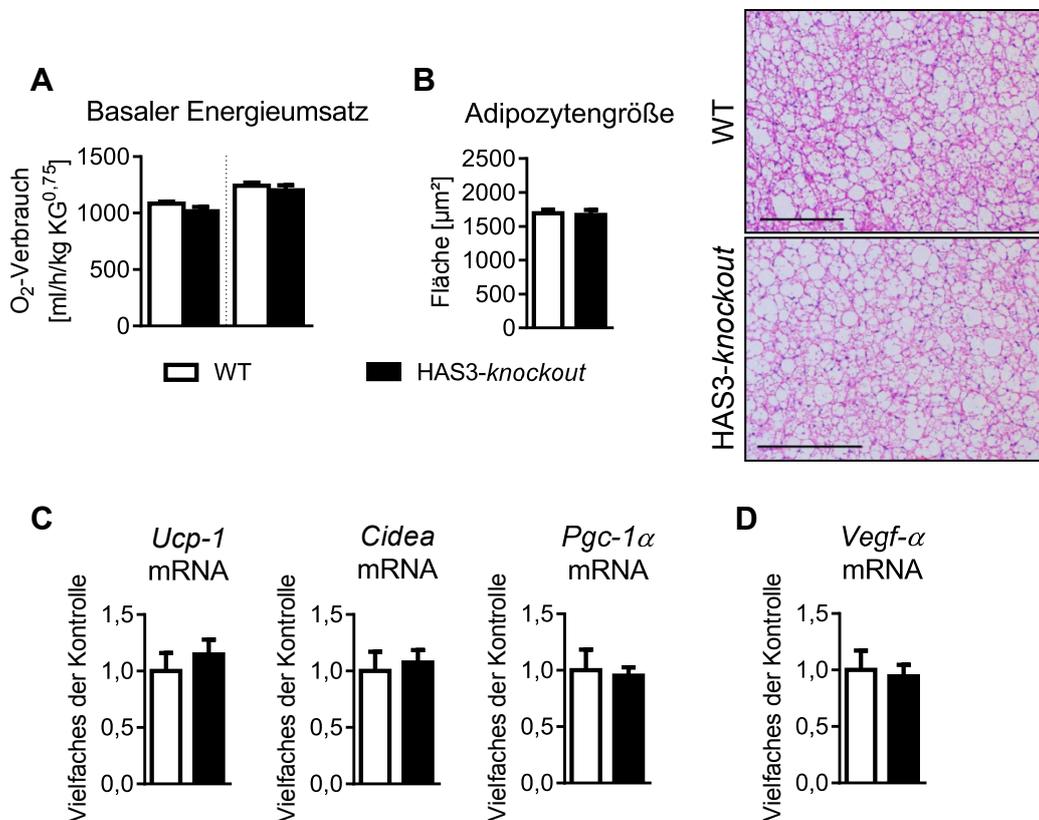


Abbildung 36: Analyse des basalen Energieumsatzes sowie der Veränderungen im braunen Fettgewebe von HAS3-*knockout* vs. Wildtyp Mäusen.

A, Basaler Energieumsatz, gemessen mittels indirekter Kalorimetrie nach 17 Wochen Fütterung, n = 6. **B**, Quantitative Auswertung der Adipozytengröße sowie repräsentative Aufnahmen der zugrundeliegenden H&E Färbung. Maßstabsbalken definiert 200 μm , n = 7. **C**, mRNA Expression der Aktivierungsmarker des braunen Fettgewebes *Ucp-1*, *Cidea* und *Pgc-1 α* sowie **D**, mRNA Expression von *Vegf- α* im braunen Fettgewebe, n = 8. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Ergebnisse

3.4.4 Adipozytenspezifische HAS3-*knockout* Mäuse

Um ein vollständiges Bild der Effekte eines Has2- bzw. HAS3-*Knockouts* auf die Entstehung der Diät-induzierten Adipositas zu erhalten, wurden abschließend adipozytenspezifische HAS3-*knockout* Mäuse untersucht.

3.4.4.1 Analyse der Gewichts- und Körperfettzunahme

Wie zuvor für die ubiquitären und adipozytenspezifischen Has2-*knockout* sowie die ubiquitären HAS3-*knockout* Mäuse beschrieben, konnte kein Unterschied in der Gewichtszunahme der adipozytenspezifischen HAS3-*knockout* Tiere im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (s. Abbildung 37A). Somit konnte auch dieses Modell den protektiven Effekt einer 4-MU Behandlung auf die Entstehung einer Adipositas nicht widerspiegeln. Im Weiteren wurde daher auf die Messung der Körperfettmasse zu verschiedenen Zeitpunkten verzichtet und nur stichprobenartig eine NMR Analyse zum Zeitpunkt nach 17 Wochen Fütterung durchgeführt. Hierbei konnte auch im Körperfettgehalt der adipozytenspezifischen HAS3-*knockout* Mäuse gegenüber den Fabp4Cre Kontrolltieren kein Unterschied detektiert werden (s. Abbildung 37B).

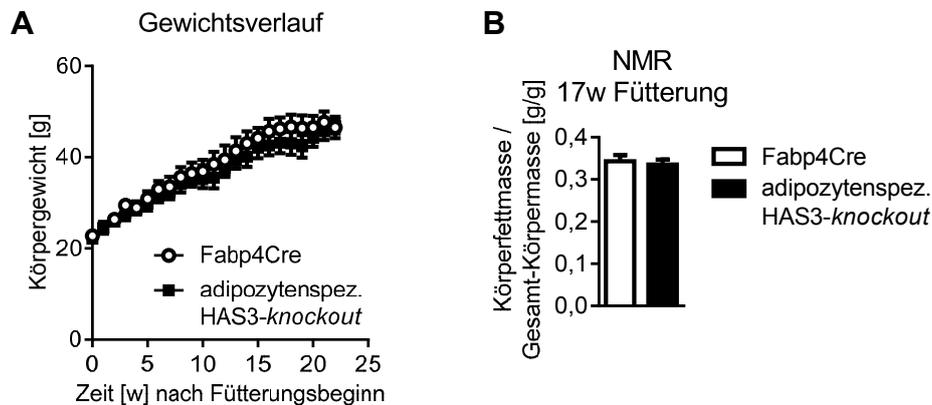


Abbildung 37: Körpergewicht und Körperfettmasse von DD-gefütterten adipozytenspezifischen HAS3-*knockout* vs. Fabp4Cre Mäusen.

A, Gewichtsverlauf während der diabetogenen Fütterung über 22 Wochen, n = 6-8. **B**, NMR Analyse zur Bestimmung des Körperfettanteils pro Gesamt-Körpermasse, bestimmt nach 17 Wochen Fütterung, n = 6. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

3.4.4.2 Analyse der Hypertrophie und Inflammation in weißen Fettgewebe

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den ubiquitären HAS3-*knockout* Mäusen konnte in den adipozytenspezifischen HAS3-*knockout* Mäusen keine signifikante Veränderung der Adipozytengröße sowie der Größenverteilung der Adipozyten demonstriert werden

Ergebnisse

(s. Abbildung 38A und B). Allerdings führte der adipozytenspezifische *HAS3-Knockout* zu einer Reduktion der Inflammation des weißen Fettgewebes, wie mit Hilfe der MAC2 Färbung sowie der Expressionsanalyse der Inflammationsmarker *Mcp-1* und *Il-1 β* gezeigt werden konnte (s. Abbildung 38C und D). Dieses Resultat stellt einen Gegensatz zu dem Befund der unveränderten Inflammation des weißen Fettgewebes in ubiquitären *HAS3-knockout* Mäusen dar.

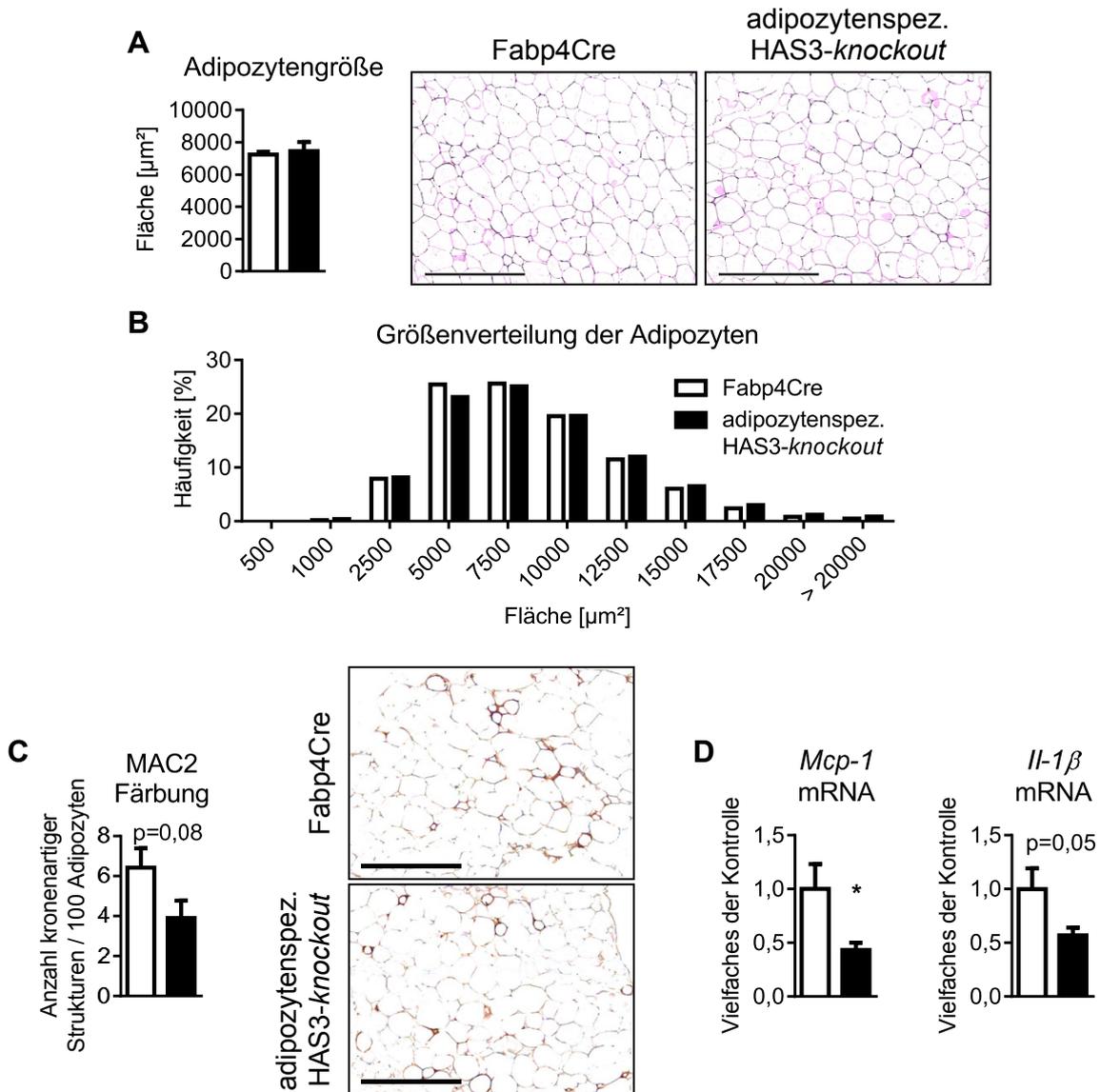


Abbildung 38: Hypertrophie und Inflammation im epididymalen Fettgewebe von adipozytenspezifischen *HAS3-knockout* und *Fabp4Cre* Mäusen gefüttert mit DD.

A, Analyse der Adipozytengröße nach 22 Wochen Fütterung sowie repräsentative Aufnahmen der zugrunde liegenden H&E Färbung. Maßstabsbalken entspricht 500 μm . **B**, Prozentuale Größenverteilung der Adipozyten. **C**, Quantitative Auswertung sowie repräsentative Aufnahmen der MAC2 Färbung aus dem epididymalen Fettgewebe. Maßstabsbalken entspricht 500 μm . **D**, mRNA Expression der inflammatorischen Gene *Mcp-1* und *Il-1 β* . Daten beruhen auf $n = 8-10$. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$.

Ergebnisse

3.4.4.3 Effekt des adipozytenspezifischen HAS3-Knockouts auf die Morphologie des braunen Fettgewebes

Abschließend wurde untersucht, ob der adipozytenspezifische HAS3-Knockout zu Veränderungen im braunen Fettgewebe führt. Allerdings konnte auch hier kein Unterschied in der Adipozytengröße zwischen adipozytenspezifischen HAS3-knockout und Fabp4Cre Mäusen beobachtet werden. Wie zudem in der H&E Färbung gezeigt werden konnte, waren Morphologie und Lipidakkumulation im braunen Fettgewebe unverändert (s. Abbildung 39A). Auch die Expression der Aktivierungsmarker des braunen Fettgewebes *Ucp-1*, *Cidea* und *Pgc-1 α* wie auch die Expression des Vaskularisierungsmarkers *Vegf- α* unterlag keinen signifikanten Veränderungen (s. Abbildung 39B und C).

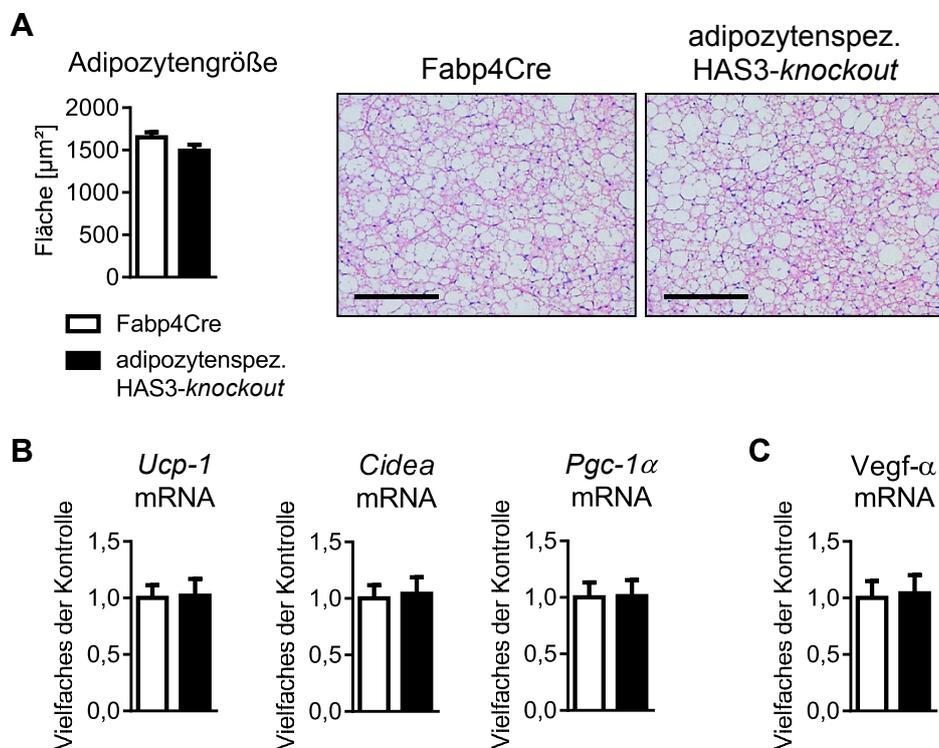


Abbildung 39: Analyse der Veränderungen im braunen Fettgewebe von adipozytenspezifischen HAS3-knockout vs. Fabp4Cre Mäusen.

A, Quantitative Auswertung der Adipozytengröße sowie repräsentative Aufnahmen der zugrundeliegenden H&E Färbung. Maßstabsbalken definiert 200 μm . **B**, mRNA Expression der Aktivierungsmarker des braunen Fettgewebes *Ucp-1*, *Cidea* und *Pgc-1 α* sowie **C**, mRNA Expression von *Vegf- α* im braunen Fettgewebe. Alle Daten beruhen auf $n = 8-10$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Diskussion

4 Diskussion

Veränderungen in der HA-Matrix treten im Zusammenhang mit zahlreichen pathologischen Veränderungen im Gewebe auf. So wurde das HA-System bereits als Zielstruktur im Rahmen von Tumorprogression, inflammatorischen Prozessen und kardiovaskulären Erkrankungen erforscht. Da die Vorstufen der HA-Synthese, D-Glukuronsäure und N-Acetyl-D-Glukosamin, Derivate der Glukose sind, liegt die Vermutung nahe, dass Störungen des HA-Stoffwechsels auch den Glukosemetabolismus und die Insulinsensitivität beeinflussen. Umgekehrt konnte bereits demonstriert werden, dass unter hohen Glukosekonzentrationen eine gesteigerte HA-Produktion auftritt, was wiederum fibrotische und inflammatorische Prozesse begünstigen kann [158-160]. Eine Hemmung der HA-Akkumulation bei Hyperglykämie und T2DM, z.B. durch Behandlung mit dem HA-Synthese-Inhibitor 4-MU, könnte sich daher als schützend vor einer weiteren Verschlechterung der metabolischen Stoffwechsellage und deren typischen Komplikationen erweisen.

Auf Ebene des weißen Fettgewebes gibt es Hinweise, dass HA auch im Verlauf der Differenzierung weißer Adipozyten und im Fettgewebe bei Diät-induzierter Adipositas verstärkt synthetisiert wird. Systematische *in vivo* Untersuchungen, die aufklären, inwiefern eine Akkumulation der HA im Fettgewebe zu der Entstehung einer Adipositas-induzierten Insulinresistenz beiträgt, fehlten jedoch zum Zeitpunkt der Aufnahme der Arbeit. Die Rolle der HA im braunen Fettgewebe ist bis dato gänzlich unbekannt.

Als Gegenstand dieser Arbeit wurde zunächst eine Charakterisierung des HA-Systems *in vitro* und *in vivo* im braunen und weißen Fettgewebe unter Induktion einer diabetogenen Stoffwechsellage vorgenommen. Im nächsten Teil wurde der Einfluss einer pharmakologischen Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU auf Differenzierung brauner und weißer Adipozyten *in vitro* sowie auf die Entstehung von Adipositas und Insulinresistenz, insbesondere auf Ebene des Fettgewebes, *in vivo* untersucht. Abschließend wurde die HA-Abhängigkeit der Effekte mittels einer Isoenzym-spezifischen Inhibition der HA-Synthese durch *Knockout* der *Has2* und *HAS3*, sowohl ubiquitär als auch adipozytenspezifisch, im Mausmodell analysiert.

Im folgenden Abschnitt sollen nun die gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit systematisch interpretiert und diskutiert werden.

Diskussion

4.1 Veränderte HA-Matrix in der Differenzierung und Expansion des Fettgewebes

Während der adipogenen Differenzierung von 3T3-L1 Zellen, einem Modell weißer Präadipozyten, zeigte sich innerhalb der ersten 48 h nach Induktion der Adipogenese ein Anstieg der HA-Konzentration im Zellüberstand. Zu diesem Zeitpunkt wurde in gleichem Ausmaß auch die Expression der *Has2* mRNA induziert. Sowohl der Anstieg der HA-Synthese als auch die Induktion der *Has2* mRNA wurde in der Literatur bereits beschrieben [132-134]. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der beobachtete Anstieg der HA-Sekretion primär auf eine gesteigerte HAS2-vermittelte HA-Synthese nach Induktion der Differenzierung zurückzuführen ist. Weiterhin scheint wahrscheinlich, dass es im Rahmen der Adipogenese zu einem gesteigerten *Signaling* der HA über den Rezeptor RHAMM kommt, da die Expression der *Rhamm* mRNA im Zeitverlauf der Differenzierung der 3T3-L1 Zellen dem gleichen Muster folgt wie die Expression der *Has2* mRNA. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Allingham *et al.* konnte keine Veränderung in der Expression der *Hyal2* mRNA in der initialen Phase der Differenzierung nachgewiesen werden [133]. Dies kann darin begründet liegen, dass die Zellen von verschiedenen Anbietern erworben und voneinander abweichende Differenzierungsprotokolle angewendet wurden. Da hauptsächlich in der Frühphase der Differenzierung signifikante Veränderungen des HA-Systems beobachtet wurden und stets ein Rückgang auf Basalniveau in terminal differenzierten Adipozyten zu verzeichnen war, wird suggeriert, dass Synthese und *Signaling* der HA in weißen Adipozyten *in vitro* vorwiegend für die Phase der klonalen Expansion entscheidend sind. In dieser Phase durchlaufen wachstumsarretierte Präadipozyten ein bis zwei finale, für die Differenzierung absolut notwendige Zellteilungen [19]. Aufgrund der bekannten pro-proliferativen Eigenschaften könnte HA in diesem Prozess eine Schlüsselrolle einnehmen. Hinweise auf eine Adipogenese-fördernde Wirkung der HA liefern auch Studien zur Rekonstruktion des Fettgewebes nach Verbrennungen oder Tumorsektion, wobei HA-Gele als Biomaterial bzw. Trägermatrix verwendet werden, in denen Präadipozyten inkorporiert sind. Nach Transplantation des HA-Gels kam es zur adipogenen Differenzierung und Ausbildung einer vaskularisierten Fettgewebe-ähnlichen Struktur [161, 162].

In vivo wurde die Expression der HA-assoziierten Gene sowohl im braunen Fettgewebe als auch im weißen Fettgewebe von C57BL/6J Mäusen untersucht. In beiden Geweben zeigte sich nach Diät-induzierter Adipositas eine Induktion der *Has1* und *Has2* mRNA, wobei die Expression der *Has3* mRNA unverändert blieb. Im Gegensatz zu dem *in vitro* System war *Has1* in beiden Fettgeweben klar nachweisbar und reguliert. Zusätzlich waren die HA-Rezeptoren *Cd44* und *Rhamm* verstärkt exprimiert. Eine Induktion der *Has2* mRNA nach

Diskussion

hochkalorischer Diät konnte bereits im weißen Fettgewebe von *Ldlr-knockout* Mäusen beschrieben werden [135]. Weiterhin konnten vorherige Studien demonstrieren, dass eine verstärkte Expression von *Cd44* im murinen und humanen weißen Fettgewebe mit einer Hypertrophie, Inflammation und systemischen Insulinresistenz korreliert [136-139], wobei von den Autoren hauptsächlich die Makrophagen der stromalen Fraktion als Ursache der induzierten *Cd44* Expression diskutiert werden. Basierend auf dem Erkenntnis, dass während der *in vitro* Differenzierung von 3T3-L1 Zellen keine veränderte Expression von *Cd44* gezeigt werden konnte, scheint es durchaus denkbar, dass die Regulation von *Cd44 in vivo* nicht durch Adipozyten selbst, sondern durch Zellen der stromal-vaskulären Fraktion zustande kommt. Generell kann anhand der Expressionsanalysen des Fettgewebes keine Aussage darüber gemacht werden, welcher Zelltyp maßgeblich an der Genregulation beteiligt ist, da die RNA stets aus dem gesamten Fetttappen isoliert wurde. Für genauere Analysen müsste vor der RNA-Isolation eine Auftrennung von stromal-vaskulärer Fraktion und reifen Adipozyten erfolgen.

In den bereits publizierten Studien zu CD44 wurde eine Reduktion der Diät-induzierten Inflammation des Fettgewebes, einhergehend mit einer verbesserten Insulinsensitivität in *Cd44*-defizienten und anti-CD44-Antikörper-behandelten Tieren beobachtet [138, 139]. Die Autoren sahen allerdings keinen Zusammenhang zur HA als Ligand des CD44-Rezeptors. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist allerdings wahrscheinlich, dass HA als Signalmolekül an den über CD44 vermittelten Effekten beteiligt ist, da sowohl die Inhibition der HA-Synthese wie auch die Hemmung des CD44-Signalweges eine verbesserte Stoffwechsellage bedingt. Weiterhin fällt auf, dass braunes und weißes Fettgewebe adipöser Mäuse eine starke Induktion der beiden HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM aufweisen. Dies legt nahe, dass beide Rezeptoren für die Expansion und Inflammation des Fettgewebes von Bedeutung sind. Es besteht auch die Möglichkeit, dass es zwischen CD44 und RHAMM zu einer Interaktion in Form einer Komplexbildung kommt, wie beispielsweise in Untersuchungen an Brustkrebszellen gezeigt wurde [163]. Andere Veröffentlichungen berichten davon, dass die Rezeptoren ihre Signalwege gegenseitig beeinflussen können oder es gar durch Funktionsverlust des einen Rezeptors zur Übernahme der Funktion durch den anderen Rezeptor kommt [164, 165].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die gesteigerte HA-Synthese sowohl in der Differenzierung von Fettzellen als auch – HAS1- und HAS2-vermittelt – im Rahmen der Veränderungen des Fettgewebes bei Adipositas von Bedeutung ist. Zudem scheinen hier die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM involviert zu sein. Daher lag die Vermutung nahe, dass

Diskussion

eine Inhibition der HA-Synthese bzw. der Signalwege über CD44 und RHAMM anti-adipogene Effekte sowie eine Verbesserung der Stoffwechsellage bewirkt.

4.2 HA als kritischer Faktor in der Differenzierung von Adipozyten

Der Einfluss von HA auf die Adipogenese von braunem und weißem Fettgewebe wurde *in vitro* durch Hemmung der HA-Synthese mittels 4-MU analysiert. Tatsächlich zeigte sich nach repetitiver Behandlung mit 4-MU eine Reduktion der Lipidakkumulation in terminal differenzierten 3T3-L1 Zellen und isolierten Präadipozyten des weißen und braunen Fettgewebes. Das Strukturgerüst von 4-MU basiert auf einem Cumarin, welches an Position 7 hydroxyliert und an Position 4 methyliert ist (s. Abbildung 5). 4-Hydroxycumarine, welche keine Inhibition der HA-Synthese bewirken, werden als Antikoagulantien in der Medizin und in der Schädlingsbekämpfung eingesetzt. Aufgrund der wenig komplexen Struktur von 4-MU ist nicht auszuschließen, dass bei Behandlung mit der Substanz auch Effekte ausgelöst werden, die unabhängig von einer Hemmung der HA-Synthese sind. Im Modell der 3T3-L1 Zellen wurde die HA-Abhängigkeit der 4-MU Effekte verifiziert, indem 4-MU vorbehandelte Zellen mit HMW-HA stimuliert wurden und hierdurch der anti-adipogene Effekt von 4-MU aufgehoben werden konnte. Außerdem zeigten Hyaluronidase-behandelte 3T3-L1 Zellen eine gleichermaßen verminderte Differenzierung wie infolge einer Behandlung mit 4-MU. Weitere Experimente unter Verwendung von siRNA in 3T3-L1 Zellen konnten außerdem demonstrieren, dass ein *Knockdown* der *Has2*, nicht aber der *Has3*, sowie der HA-Rezeptoren *Cd44* und *Rhamm* die Adipogenese inhibiert. Entscheidend war hier, dass der *Knockdown*, ähnlich wie auch die erste Behandlung mit 4-MU, noch vor Induktion der Differenzierung und damit vor der klonalen Expansionsphase stattfindet. Im Fall der *Has2* war ein *Knockdown* 24 h vor Differenzierung ausreichend, um den anti-adipogenen Effekt sichtbar zu machen. Für die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM war eine Induktion des *Knockdowns* 48 h vor Differenzierungsbeginn von Nöten. Die beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen, dass tatsächlich die HAS2-vermittelte HA-Synthese und die über CD44 und RHAMM induzierten Signalwege durch Beeinflussung der klonalen Expansion maßgeblich an der adipogenen Differenzierung *in vitro* beteiligt sind. Obwohl keine signifikante Veränderung der Genexpression von *Cd44* während der Adipogenese der 3T3-L1 Zellen beobachtet werden konnte, zeigt der siRNA-vermittelte *Cd44-Knockdown* einen differenzierungshemmenden Effekt und verdeutlicht die Wichtigkeit beider Rezeptoren für eine funktionierende Adipogenese. Eine differenzierungsfördernde Rolle der HA-Synthese wurde bereits von Hunt *et al.* für die Myogenese beschrieben. Nach Induktion der myogenen Differenzierung von C2C12 Myoblasten war ebenfalls eine Induktion der *Has2*

Diskussion

mRNA zu beobachten. Ein *Knockdown* der *Has2* mittels siRNA sowie die Behandlung mit 4-MU in C2C12 Zellen führte zu einer Reduktion der Myoblastendifferenzierung, was allerdings durch exogene Verabreichung von HA nicht aufzuheben war und damit einen Unterschied zu den hier demonstrierten Ergebnissen darstellt. Die Autoren der Studie postulierten, dass eine intrinsische HA-Synthese für die Myogenese erforderlich ist [166]. In einer aktuellen Publikation von Park *et al.* wurde hingegen beschrieben, dass LMW-Fragmente der HA die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen inhibieren können [167]. Dies wiederum macht deutlich, dass HA in Abhängigkeit ihrer Kettenlänge das Zellverhalten auf unterschiedliche Weise modulieren kann.

Die vereinfachte Annahme, dass die Expansion des Fettgewebes ursächlich für die Entstehung Adipositas-assoziiierter Folgeerkrankungen ist und daher die Entwicklung von Inhibitoren der Adipogenese stets eine sinnvolle Therapieoption darstellt, konnte in der Vergangenheit stellenweise widerlegt werden. Verschiedene Studien demonstrierten, dass Faktoren, die zu einer Blockade der Expansion des Fettgewebes führen, eine Verschlechterung der metabolischen Gesundheit bewirken, da eine dysfunktionale Lipidspeicherung in Adipozyten lipotoxische Effekte auslöst [168-171]. Andere Studien konnten jedoch zeigen, dass eine Inhibition der Differenzierung von Adipozyten sehr wohl eine Reduktion der Gewichtszunahme und Insulinresistenz bewirkt [172, 173]. In Anbetracht dessen stellte sich die Frage, wie sich eine Behandlung mit 4-MU auf die Diät-induzierte Adipositas *in vivo* auswirken würde bzw. ob sich die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse generell auf ein *in vivo* Modell der Adipositas übertragen lassen.

4.3 Inhibition der Hypertrophie und Inflammation des weißen Fettgewebes und Verbesserung der Insulinresistenz durch Behandlung mit 4-MU

Eine Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU führte in Mäusen, die mit einer DD gefüttert wurden, zu einer signifikanten Reduktion der Gewichtszunahme, was sich insbesondere durch einen verringerten Körperfettanteil der Tiere erklären ließ. Damit einhergehend kam es zu einer Verbesserung der systemischen Glukose- und Insulintoleranz. Die Untersuchung der Veränderungen im epididymalen weißen Fettgewebe, welches funktionell dem viszeralen Fettgewebe im Menschen entspricht, bestätigte eine Reduktion der Fettmasse nach Behandlung mit 4-MU. Außerdem zeigte sich eine Reduktion der Hypertrophie epididymaler weißer Adipozyten. Die Analysen ließen allerdings keine Aussagen bezüglich einer

Diskussion

Veränderung der Anzahl bzw. Hyperplasie weißer Fettzellen zu, da sowohl die Masse als auch die Adipozytengröße des Fettgewebes unter 4-MU reduziert waren. Insofern bleibt offen, ob 4-MU auch *in vivo* zu einer verminderten Adipogenese führt. Die Verbesserung der Insulinsensitivität lässt sich mitunter durch die Reduktion der Körperfettmasse und vor allem die verringerte Hypertrophie im viszeralen Fettgewebe erklären. In der Literatur berichten zahlreiche Studien, dass die Adipozytengröße direkt mit der Entstehung einer Insulinresistenz und einem T2DM korreliert [24, 25, 174-176]. In einer aktuellen Publikation von Merkestein *et al.* wird berichtet, dass die Hemmung der klonalen Expansion in der Adipogenese die Ursache für eine reduzierte Gewichtszunahme und Fettakkumulation in *Fto-knockout* Mäusen ist [177]. Interessanterweise zeigen Tiere mit *Fto-Knockout* auch eine Steigerung des Energieumsatzes [178]. Der Phänotyp dieser Tiere gleicht den hier beschriebenen Effekten einer 4-MU Behandlung. Somit könnte die Hemmung der klonalen Expansionsphase der Adipozytendifferenzierung, wie zumindest *in vitro* für die Inhibition der HA-Synthese gezeigt werden konnte, als zugrundeliegender Mechanismus der 4-MU-vermittelten Effekte in Frage kommen. Neben der verringerten Hypertrophie führte die Behandlung mit 4-MU auch zu einer reduzierten Inflammation des weißen Fettgewebes. Die Expression klassischer Zytokine wie *Mcp-1* und *Il-1 β* war signifikant reduziert, wodurch angenommen werden kann, dass auch eine verminderte Zytokin-Freisetzung aus dem weißen Fettgewebe zu einer verbesserten Stoffwechsellage der Mäuse beiträgt [41, 52, 179-181]. Möglicherweise ist die beobachtete Reduktion der Makrophagen-Invasion nach Behandlung mit 4-MU eine Folge der verringerten Zytokin-Expression des weißen Fettgewebes, da insbesondere MCP-1 als Auslöser für eine Infiltration von Makrophagen beschrieben wurde [182]. Andererseits gibt es Studien, die diese Behauptung widerlegen [183]. Umgekehrt könnte die verringerte Zytokin-Expression auch durch die Reduktion der Makrophagenakkumulation im Fettgewebe zustande kommen, da Makrophagen selbst – neben den Adipozyten und deren Progenitorzellen [46] – als Quelle vermehrt produzierter Zytokine im Fettgewebe bei Adipositas gehandelt werden [40, 184].

Die Hemmung der HA-Synthese mittels 4-MU könnte direkt an der Prävention inflammatorischer Prozesse des Fettgewebes beteiligt sein [185]. Wie gezeigt werden konnte, kommt es im Rahmen diverser Entzündungskrankheiten zu einer vermehrten Akkumulation von HA. Nach Auslösung eines inflammatorischen Stimulus kann HA außerdem kabelförmige Strukturen ausbilden, welche in der Lage sind, Leukozyten zu binden [186-188]. Die Entstehung monozyten-adhäsiver HA-Strukturen wurde außerdem infolge einer Hyperglykämie in mesangialen Zellen der Rattenniere beschrieben [160]. Für das weiße Fettgewebe haben Han *et al.* bereits postuliert, dass HA als Komplex mit SAA3 an der Adhäsion von Monozyten beteiligt ist und konnten *in vitro* nachweisen, dass eine Behandlung

Diskussion

von 3T3-L1 Zellen mit Hyaluronidase tatsächlich die Adhäsion von Monozyten hemmt [135]. Ferner ist bekannt, dass die Expression von TLR1-9 und TLR11-13 im Fettgewebe bei Adipositas induziert wird und FFA als Liganden dieser Rezeptoren an der Entstehung einer Insulinresistenz beteiligt sind [189-191]. Allerdings könnte auch durch die vermehrte HA-Produktion im hypertrophen Fettgewebe ein gesteigertes *Signaling* über TLR stattfinden, da HA ebenfalls als Ligand von TLR2 und TLR4 bekannt ist. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die 4-MU-vermittelte Reduktion der HA-Synthese dazu beiträgt, dass inflammatorische Prozesse und die Invasion von Leukozyten auf Ebene des weißen Fettgewebes gehemmt werden. Eine protektive, anti-inflammatorische Wirkung von 4-MU wurde in der Literatur bereits für Entzündungsvorgänge der Lunge, arthritische Erkrankungen sowie für autoimmune Reaktionen des ZNS beschrieben [128-130, 192].

Zeitgleich zu der Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden zwei Publikationen veröffentlicht, die anhand ähnlicher Untersuchungen deutlich machen, dass eine Inhibition der HA-Synthese bzw. eine Behandlung mit 4-MU einer Adipositas-induzierten Insulinresistenz entgegenwirken können. In der Studie von Ji *et al.* wurde gezeigt, dass die Differenzierung von 3T3-L1 Zellen durch Behandlung mit Hyaluronidase oder 4-MU sowie durch Transfektion von *Has2* siRNA gehemmt werden kann. Dieser Befund stimmt mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen überein. Weiterhin konnten die Autoren demonstrieren, dass Hyaluronidase-Injektionen in C57BL/6J Mäusen auf hochkalorischer Diät zu einer Reduktion der Gewichtszunahme und Körperfettmasse sowie einer verbesserten Insulinsensitivität führen. Zusätzlich waren die Tiere vor einer Leberverfettung geschützt [193]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass keine ektope Lipidspeicherung in der Leber von 4-MU-behandelten C57BL/6J Mäusen erfolgt. In der zweiten Publikation, veröffentlicht 2014 von Sim *et al.*, wurde der Effekt von Umbelliferon und 4-MU auf die Entstehung des metabolischen Syndroms untersucht. Beide Substanzen führten zu einer Reduktion der Plasmalipidkonzentration und einer verminderten Hyperglykämie im Mausmodell. Auch das Gewicht und die Adipozytengröße des weißen Fettgewebes waren nach Behandlung mit Umbelliferon und 4-MU reduziert. Als zugrundeliegender Mechanismus wurde eine erhöhte Aktivität der hepatischen β -Oxidation diskutiert [194]. Im Unterschied zu den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen konnte allerdings kein Unterschied in der Gewichtszunahme 4-MU-behandelter Mäuse detektiert werden. Dies könnte in der 250-fach niedriger eingesetzten Dosierung von 4-MU begründet liegen. Da Umbelliferon im Gegensatz zu 4-MU kein Inhibitor der HA-Synthese ist, aber in den Untersuchungen die gleichen Effekte wie 4-MU zeigte, wurden die dargelegten Beobachtungen von den Autoren nicht mit HA in Verbindung gebracht. Zur genauen Aufklärung bezüglich der HA-Abhängigkeit

Diskussion

der beobachteten Effekte ist daher die Untersuchung von genetischen *Knockout* Modellen zwingend erforderlich.

Schlussendlich muss berücksichtigt werden, dass aufgrund der Verabreichung von 4-MU über das Futter der Mäuse eine ubiquitäre Hemmung der HA-Synthese erfolgt und damit auch weitere Mechanismen bzw. Gewebe an der Verbesserung der Glukose- und Insulintoleranz beteiligt sein können. So wurde 2013 von Kang *et al.* eine Studie zur Rolle der HA im insulinresistenten Muskel publiziert. Die Autoren konnten zeigen, dass es nach Fütterung einer hochkalorischen Diät zu einer Akkumulation von HA im Muskelgewebe von Mäusen kam. Durch Behandlung der Tiere mit der Hyaluronidase PH-20 konnte die HA-Akkumulation dosisabhängig reduziert und dadurch eine Verbesserung der Insulinsensitivität in Muskel und Leber erzielt werden [195]. Zudem findet sich bereits in dieser Studie ein Hinweis darauf, dass eine Reduktion der HA-Konzentration, hier infolge der Behandlung der Mäuse mit der Hyaluronidase PH-20, eine Abnahme der Körperfettmasse bewirkt.

4.4 4-MU induziert eine Erhöhung des O₂-Verbrauchs über eine Aktivierung des braunen Fettgewebes

Zwischen 4-MU-gefütterten Tieren und den entsprechenden Kontrollen konnte kein Unterschied in der aufgenommenen Futtermenge festgestellt werden. Da die 4-MU Behandlung aber zu einer Reduktion von Masse und Adipozytengröße des weißen Fettgewebes führte und daher weniger Energie in Adipozyten gespeichert zu werden schien, stellte sich die Frage, wie die überschüssig aufgenommenen Kalorien in den Mäusen prozessiert werden. Eine ektope Akkumulation von Lipiden in der Leber konnte nachweislich ausgeschlossen werden. In der Studie von Kang *et al.* [195] wurde ein verbessertes muskuläres Ansprechen auf Insulin nach Reduktion der HA-Konzentration gezeigt. Obgleich die Mäuse hier mit Hyaluronidase anstelle von 4-MU behandelt wurden, kann die Möglichkeit einer ektopen Lipidspeicherung im Muskel als unwahrscheinlich angesehen werden, da diese in der Regel eine Verschlechterung der Insulinsensitivität bewirkt. Schließlich wurde in Betracht gezogen, dass es zu einer direkten Verbrennung der überschüssigen Kalorien kommt. Diese Hypothese schien sich tatsächlich zu bestätigen, da in 4-MU-behandelten Mäusen mittels indirekter Kalorimetrie eine signifikante Steigerung des nächtlichen O₂-Verbrauchs detektiert wurde, gleichbedeutend mit einer Erhöhung des basalen Energieumsatzes in der aktiven Phase der Tiere. Über eine Aktivierung der Thermogenese kann das braune Fettgewebe einen großen Teil zum Energieumsatz beitragen [196]. Die Induktion thermoregulatorischer Prozesse im braunen Fettgewebe über das mitochondriale

Diskussion

Protein UCP-1 wurde in zahlreichen Publikationen der letzten Jahre als schützender Mechanismus vor Übergewicht, Adipositas und Insulinresistenz beschrieben [59, 62, 64, 65]. Obwohl das Gewicht des Fettablappens wie auch die Adipozytengröße des braunen Fettgewebes in Mäusen nach 4-MU Behandlung reduziert war, zeigte sich eine verstärkte Expression von *Ucp-1*, *Cidea* und *Pgc-1 α* , was auf eine Aktivierung des braunen Fettgewebes hinweist. Auch immunhistochemisch konnte ein erhöhtes Auftreten des Proteins UCP-1 nachgewiesen werden. In der Literatur wird beschrieben, dass Aktivatoren des braunen Fettgewebes in der Regel eine Expansion des braunen Fettgewebes und dadurch eine Funktionssteigerung induzieren [76, 197, 198]. Die Arbeitsgruppen um Liu *et al.* und Stanford *et al.* konnten außerdem zeigen, dass auch die artifizielle Vergrößerung der braunen Fettmasse wie durch subkutane Transplantation von braunem Fettgewebe in Mäusen eine gesteigerte Thermogenese, reduzierte Gewichtszunahme und verbesserte Glukosetoleranz hervorruft [62, 199]. Die Hemmung der Differenzierung brauner Adipozyten wird hingegen mit einem verringerten Energieumsatz und einer verschlechterten metabolischen Gesundheit in Verbindung gebracht [200, 201]. Eine Studie von Lowell *et al.* konnte zudem bereits 1993 demonstrieren, dass eine genetische Ablation des braunen Fettgewebes zu einer Reduktion des O₂-Verbrauchs und der Ausbildung eines metabolischen Syndroms in Mäusen führt [61]. Bezüglich der Behandlung mit 4-MU *in vivo* kann allerdings, ähnlich wie bereits für das weiße Fettgewebe erläutert, nicht determiniert werden, ob es tatsächlich zu einer Hemmung der Adipogenese kommt. Obwohl die *in vitro* Ergebnisse aus differenzierten, 4-MU behandelten Präadipozyten des braunen Fettgewebes dies vermuten lassen, kann *in vivo* aufgrund der reduzierten Größe von Fettablappen und Adipozyten keine offensichtliche Veränderung der Zellzahl abgeleitet werden. Demzufolge kann nur geschlussfolgert werden, dass nach 4-MU Behandlung zwar eine Hemmung der Expansion auftritt, nichtsdestotrotz aber eine gesteigerte Aktivität des braunen Fettgewebes nachweisbar ist. Weiterhin war in den Versuchen deutlich erkennbar, dass eine Lipidakkumulation und damit ein *Whitening*-bedingter Funktionsverlust des braunen Fettgewebes infolge der Behandlung mit 4-MU vermieden werden konnte. Kürzlich wurde von Shimizu *et al.* ein klarer Zusammenhang zwischen einem *Whitening* des braunen Fettgewebes und einer Ausdünnung vaskulärer Gefäße, basierend auf einer verminderten Expression von *Vegf- α* , beschrieben [78]. Für eine ausreichende Vaskularisierung und damit einhergehend eine Aufrechterhaltung der Funktion des braunen Fettgewebes ist VEGF-A unerlässlich. Zahlreiche Veröffentlichungen der letzten Jahre konnten belegen, dass die Expression von *Vegf- α* beispielsweise mit einer gesteigerten Proliferation und Masse des braunen Fettgewebes sowie einer Reduktion von Übergewicht und metabolischer Dysfunktion korreliert [75, 76, 155]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde auch die Vaskularisierung im braunen Fettgewebe 4-MU-gefütterter Mäuse untersucht.

Diskussion

Die Analysen demonstrierten eine gesteigerte Expression der *Vegf- α* mRNA sowie eine erhöhte Gefäßdichte, gemessen an der Isolectin B4 positiven Fläche, im braunen Fettgewebe von 4-MU-behandelten Mäusen. Diese Beobachtung legt nahe, dass durch die Behandlung mit 4-MU über einen gesteigerten Blutfluss im Vergleich zur Kontrolle mehr Nährstoffe, Lipide und Kohlenhydrate im braunen Fettgewebe angelangen, wo sie schließlich der Zirkulation entzogen und über oxidative Prozesse in Wärme umgewandelt werden. Den Ergebnissen zufolge scheint also auch das braune Fettgewebe entscheidend an der 4-MU-vermittelten Reduktion der Diät-induzierten Adipositas und der verbesserten Stoffwechsellage beteiligt zu sein.

An dieser Stelle kann jedoch keine gesicherte Aussage darüber getroffen werden, ob die im braunen Fettgewebe beobachteten Effekte in direktem Zusammenhang mit einer Reduktion der HA-Synthese stehen. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, dass es sich um HA-unabhängige Mechanismen von 4-MU handelt. Der Datenlage der Literatur zufolge kann zumindest ein kausaler Zusammenhang zwischen HA und den beobachteten Effekten auf die Vaskularisierung vermutet werden. So wurde beschrieben, dass HMW-HA als anti-angiogenes Molekül fungiert, wohingegen HA-Fragmente eine Angiogenese-fördernde Wirkung aufweisen [202, 203]. Da 4-MU die Aktivität der HA-Synthasen im braunen Fettgewebe, welche infolge einer Adipositas induziert werden, hemmt, besteht die Möglichkeit, dass weniger anti-angiogene HMW-HA synthetisiert wird und dadurch vermehrt Angiogenese im braunen Fettgewebe stattfinden kann. Auch in der Studie von Kang *et al.* konnte nach Behandlung von Mäusen mit der Hyaluronidase PH-20 eine verstärkte Vaskularisierung im Muskel beobachtet werden, was offenbar auf die reduzierte HA-Konzentration zurückzuführen war [195]. Eine Akkumulation von HA im Fettgewebe könnte ähnlich wie Kollagen V, welches im Rahmen einer Adipositas um Gefäße des Fettgewebes akkumuliert und infolgedessen die Angiogenese hemmt [91], die Vaskularisierung negativ beeinflussen. Dieser Effekt könnte entsprechend durch 4-MU inhibiert werden.

In einem weiteren Experiment sollte determiniert werden, ob die Fütterung der Mäuse mit 4-MU nach Kälte-induzierter Aktivierung des braunen Fettgewebes zu einer verstärkten Thermogenese führt. Allerdings konnte hier nur eine leichte, wenngleich über den Zeitraum der achtstündigen Kälteexposition signifikante Steigerung des Energieumsatzes beobachtet werden. 4-MU löst aber bereits basal eine signifikante Erhöhung des Energieumsatzes aus. In Anbetracht dessen wird vermutet, dass die Kapazität zu einer intensiveren Steigerung der Thermogenese erschöpft ist.

Diskussion

Abschließend wurde analysiert, ob es durch Behandlung der Mäuse mit 4-MU neben der Aktivierung des braunen Fettgewebes auch zu einem *Browning* des weißen Fettgewebes kommt. Hierzu wurde das subkutane Fettgewebe untersucht, da vornehmlich in subkutanen Fettdepots ein clusterförmiges Auftreten beigefarbener Adipozyten beobachtet werden kann [204]. *Browning*-Prozesse des weißen Fettgewebes sollen ebenfalls an der Regulation des Energieumsatzes beteiligt sein, da beigefarbene Fettzellen aufgrund der Expression von *Ucp-1* zur Thermogenese befähigt sind [60]. Allerdings zeigte sich durch die Behandlung mit 4-MU kein Effekt auf die Expression des klassischen Thermogenesemarkers *Ucp-1* im subkutanen Fettgewebe. Auch *Cidea* unterlag keiner Regulation durch 4-MU. Ausschließlich *Pgc-1 α* und *Vegf- α* wurden durch 4-MU Behandlung im subkutanen Fettgewebe induziert. Die gesteigerte Expression von *Vegf- α* führte allerdings nicht zu einer erhöhten Gefäßdichte, wie anhand der Isolectin B4 Färbung gezeigt werden konnte. In der Regel tritt aber im Rahmen des *Brownings* im weißen Fettgewebe eine Verdichtung des vaskulären Netzwerkes auf [205]. Dies, zusammen mit der Beobachtung, dass eine *Browning*-vermittelte Induktion von *Pgc-1 α* zumeist auch in einer gesteigerten Expression von *Ucp-1* resultiert [69], lässt ausschließen, dass es unter Behandlung mit 4-MU zu einem klassischen *Browning* des weißen Fettgewebes kommt.

4.5 Effekt von 4-MU auf die Plasmalipidkonzentration

Infolge der Behandlung der Mäuse mit 4-MU zeigte sich nach 22 Wochen Fütterung mit DD kein Unterschied im Plasmalipidprofil. Die Konzentration von Triglyzeriden, FFA, Cholesterin, LDL + VLDL sowie HDL im Plasma der Mäuse war zwischen den Gruppen unverändert. Dies war entgegen der anfänglichen Vermutung, dass eine erhöhte Fettsäureoxidation im braunen Fettgewebe nach Behandlung mit 4-MU auch eine Reduktion der Plasmalipide, insbesondere der Triglyzeride und FFA, hervorrufen würde. Ein derartiger Effekt wurde kürzlich von Bartelt *et al.* beschrieben. Die Gruppe konnte zeigen, dass Mäuse nach einer Kälteexposition vermehrt Triglyzeride aus dem zirkulierenden Blut in das braune Fettgewebe aufnehmen, wo diese aufgrund der Kälte-induzierten Aktivierung des Gewebes als Substrate für die Wärmegewinnung genutzt werden [63]. Dadurch sinkt die Konzentration der Triglyzeride im Plasma. Die Ursache für das unveränderte Plasmalipidprofil unter Behandlung mit 4-MU könnte darin liegen, dass die Lipidspeicherung in Adipozyten aufgrund der reduzierten Masse und Hypertrophie des weißen Fettgewebes verringert ist, trotz Aufnahme des gleichen Anteils an Kohlenhydraten und Lipiden über das Futter. Da auch die ektopische Lipidspeicherung in 4-MU-behandelten Tieren ausgeschlossen werden konnte, würde es daher theoretisch zu einem

Diskussion

Anstieg der Lipidkonzentration im Plasma kommen. Durch Aktivierung des braunen Fettgewebes, wie für die Behandlung mit 4-MU gezeigt, können jedoch anfallende Lipide und Kohlenhydrate direkt im Rahmen der Thermogenese metabolisiert werden. In der Summe ergibt sich somit ein unverändertes Plasmalipidprofil.

4.6 Metabolischer Phänotyp von Has-*knockout* Mäusen

Die Untersuchung der verschiedenen Has-*knockout* Modelle sollte zur Aufklärung beitragen, ob der beobachtete Phänotyp durch Behandlung mit 4-MU tatsächlich auf die Hemmung der HA-Synthese zurückzuführen, und falls ja, welches Has-Isoenzym hieran beteiligt ist. Zwar wurde zwischenzeitlich von Ji *et al.* postuliert, dass ein Zusammenhang zwischen einer Degradation der HA durch Behandlung von Mäusen mit Hyaluronidase und einer Reduktion der Hypertrophie des weißen Fettgewebes und folglich einer verbesserten Insulinresistenz besteht [193]. Allerdings fehlen bis dato systematische Untersuchungen von genetischen *Knockout*-Modellen.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit ubiquitäre Has2- und HAS3-*knockout* sowie adipozytenspezifische Has2- und HAS3-*knockout* Mäuse im Hinblick auf einen metabolischen Phänotyp untersucht. Ubiquitäre *Knockout*-Modelle können diverse Nachteile mit sich bringen. Beispielsweise besteht die Schwierigkeit der eindeutigen Zuordnung von Effekten auf die Beteiligung spezifischer Zellen oder Gewebe. Außerdem können vielfältige gegenregulatorische Mechanismen auftreten, die letztendlich allein verantwortlich für beobachtete Effekte sein oder gar den Effekt des eigentlichen *Knockouts* kaschieren können. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den ubiquitären *Knockouts* auch adipozytenspezifische Has2- und HAS3-*knockout* Mäuse analysiert. Auffällig war, dass in keinem der untersuchten Modelle der vollständige Phänotyp 4-MU-behandelter C57BL/6J reproduziert werden konnte. So zeigten weder ubiquitäre Has2- und HAS3-*knockout* Mäuse, noch adipozytenspezifische Has2- und HAS3-*knockout* Mäuse nach Fütterung einer DD eine deutlich reduzierte Gewichtszunahme. Im Unterschied dazu zeigte sich bei Behandlung mit 4-MU bereits nach 5 Wochen Fütterung ein im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziertes Gewicht der Tiere. Bezüglich der Körperfettbestimmung konnte nur in adipozytenspezifischen Has2-*knockout* Mäusen nach 17 Wochen Fütterung eine signifikante Reduktion des Körperfettanteils festgestellt werden. Analog dazu waren auch das Gewicht und die Adipozytengröße des weißen epididymalen Fettgewebes durch den adipozytenspezifischen Has2-*Knockout* verringert. Eine Reduktion der Masse und Hypertrophie des epididymalen Fettgewebes konnte auch in ubiquitären Has2-*knockout* Mäusen detektiert werden, was

Diskussion

allerdings keine signifikante Veränderung der Gesamt-Körperfettmasse zur Folge hatte. Dies legt die Vermutung nahe, dass andere Fettdepots in ubiquitären *Has2-knockout* Mäusen zu wenig oder gar gegensätzlich beeinflusst wurden, sodass keine für einen signifikanten Effekt ausreichende Reduktion des Körperfettanteils detektiert werden konnte. Hierfür könnte das höhere Alter der ubiquitären *Has2-knockout* Tiere eine Rolle spielen. Da die Induktion des *Knockouts* erst im Alter von 16 – 20 Wochen möglich war, waren die Versuchstiere zum Zeitpunkt der jeweiligen Analysen ca. 10 Wochen älter als die entsprechenden adipozytenspezifischen *knockout* Mäuse. So ist bekannt, dass das Alter selbst ein entscheidender Faktor für die Erhöhung der Körperfettmasse ist [206, 207] – dieser Effekt könnte überwiegen und den des *Knockouts* kaschieren. Außerdem könnte es durch den ubiquitären im Vergleich zum adipozytenspezifischen *Knockout* zu gegenregulatorischen Mechanismen, beispielsweise in der stromal-vaskulären Fraktion des Fettgewebes kommen. Durch den *Has2-Knockout* kann kompensatorisch eine Induktion der *Has1* und/oder *Has3* in Präadipozyten ausgelöst werden, wodurch wiederum ein Anstieg der Fettmasse begünstigt wird. Ein derartiger gegenregulatorischer Mechanismus wurde kürzlich für die Expression der HA-Synthasen von Wang *et al.* beschrieben. In Mäusen, die sowohl für *Has1* als auch *Has3* defizient waren, kam es zu einer kompensatorischen Steigerung der *Has2* mRNA Expression, welche hauptverantwortlich für die in der Publikation dargelegte apoptosehemmende Wirkung in Hautfibroblasten war [208].

Des Weiteren konnte von den untersuchten Modellen einzig in ubiquitären *Has2-knockout* Mäusen eine Verbesserung der Insulinsensitivität gemessen werden. Durch den *Has2-Knockout* kam es im Insulintoleranztest zu einem stärkeren Ansprechen der Zielzellen auf den exogen verabreichten Insulinbolus. Im Glukosetoleranztest konnte hingegen lediglich eine Tendenz in Richtung einer verbesserten Glukoseverstoffwechslung festgestellt werden. Um hier genauere Aussagen bezüglich der Mechanismen der Insulinresistenz treffen zu können, müsste ein hyperglykämisch-euglykämischer *Clamp*-Test angewendet werden, der als Goldstandard zur Bestimmung der Insulinsensitivität im Körper gilt [209]. Der Grund für die verbesserte Insulintoleranz in *Has2-knockout* Mäusen besteht vermutlich in der zeitgleich signifikant reduzierten Inflammation des weißen Fettgewebes. So ist bekannt, dass Entzündungsprozesse im Fettgewebe für die Entstehung der Insulinresistenz eine große Rolle spielen [41]. Dass in adipozytenspezifischen *Has2-knockout* Mäusen keine Veränderung der Entzündung im weißen Fettgewebe beobachtet werden konnte, lässt Rückschlüsse darauf zu, dass die reduzierte Inflammation des epididymalen weißen Fettgewebes in ubiquitären *Has2-knockout* Mäusen auf eine Beteiligung der stromalen Fraktion zurückzuführen ist. Wie in der Literatur beschrieben, können Makrophagen auch aus Präadipozyten des weißen

Diskussion

Fettgewebes hervorgehen [210, 211]. Zudem konnten diverse Studien bereits demonstrieren, dass *Has2* an der Differenzierung unterschiedlicher Zellen beteiligt ist [166, 193]. Daher wird vermutet, dass durch den *Knockout* der *Has2* in Präadipozyten potenziell weniger Differenzierung von Präadipozyten zu Makrophagen stattfinden könnte. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass infolge des ubiquitären *Has2-Knockouts* weniger HA-abhängige, pro-migratorische Signale ausgesendet werden und damit weniger Invasion von Makrophagen in das weiße Fettgewebe stattfindet. Diese Vermutungen müssten im Rahmen weiterführender Experimente verifiziert werden.

In ubiquitären *HAS3-knockout* Mäusen zeigten sich zwar ein reduziertes Gewicht des epididymalen Fettablappens sowie eine verringerte Adipozytenhypertrophie, allerdings war dies, wie auch im Fall der adipozytenspezifischen *Has2-knockout* Tiere, nicht ausreichend, um die Inflammation des Fettgewebes positiv zu beeinflussen. Im Gegensatz hierzu konnte in adipozytenspezifischen *HAS3-knockout* Mäusen eine Reduktion der Entzündung im Fettgewebe detektiert werden, allerdings unterlagen alle weiteren untersuchten Parameter in diesem Modell keinen Veränderungen. Die in der Literatur beschriebene entzündungshemmende Wirkung eines *Has3-Knockouts*, beispielsweise auf inflammatorische Erkrankungen der Lunge [156] oder des Darms [157], konnte somit für die Adipositas-assoziierte Inflammation des weißen Fettgewebes nur in der adipozytenspezifischen *HAS3-knockout* Maus bestätigt werden. Da die Hypertrophie-hemmende Wirkung im weißen Fettgewebe auf die ubiquitäre *HAS3-knockout* Maus beschränkt war, spielen vermeintlich auch hier umliegende Zellen der stromal-vaskulären Fraktion und nicht der direkte *Knockout* in Adipozyten eine Rolle. Ein großer Gewinn zum genaueren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen wäre die Verfügbarkeit einer spezifischen *Knockout*-Maus, in der bereits auf Ebene der Präadipozyten ein *Knockout* induziert werden kann. Dies würde auch der Beantwortung der Frage dienen, ob es *in vivo* durch eine Has-vermittelte Inhibition der HA-Synthese zu einer Hemmung der Adipogenese kommt. Allerdings stehen aktuell keine geeigneten Modelle zur Untersuchung der Adipozytendifferenzierung zur Verfügung [212]. Die in den vorliegenden Studien verwendete *Fabp4Cre*-Maus führt erst nach bereits induzierter adipogener Differenzierung unter Abhängigkeit der gesteigerten Expression von *Ppar γ* zu einer Aktivierung des *Fabp4*-Promotors und damit der Aktivierung der Cre-Rekombinase. Der *Knockout* erfolgt somit erst in terminal differenzierten Adipozyten.

Da im braunen Fettgewebe von DD-gefütterten Mäusen eine gesteigerte Expression der *Has2* mRNA nachgewiesen werden konnte, wurde auch dieses Gewebe im Hinblick auf Veränderungen der Morphologie und Aktivierung in den verschiedenen *Has-knockout* Modellen untersucht. Allerdings zeigte sich ausschließlich nach ubiquitärem *Knockout* der

Diskussion

Has2 eine Reduktion des Gewichts und der Adipozytengröße des braunen Fettgewebes. Im Gegensatz zu den Befunden aus den 4-MU-behandelten Mäusen führte dies jedoch nicht zu einer veränderten Genexpression der Aktivierungsmarker des braunen Fettgewebes oder *Vegf- α* . In adipozytenspezifischen *Has2-knockout* Mäusen waren weder in der Morphologie, noch in der Genexpression der Aktivierungs- und Vaskularisierungsmarker Unterschiede zu verzeichnen. Auch in den beiden untersuchten *HAS3-knockout* Modellen waren keine Unterschiede im Bereich des braunen Fettgewebes detektierbar. Somit schien sich die Defizienz von *Has2* und *HAS3* nicht auf die Aktivität und zitterfreie Thermogenese im braunen Fettgewebe auszuwirken. Im Einklang hiermit war auch kein Unterschied im Energieumsatz der Tiere zu beobachten. Durch 4-MU Behandlung war hingegen eine Reduktion von Masse und Adipozytengröße bei parallel auftretender Steigerung der Aktivität des braunen Fettgewebes nachweisbar. Dies resultierte schließlich in einer Erhöhung des O₂-Verbrauchs bzw. des Energieumsatzes der Tiere. Da in keiner der analysierten *Has-knockout* Mäuse ein vergleichbarer Effekt im braunen Fettgewebe nachgewiesen wurde, besteht zum einen die Vermutung, dass es sich um einen 4-MU-spezifischen Effekt handeln könnte, der unabhängig von einer Hemmung der HA-Synthese vermittelt wird. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Effekte über *Has1*-vermittelt werden. Die Untersuchung von *Has1-knockout* Mäusen könnte also weitere wichtige Erkenntnisse zur Rolle der HA im braunen Fettgewebe liefern.

Allgemein kann festgehalten werden, dass der *Knockout* von *Has2* und *HAS3* im Mausmodell der Diät-induzierten Adipositas nur Teilaspekte der 4-MU Behandlung nachahmen konnte. So konnten die Effekte von 4-MU nur teilweise im weißen Fettgewebe der *Knockout* Mäuse reproduziert werden und zumeist zeigte sich ein Effekt geringeren Ausmaßes. Als Ursache hierfür kommen, wie bereits für den fehlenden Effekt im braunen Fettgewebe nach *Has2* und *HAS3-Knockout* erörtert, HA-unabhängige, direkte Wirkungen von 4-MU oder aber eine *Has1*-vermittelte Wirkung in Frage. Da 4-MU eine Hemmung bzw. verminderte Aktivität aller HAS bewirkt, können an der Entstehung der 4-MU-vermittelten Effekte grundsätzlich alle HAS-Isoenzyme beteiligt sein. In Anbetracht der erhöhten Expression der *Has1* mRNA in weißem und braunem Fettgewebe diabetogen gefütterter Mäuse scheint eine Beteiligung der *Has1* durchaus realistisch. Insofern würde die Untersuchung von *Has1-knockout* Mäusen zu einer genaueren Aufklärung der HA-Abhängigkeit der 4-MU Wirkung beitragen. Letztlich besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Hemmung einer einzigen HAS nicht ausreichend ist um den vollständigen Phänotyp der 4-MU Behandlung zu reproduzieren, da das Fehlen eines HAS-Isoenzymes durch die noch vorhandenen HAS kompensiert werden kann. Daher könnten Doppel- oder gar Triple-*Has-Knockouts*, sprich Ablationen von zwei oder aller drei HAS-Isoenzyme, notwendig sein.

Diskussion

Eine übersichtliche Zusammenfassung der Effekte einer 4-MU-vermittelten Hemmung der HA-Synthese sowie der Effekte der analysierten *Knockout*-Modelle ist in Abbildung 40 dargestellt.

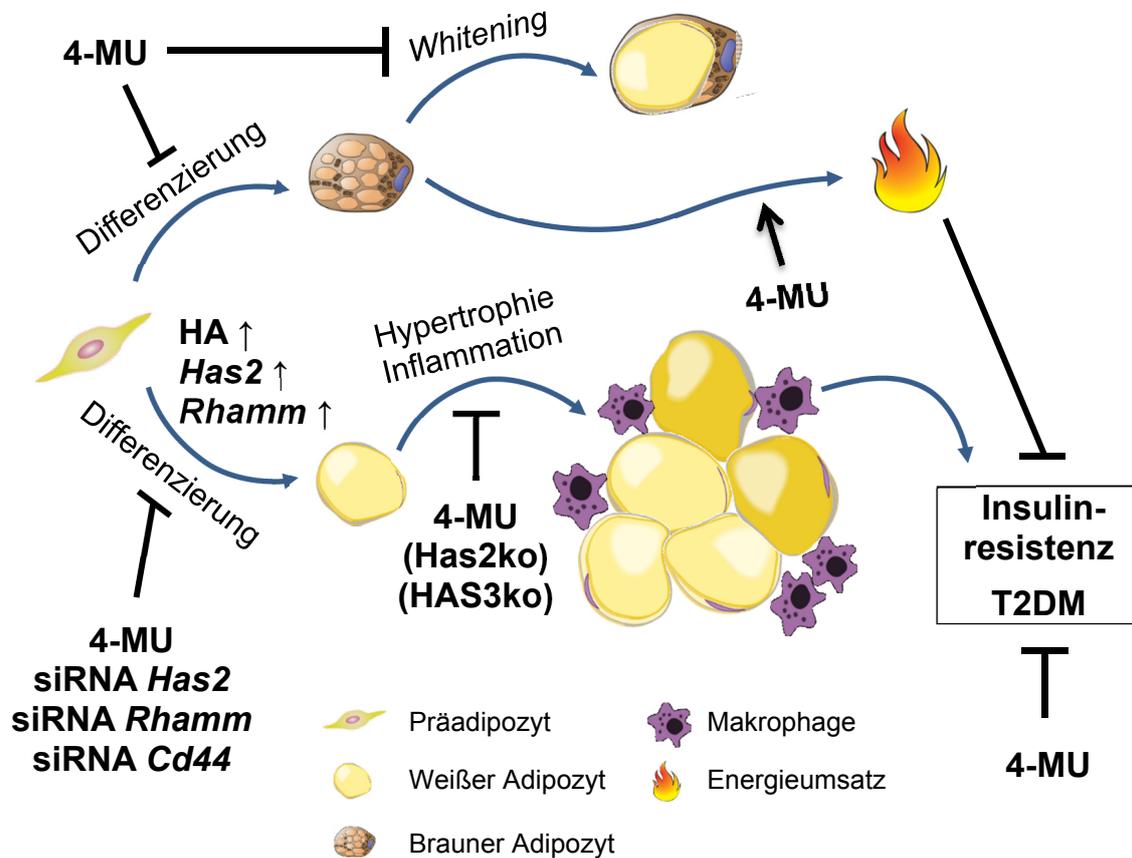


Abbildung 40: Schematische Übersicht der Effekte einer Hemmung der HA-Synthese im Fettgewebe.

Diskussion

4.7 Ausblick und Limitierung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass HA und HA-assoziierte Gene in der Differenzierung und pathologischen Expansion des weißen und braunen Fettgewebes eine Rolle spielen. Dabei konnte 4-MU, ein Inhibitor der HA-Synthese, als vielversprechende Substanz für die Prävention einer Diät-induzierten Adipositas sowie der daraus resultierenden metabolischen Defekte identifiziert werden. Den Ergebnissen zufolge könnte eine frühzeitige Behandlung mit 4-MU potenziell einer Gewichtszunahme und Entstehung einer Insulinresistenz entgegenwirken. Allerdings wurde der präventive Effekt der Substanz in der vorliegenden Arbeit nur bei zeitgleicher Verabreichung der Substanz und einer hochkalorischen Diät beobachtet. Insofern bleibt offen, ob eine Behandlung mit 4-MU auch bei einer bereits bestehenden Adipositas wirksam ist und eine Gewichtsabnahme und eine Aufhebung von Stoffwechseldefekten bewirken kann. Zur Aufklärung dieser Fragestellung könnten in nachfolgenden Experimenten Mäuse nach Auslösung einer Diät-induzierten Adipositas mit 4-MU behandelt und auf eine Verbesserung der metabolischen Gesundheit untersucht werden.

In den Experimenten erfolgte die Verabreichung von 4-MU oral durch Einarbeitung der Substanz in das Mäusefutter. Dies bedingt, dass alle Zellen bzw. Gewebe im Körper von einer Hemmung der HA-Synthese betroffen sind. Inwiefern andere Gewebe als das hier untersuchte weiße und braune Fettgewebe zu den beobachteten Effekten beitragen, bleibt aufzuklären. Dass eine dauerhafte globale Hemmung der HA-Synthese nicht nur Vorteile birgt, konnte bereits von Nagy *et al.* demonstriert werden. Die Autoren zeigten, dass durch Interferenz von 4-MU mit der endothelialen Glykokalyx-Funktion eine Verschlechterung der Atherosklerose auftritt [213].

Die Bestimmung der Glukoseverstoffwechslung und Insulinsensitivität wurde mit Hilfe von Glukose- und Insulintoleranztests durchgeführt. Um allerdings genauere Aussagen bezüglich der zugrundeliegenden Mechanismen einer Insulinresistenz bzw. der beteiligten Organe treffen zu können, wäre eine Testung via hyperglykämisch-euglykämischer *Clamp* Technologie von großer Bedeutung.

Alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden entweder an murinen Zellkulturmodellen oder am Mausmodell *in vivo* durchgeführt. Die Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf das humane Krankheitsbild einer Adipositas und Insulinresistenz ist daher nicht gesichert. Dies liegt insbesondere darin begründet, dass in C57BL/6J Mäusen nach Induktion einer Diät-induzierten Adipositas zwar eine prädiabetische Stoffwechsellage einschließlich einer Insulinresistenz, die vergleichbar mit jener im Menschen ist, induziert wird [152]. Allerdings

Diskussion

zeigen C57BL/6J Mäuse keine erschöpfte Insulinsekretionsfähigkeit infolge eines β -Zell-Versagens des Pankreas, wie sie typischerweise im Endstadium eines T2DM im Menschen in Erscheinung tritt [214]. Der Pankreas von C57BL/6J Mäusen ist in der Lage, das verminderte Ansprechen der Zielzellen auf Insulin stetig durch eine gesteigerte Sekretion aus dem Pankreas auszugleichen [215, 216]. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass sich braune Fettdepots in Mäusen von jenen im Menschen unterscheiden. Im Gegensatz zu Nagern entwickelt sich das braune Fettgewebe zwischen den Schulterblättern im Menschen kurze Zeit nach der Geburt zurück. In den letzten Jahren konnten verschiedene Arbeitsgruppen allerdings nachweisen, dass auch im Erwachsenenalter metabolisch aktives braunes Fettgewebe auffindbar ist [53-56]. Es bleibt allerdings zu verifizieren, ob diese Depots ein ähnliches Ansprechen auf eine Behandlung mit 4-MU zeigen, wie es im Mausmodell beobachtet werden konnte.

Abschließend konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Wirkung von 4-MU tatsächlich durch eine Hemmung der HA-Synthese bedingt ist. Um diese Fragestellung beantworten zu können, sind Analysen weiterer *Knockout*-Modelle von Nöten. So wären in folgenden Experimenten *Has1-knockout* und *Has-Doppel-* (*Has1/Has2-*, *Has1/Has3-*, *Has2/Has3-*) bzw. *Has1/2/3-Triple-knockout* Mäuse im Hinblick auf einen metabolischen Phänotyp zu untersuchen. Außerdem könnte von Interesse sein, den Effekt eines *Hyal-Knockouts* zu analysieren, da bekannt ist, dass HA-Fragmente inflammatorische Eigenschaften aufweisen und eine tendenziell verstärkte Expression der *Hyal1* und *Hyal2* mRNA im weißen Fettgewebe diabetogen gefütterter Mäuse nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der stark induzierten Genexpression von *Rhamm* im braunen und weißen Fettgewebe adipöser Mäuse könnte auch die Untersuchung von *Rhamm*-defizienten Mäusen vielversprechend sein.

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der Adipositas tragen Hypertrophie und chronische Entzündungsprozesse im weißen Fettgewebe bedeutend zur Entwicklung einer Insulinresistenz bei. Es mangelt jedoch bislang an unterstützenden Therapiemöglichkeiten, um einer Adipositas und den damit verbundenen Risiken vorzubeugen. Eine besondere Rolle in der Prävention einer Gewichtszunahme wird vermehrt der Thermogenese im braunen Fettgewebe zugeschrieben.

Die Differenzierung und Expansion des weißen Fettgewebes wird bekanntermaßen von einer Akkumulation der Hyaluronsäure (HA) begleitet. Hingegen liegen keine Erkenntnisse zur Rolle der HA im braunen Fettgewebe vor. Ziel dieser Arbeit war es, systematisch aufzuklären, welchen Veränderungen das HA-System im weißen und braunen Fettgewebe bei Adipositas unterliegt. Weiterhin sollte untersucht werden, inwiefern sich eine Hemmung der HA-Synthese auf die Funktion der Gewebe sowie die metabolische Gesundheit auswirkt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung von Adipozyten *in vitro* abhängig von einer gesteigerten HAS2-vermittelten HA-Synthese ist, wobei auch die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM involviert zu sein scheinen. So führte die Reduktion der HA-Konzentration durch Behandlung mit dem HA-Synthese-Inhibitor 4-Methylumbelliferon (4-MU), Hyaluronidase oder *Has2* siRNA sowie die Hemmung der HA-Signalwege durch *Cd44* und *Rhamm* siRNA zu einer verminderten Adipozytendifferenzierung. *In vivo* konnte in Mäusen infolge einer Diät-induzierten Adipositas eine gesteigerte Expression von *Has1*, *Has2*, *Cd44* und *Rhamm* im braunen und weißen Fettgewebe demonstriert werden. Die pharmakologische Hemmung der HA-Synthese mittels 4-MU in diabetogen gefütterten Mäusen resultierte in einer Reduktion der Adipositas sowie einer verringerten Hypertrophie und Inflammation des weißen Fettgewebes. Parallel kam es zu einer Verbesserung der Glukose- und Insulintoleranz. Darüber hinaus zeigte sich eine Erhöhung des Energieumsatzes 4-MU-behandelter Tiere, vermutlich infolge einer verstärkten Vaskularisierung und erhöhten Aktivität des braunen Fettgewebes. Die Verbesserung der Insulinresistenz durch 4-MU resultiert zusammenfassend vermutlich sowohl aus einer Reduktion der inflammatorischen Prozesse im weißen Fettgewebes als auch einer zeitgleich auftretenden Verstärkung der Energieverbrennung im braunen Fettgewebe.

Die Ergebnisse der 4-MU Behandlung konnten durch Untersuchung ubiquitärer und adipozytenspezifischer *Has2*- und *HAS3-knockout* Mäuse nur teilweise reproduziert werden. Somit wird geschlussfolgert, dass entweder HA-unabhängige Effekte für die Wirkung von 4-MU eine Rolle spielen oder der *Knockout* eines einzigen HAS-Isoenzym nicht ausreichend ist, um den vollständigen Phänotyp einer 4-MU Behandlung nachzustellen.

Summary

6 Summary

Hypertrophy and chronic inflammatory processes in white adipose tissue, as observed during obesity, significantly contribute to the development of insulin resistance. Nevertheless, supportive therapies for the prevention of obesity and its related risks are still lacking. A notable role in the prevention of weight gain is increasingly attributed to thermogenesis in brown adipose tissue.

The differentiation and expansion of white adipose tissue is known to be accompanied by an accumulation of hyaluronic acid (HA). However, there is no evidence about the role of HA in brown adipose tissue. The aim of this study was to systematically analyze the occurring changes in HA system in white and brown adipose tissue during obesity. Furthermore, it should be investigated how the function of these tissues and metabolic health is affected by an inhibition of HA synthesis.

It could be shown that the differentiation of adipocytes *in vitro* depends on an increased HAS2-mediated HA synthesis, whereas the HA receptors CD44 and RHAMM also seem to be involved. Thus, a reduction of HA concentration by treatment with the HA synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone (4-MU), hyaluronidase, or *Has2* siRNA as well as the inhibition of HA signaling pathways by *Cd44* and *Rhamm* siRNA resulted in reduced adipocyte differentiation. *In vivo*, an increased expression of *Has1*, *Has2*, *Cd44* and *Rhamm* in brown and white adipose tissue could be demonstrated in mice following a diet-induced obesity. The pharmacological inhibition of HA synthesis by 4-MU in mice fed with a diabetogenic diet led to a reduction in obesity and reduced hypertrophy and inflammation of the white adipose tissue. In parallel, there was an improvement in systemic glucose and insulin tolerance. Moreover, 4-MU treated animals revealed an increase in energy expenditure, probably due to higher vascularization and elevated thermogenic activity in brown adipose tissue. Collectively, the improvement of insulin resistance mediated by 4-MU probably results both from a reduction of the inflammatory processes in white adipose tissue as well as a simultaneous increase of energy consumption in brown adipose tissue.

The results obtained after 4-MU treatment could only partially be reproduced by examining ubiquitous and adipocyte-specific *Has2*- and *HAS3-knockout* mice. Thus, it is concluded that either HA-independent effects could contribute to the action of 4-MU or that the *knockout* of a single HAS isoenzyme is not sufficient to reproduce the full phenotype of the treatment with 4-MU.

Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

1. Isomaa, B., et al., *Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome*. Diabetes Care, 2001. **24**(4): p. 683-9.
2. Lakka, H.M., et al., *The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men*. JAMA, 2002. **288**(21): p. 2709-16.
3. Malik, S., et al., *Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults*. Circulation, 2004. **110**(10): p. 1245-50.
4. Pischon, T., et al., *General and abdominal adiposity and risk of death in Europe*. N Engl J Med, 2008. **359**(20): p. 2105-20.
5. Lenz, M., T. Richter, and I. Muhlhauser, *The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood: a systematic review*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(40): p. 641-8.
6. Adams, K.F., et al., *Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old*. N Engl J Med, 2006. **355**(8): p. 763-78.
7. Flegal, K.M., et al., *Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2013. **309**(1): p. 71-82.
8. Finkelstein, E.A., et al., *Obesity and severe obesity forecasts through 2030*. Am J Prev Med, 2012. **42**(6): p. 563-70.
9. Christensen, R., et al., *Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2007. **370**(9600): p. 1706-13.
10. James, W.P., et al., *Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects*. N Engl J Med, 2010. **363**(10): p. 905-17.
11. Fox, C.S., et al., *Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study*. Circulation, 2007. **116**(1): p. 39-48.
12. Kuk, J.L., et al., *Visceral fat is an independent predictor of all-cause mortality in men*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14**(2): p. 336-41.
13. McLaughlin, T., et al., *Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(11): p. E1756-60.
14. Park, A., W.K. Kim, and K.H. Bae, *Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells*. World J Stem Cells, 2014. **6**(1): p. 33-42.

Literaturverzeichnis

15. Rosen, E.D., et al., *Transcriptional regulation of adipogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(11): p. 1293-307.
16. Ntambi, J.M. and K. Young-Cheul, *Adipocyte differentiation and gene expression*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3122S-3126S.
17. Armani, A., et al., *Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity*. J Cell Biochem, 2010. **110**(3): p. 564-72.
18. Gregoire, F.M., C.M. Smas, and H.S. Sul, *Understanding adipocyte differentiation*. Physiol Rev, 1998. **78**(3): p. 783-809.
19. Tang, Q.Q., T.C. Otto, and M.D. Lane, *Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 44-9.
20. Scott, R.E., et al., *Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle: GD*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(3): p. 845-9.
21. Sun, K., C.M. Kusminski, and P.E. Scherer, *Adipose tissue remodeling and obesity*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2094-101.
22. Jo, J., et al., *Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth*. PLoS Comput Biol, 2009. **5**(3): p. e1000324.
23. Wang, Q.A., et al., *Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1338-44.
24. Stern, J.S., et al., *Adipose-cell size and immunoreactive insulin levels in obese and normal-weight adults*. Lancet, 1972. **2**(7784): p. 948-51.
25. Salans, L.B., J.L. Knittle, and J. Hirsch, *The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity*. J Clin Invest, 1968. **47**(1): p. 153-65.
26. Bjorntorp, P., et al., *Adipose tissue fat cell size and number in relation to metabolism in randomly selected middle-aged men and women*. Metabolism, 1971. **20**(10): p. 927-35.
27. Cao, Y., *Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2362-8.
28. Lijnen, H.R., *Angiogenesis and obesity*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(2): p. 286-93.
29. Corvera, S. and O. Gealekman, *Adipose tissue angiogenesis: impact on obesity and type-2 diabetes*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 463-72.
30. Rausch, M.E., et al., *Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(3): p. 451-63.
31. Ye, J., et al., *Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(4): p. E1118-28.

Literaturverzeichnis

32. Hosogai, N., et al., *Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 901-11.
33. Miele, C., et al., *Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21695-702.
34. Mick, G.J., X. Wang, and K. McCormick, *White adipocyte vascular endothelial growth factor: regulation by insulin*. Endocrinology, 2002. **143**(3): p. 948-53.
35. Fukumura, D., et al., *Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis*. Circ Res, 2003. **93**(9): p. e88-97.
36. Sung, H.K., et al., *Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis*. Cell Metab, 2013. **17**(1): p. 61-72.
37. Tinahones, F.J., et al., *Obesity-associated insulin resistance is correlated to adipose tissue vascular endothelial growth factors and metalloproteinase levels*. BMC Physiol, 2012. **12**: p. 4.
38. Halberg, N., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(16): p. 4467-83.
39. Jiang, C., et al., *Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice*. Diabetes, 2011. **60**(10): p. 2484-95.
40. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
41. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
42. Fernandez-Real, J.M., et al., *Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition*. Diabetes Care, 2003. **26**(5): p. 1362-8.
43. Bastard, J.P., et al., *Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(5): p. 2084-9.
44. Hotamisligil, G.S., *Inflammatory pathways and insulin action*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27 Suppl 3**: p. S53-5.
45. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
46. Kaplan, J.L., et al., *Adipocyte progenitor cells initiate monocyte chemoattractant protein-1-mediated macrophage accumulation in visceral adipose tissue*. Mol Metab, 2015. **4**(11): p. 779-94.

Literaturverzeichnis

47. Cinti, S., et al., *Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans*. J Lipid Res, 2005. **46**(11): p. 2347-55.
48. Boden, G., *Free fatty acids-the link between obesity and insulin resistance*. Endocr Pract, 2001. **7**(1): p. 44-51.
49. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet, 1963. **1**(7285): p. 785-9.
50. Gordon, E.S., *The Glucose-Fatty Acid Cycle in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 1964. **76**: p. 124-34.
51. Unger, R.H. and L. Orci, *Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24 Suppl 4**: p. S28-32.
52. Qatanani, M. and M.A. Lazar, *Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu*. Genes Dev, 2007. **21**(12): p. 1443-55.
53. Nedergaard, J., T. Bengtsson, and B. Cannon, *Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(2): p. E444-52.
54. Cypess, A.M., et al., *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. N Engl J Med, 2009. **360**(15): p. 1509-17.
55. Saito, M., et al., *High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity*. Diabetes, 2009. **58**(7): p. 1526-31.
56. Virtanen, K.A., et al., *Functional brown adipose tissue in healthy adults*. N Engl J Med, 2009. **360**(15): p. 1518-25.
57. Kajimura, S., et al., *Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1154-8.
58. Rajakumari, S., et al., *EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity*. Cell Metab, 2013. **17**(4): p. 562-74.
59. Harms, M. and P. Seale, *Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1252-63.
60. Wu, J., et al., *Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human*. Cell, 2012. **150**(2): p. 366-76.
61. Lowell, B.B., et al., *Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue*. Nature, 1993. **366**(6457): p. 740-2.
62. Stanford, K.I., et al., *Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 215-23.
63. Bartelt, A., et al., *Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance*. Nat Med, 2011. **17**(2): p. 200-5.

Literaturverzeichnis

64. Surwit, R.S., et al., *Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 4061-5.
65. Fromme, T. and M. Klingenspor, *Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **300**(1): p. R1-8.
66. Enerback, S., et al., *Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese*. Nature, 1997. **387**(6628): p. 90-4.
67. Feldmann, H.M., et al., *UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality*. Cell Metab, 2009. **9**(2): p. 203-9.
68. Zhou, Z., et al., *Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity*. Nat Genet, 2003. **35**(1): p. 49-56.
69. Puigserver, P., et al., *A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis*. Cell, 1998. **92**(6): p. 829-39.
70. Kleiner, S., et al., *Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1alpha in adipose tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(24): p. 9635-40.
71. Leone, T.C., et al., *PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis*. PLoS Biol, 2005. **3**(4): p. e101.
72. Xue, Y., et al., *Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation*. Cell Metab, 2009. **9**(1): p. 99-109.
73. Asano, A., et al., *Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis*. Biochem J, 1997. **328 (Pt 1)**: p. 179-83.
74. Tonello, C., et al., *Role of sympathetic activity in controlling the expression of vascular endothelial growth factor in brown fat cells of lean and genetically obese rats*. FEBS Lett, 1999. **442**(2-3): p. 167-72.
75. Bagchi, M., et al., *Vascular endothelial growth factor is important for brown adipose tissue development and maintenance*. FASEB J, 2013. **27**(8): p. 3257-71.
76. Elias, I., et al., *Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2012. **61**(7): p. 1801-13.
77. Sun, K., et al., *Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(15): p. 5874-9.
78. Shimizu, I., et al., *Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity*. J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2099-112.

Literaturverzeichnis

79. Mariman, E.C. and P. Wang, *Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(8): p. 1277-92.
80. Huang, G. and D.S. Greenspan, *ECM roles in the function of metabolic tissues*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(1): p. 16-22.
81. Pierleoni, C., et al., *Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue*. Eur J Histochem, 1998. **42**(3): p. 183-8.
82. Aratani, Y. and Y. Kitagawa, *Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex*. J Biol Chem, 1988. **263**(31): p. 16163-9.
83. Maquoi, E., et al., *Enhanced nutritionally induced adipose tissue development in mice with stromelysin-1 gene inactivation*. Thromb Haemost, 2003. **89**(4): p. 696-704.
84. Christiaens, V., I. Scroyen, and H.R. Lijnen, *Role of proteolysis in development of murine adipose tissue*. Thromb Haemost, 2008. **99**(2): p. 290-4.
85. Lijnen, H.R., et al., *Adipocyte hypertrophy in stromelysin-3 deficient mice with nutritionally induced obesity*. Thromb Haemost, 2002. **87**(3): p. 530-5.
86. Lijnen, H.R., et al., *Matrix metalloproteinase inhibition impairs adipose tissue development in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(3): p. 374-9.
87. Halberg, N., I. Wernstedt-Asterholm, and P.E. Scherer, *The adipocyte as an endocrine cell*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2008. **37**(3): p. 753-68, x-xi.
88. Khan, T., et al., *Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(6): p. 1575-91.
89. Spencer, M., et al., *Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(6): p. E1016-27.
90. Ucuzian, A.A., et al., *Molecular mediators of angiogenesis*. J Burn Care Res, 2010. **31**(1): p. 158-75.
91. Spencer, M., et al., *Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(12): p. E1990-8.
92. Fraser, J.R., T.C. Laurent, and U.B. Laurent, *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. J Intern Med, 1997. **242**(1): p. 27-33.
93. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
94. Itano, N. and K. Kimata, *Mammalian hyaluronan synthases*. IUBMB Life, 2002. **54**(4): p. 195-9.

Literaturverzeichnis

95. Schulz, T., U. Schumacher, and P. Prehm, *Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 20999-1004.
96. Hubbard, C., et al., *The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan*. J Mol Biol, 2012. **418**(1-2): p. 21-31.
97. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25085-92.
98. Spicer, A.P. and J.Y. Tien, *Hyaluronan and morphogenesis*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2004. **72**(1): p. 89-108.
99. Tammi, R.H., et al., *Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis*. FEBS J, 2011. **278**(9): p. 1419-28.
100. Camenisch, T.D., et al., *Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme*. J Clin Invest, 2000. **106**(3): p. 349-60.
101. Toole, B.P., *Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins*. Curr Opin Cell Biol, 1990. **2**(5): p. 839-44.
102. Knudson, C.B. and W. Knudson, *Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease*. FASEB J, 1993. **7**(13): p. 1233-41.
103. Vigetti, D., et al., *Hyaluronan: biosynthesis and signaling*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(8): p. 2452-9.
104. Yoshida, H., et al., *KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(14): p. 5612-7.
105. Toole, B.P., *Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(7): p. 528-39.
106. Stern, R., A.A. Asari, and K.N. Sugahara, *Hyaluronan fragments: an information-rich system*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(8): p. 699-715.
107. Lepperdinger, G., B. Strobl, and G. Kreil, *HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22466-70.
108. Bates, E.J., et al., *Effect of oxygen-derived reactive species on cartilage proteoglycan-hyaluronate aggregates*. Biochem Int, 1984. **8**(5): p. 629-37.
109. Soltés, L., et al., *Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan*. Biomacromolecules, 2006. **7**(3): p. 659-68.
110. Panasyuk, A., et al., *Effect of reactive oxygen species on the biosynthesis and structure of newly synthesized proteoglycans*. Free Radic Biol Med, 1994. **16**(2): p. 157-67.

Literaturverzeichnis

111. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(1): p. 221-64.
112. West, D.C., et al., *Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid*. *Science*, 1985. **228**(4705): p. 1324-6.
113. Takeda, S. and M. Aburada, *The choloretic mechanism of coumarin compounds and phenolic compounds*. *J Pharmacobiodyn*, 1981. **4**(9): p. 724-34.
114. Nakamura, T., et al., *Effect of 4-methylumbelliferone on cell-free synthesis of hyaluronic acid*. *Biochem Mol Biol Int*, 1997. **43**(2): p. 263-8.
115. Nakamura, T., et al., *Hyaluronic-acid-deficient extracellular matrix induced by addition of 4-methylumbelliferone to the medium of cultured human skin fibroblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **208**(2): p. 470-5.
116. Kakizaki, I., et al., *A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(32): p. 33281-9.
117. Kultti, A., et al., *4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3*. *Exp Cell Res*, 2009. **315**(11): p. 1914-23.
118. Vigetti, D., et al., *The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells*. *Glycobiology*, 2009. **19**(5): p. 537-46.
119. Vigetti, D., et al., *Molecular cloning and characterization of UDP-glucose dehydrogenase from the amphibian *Xenopus laevis* and its involvement in hyaluronan synthesis*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(12): p. 8254-63.
120. Magee, C., M. Nurminskaya, and T.F. Linsenmayer, *UDP-glucose pyrophosphorylase: up-regulation in hypertrophic cartilage and role in hyaluronan synthesis*. *Biochem J*, 2001. **360**(Pt 3): p. 667-74.
121. Morohashi, H., et al., *Study of hyaluronan synthase inhibitor, 4-methylumbelliferone derivatives on human pancreatic cancer cell (KP1-NL)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **345**(4): p. 1454-9.
122. Kudo, D., et al., *Effect of a hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, on B16F-10 melanoma cell adhesion and locomotion*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **321**(4): p. 783-7.
123. Bhattacharyya, S.S., et al., *A synthetic coumarin (4-methyl-7 hydroxy coumarin) has anti-cancer potentials against DMBA-induced skin cancer in mice*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **614**(1-3): p. 128-36.

Literaturverzeichnis

124. Edward, M., et al., *4-Methylumbelliferone inhibits tumour cell growth and the activation of stromal hyaluronan synthesis by melanoma cell-derived factors*. Br J Dermatol, 2010. **162**(6): p. 1224-32.
125. Urakawa, H., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-methylumbelliferone suppresses tumorigenicity in vitro and metastatic lesions of bone in vivo*. Int J Cancer, 2012. **130**(2): p. 454-66.
126. Saito, T., T. Dai, and R. Asano, *The hyaluronan synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone exhibits antitumor effects against mesenchymal-like canine mammary tumor cells*. Oncol Lett, 2013. **5**(3): p. 1068-1074.
127. Colombaro, V., et al., *Inhibition of hyaluronan is protective against renal ischaemia-reperfusion injury*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(10): p. 2484-93.
128. Mueller, A.M., B.H. Yoon, and S.A. Sadiq, *Inhibition of hyaluronan synthesis protects against central nervous system (CNS) autoimmunity and increases CXCL12 expression in the inflamed CNS*. J Biol Chem, 2014. **289**(33): p. 22888-99.
129. McKallip, R.J., H. Ban, and O.N. Uchakina, *Treatment with the hyaluronic Acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone suppresses LPS-induced lung inflammation*. Inflammation, 2015. **38**(3): p. 1250-9.
130. McKallip, R.J., H.F. Hagele, and O.N. Uchakina, *Treatment with the hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone suppresses SEB-induced lung inflammation*. Toxins (Basel), 2013. **5**(10): p. 1814-26.
131. Calvo, J.C., et al., *Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes with 3-isobutyl-1-methylxanthine and dexamethasone stimulates cell-associated and soluble chondroitin 4-sulfate proteoglycans*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11237-44.
132. Calvo, J.C., et al., *Rheological effects of the presence of hyaluronic acid in the extracellular media of differentiated 3T3-L1 preadipocyte cultures*. Arch Biochem Biophys, 1993. **302**(2): p. 468-75.
133. Allingham, P.G., et al., *Gene expression, synthesis and degradation of hyaluronan during differentiation of 3T3-L1 adipocytes*. Arch Biochem Biophys, 2006. **452**(1): p. 83-91.
134. Zizola, C.F., et al., *Role of versican and hyaluronan in the differentiation of 3T3-L1 cells into preadipocytes and mature adipocytes*. Matrix Biol, 2007. **26**(6): p. 419-30.
135. Han, C.Y., et al., *Adipocyte-derived serum amyloid A3 and hyaluronan play a role in monocyte recruitment and adhesion*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2260-73.
136. Kodama, K., et al., *Expression-based genome-wide association study links the receptor CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(18): p. 7049-54.

Literaturverzeichnis

137. Liu, L.F., et al., *The receptor CD44 is associated with systemic insulin resistance and proinflammatory macrophages in human adipose tissue*. Diabetologia, 2015. **58**(7): p. 1579-86.
138. Kodama, K., et al., *Anti-CD44 antibody treatment lowers hyperglycemia and improves insulin resistance, adipose inflammation, and hepatic steatosis in diet-induced obese mice*. Diabetes, 2015. **64**(3): p. 867-75.
139. Kang, H.S., et al., *CD44 plays a critical role in regulating diet-induced adipose inflammation, hepatic steatosis, and insulin resistance*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58417.
140. Green, H. and M. Meuth, *An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture*. Cell, 1974. **3**(2): p. 127-33.
141. Yang, K., *Adipose tissue protocols*. 2nd ed. Methods in molecular biology. 2008, Totowa, N.J.: Humana. xv, 335 p.
142. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
143. Seibler, J., et al., *Rapid generation of inducible mouse mutants*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(4): p. e12.
144. Matsumoto, K., et al., *Conditional inactivation of Has2 reveals a crucial role for hyaluronan in skeletal growth, patterning, chondrocyte maturation and joint formation in the developing limb*. Development, 2009. **136**(16): p. 2825-35.
145. Kleiber, M., *Body size and metabolic rate*. Physiol Rev, 1947. **27**(4): p. 511-41.
146. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
147. Untergasser, A., et al., *Primer3--new capabilities and interfaces*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(15): p. e115.
148. Ye, J., et al., *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 134.
149. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
150. Green, H. and O. Kehinde, *Sublines of Mouse 3t3 Cells That Accumulate Lipid*. Cell, 1974. **1**(3): p. 113-116.
151. Polonsky, K.S., et al., *Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects*. J Clin Invest, 1988. **81**(2): p. 435-41.

Literaturverzeichnis

152. Winzell, M.S. and B. Ahren, *The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 3**: p. S215-9.
153. Heilbronn, L., S.R. Smith, and E. Ravussin, *Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28 Suppl 4**: p. S12-21.
154. Snel, M., et al., *Ectopic fat and insulin resistance: pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions*. Int J Endocrinol, 2012. **2012**: p. 983814.
155. Sun, K., et al., *Brown adipose tissue derived VEGF-A modulates cold tolerance and energy expenditure*. Mol Metab, 2014. **3**(4): p. 474-83.
156. Bai, K.J., et al., *The role of hyaluronan synthase 3 in ventilator-induced lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(1): p. 92-8.
157. Kessler, S.P., D.R. Obery, and C. de la Motte, *Hyaluronan Synthase 3 Null Mice Exhibit Decreased Intestinal Inflammation and Tissue Damage in the DSS-Induced Colitis Model*. Int J Cell Biol, 2015. **2015**: p. 745237.
158. Takeda, M., et al., *High glucose stimulates hyaluronan production by renal interstitial fibroblasts through the protein kinase C and transforming growth factor-beta cascade*. Metabolism, 2001. **50**(7): p. 789-94.
159. Wang, A., et al., *Hyperglycemia diverts dividing osteoblastic precursor cells to an adipogenic pathway and induces synthesis of a hyaluronan matrix that is adhesive for monocytes*. J Biol Chem, 2014. **289**(16): p. 11410-20.
160. Wang, A. and V.C. Hascall, *Hyaluronan structures synthesized by rat mesangial cells in response to hyperglycemia induce monocyte adhesion*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10279-85.
161. Hemmrich, K., et al., *Autologous in vivo adipose tissue engineering in hyaluronan-based gels--a pilot study*. J Surg Res, 2008. **144**(1): p. 82-8.
162. Hemmrich, K., et al., *Implantation of preadipocyte-loaded hyaluronic acid-based scaffolds into nude mice to evaluate potential for soft tissue engineering*. Biomaterials, 2005. **26**(34): p. 7025-37.
163. Hamilton, S.R., et al., *The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16667-80.
164. Tolg, C., et al., *Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair*. J Cell Biol, 2006. **175**(6): p. 1017-28.

Literaturverzeichnis

165. Nedvetzki, S., et al., *RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(52): p. 18081-6.
166. Hunt, L.C., et al., *Hyaluronan synthesis and myogenesis: a requirement for hyaluronan synthesis during myogenic differentiation independent of pericellular matrix formation*. J Biol Chem, 2013. **288**(18): p. 13006-21.
167. Park, B.G., et al., *Enzymatic fragments of hyaluronan inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 pre-adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2015.
168. Dowell, P., et al., *Suppression of preadipocyte differentiation and promotion of adipocyte death by HIV protease inhibitors*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41325-32.
169. Lenhard, J.M., et al., *HIV protease inhibitors block adipogenesis and increase lipolysis in vitro*. Antiviral Res, 2000. **47**(2): p. 121-9.
170. Zhang, B., et al., *Inhibition of adipocyte differentiation by HIV protease inhibitors*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(11): p. 4274-7.
171. Lee, K., et al., *Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1)*. J Clin Invest, 2003. **111**(4): p. 453-61.
172. Alexandre, K.B., et al., *Metformin inhibits intracellular lipid accumulation in the murine pre-adipocyte cell line, 3T3-L1*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(8): p. 688-90.
173. Gao, Y., et al., *Metformin regulates osteoblast and adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells*. J Pharm Pharmacol, 2008. **60**(12): p. 1695-700.
174. Lonn, M., et al., *Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women*. FASEB J, 2010. **24**(1): p. 326-31.
175. Weyer, C., et al., *Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance*. Diabetologia, 2000. **43**(12): p. 1498-506.
176. Yang, J., et al., *The size of large adipose cells is a predictor of insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients*. Obesity (Silver Spring), 2012. **20**(5): p. 932-8.
177. Watanabe, M., et al., *Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation*. Nature, 2006. **439**(7075): p. 484-9.
178. Zietak, M. and L.P. Kozak, *Bile acids induce uncoupling protein 1-dependent thermogenesis and stimulate energy expenditure at thermoneutrality in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015: p. ajpendo 00485 2015.
179. Makki, K., P. Froguel, and I. Wolowczuk, *Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines*. ISRN Inflamm, 2013. **2013**: p. 139239.

Literaturverzeichnis

180. de Luca, C. and J.M. Olefsky, *Inflammation and insulin resistance*. FEBS Lett, 2008. **582**(1): p. 97-105.
181. Wisse, B.E., *The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(11): p. 2792-800.
182. Kanda, H., et al., *MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1494-505.
183. Kirk, E.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]*. Diabetes, 2008. **57**(5): p. 1254-61.
184. Fain, J.N., *Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 513948.
185. Petrey, A.C. and C.A. de la Motte, *Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 101.
186. Jokela, T.A., et al., *Induction of hyaluronan cables and monocyte adherence in epidermal keratinocytes*. Connect Tissue Res, 2008. **49**(3): p. 115-9.
187. de La Motte, C.A., et al., *Mononuclear leukocytes preferentially bind via CD44 to hyaluronan on human intestinal mucosal smooth muscle cells after virus infection or treatment with poly(I.C)*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30747-55.
188. Lauer, M.E., et al., *Primary murine airway smooth muscle cells exposed to poly(I,C) or tunicamycin synthesize a leukocyte-adhesive hyaluronan matrix*. J Biol Chem, 2009. **284**(8): p. 5299-312.
189. Song, M.J., et al., *Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **346**(3): p. 739-45.
190. Kim, S.J., et al., *Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice*. J Nutr Biochem, 2012. **23**(2): p. 113-22.
191. Poulain-Godefroy, O., et al., *Inflammatory role of Toll-like receptors in human and murine adipose tissue*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 823486.
192. Yoshioka, Y., et al., *Suppression of hyaluronan synthesis alleviates inflammatory responses in murine arthritis and in human rheumatoid synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(5): p. 1160-70.
193. Ji, E., et al., *Inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells and suppression of abdominal fat accumulation in high-fat diet-feeding C57BL/6J mice after downregulation of hyaluronic acid*. Int J Obes (Lond), 2014. **38**(8): p. 1035-43.

Literaturverzeichnis

194. Sim, M.O., et al., *Long-term supplementation of umbelliferone and 4-methylumbelliferone alleviates high-fat diet induced hypertriglyceridemia and hyperglycemia in mice*. Chem Biol Interact, 2014. **216**: p. 9-16.
195. Kang, L., et al., *Hyaluronan accumulates with high-fat feeding and contributes to insulin resistance*. Diabetes, 2013. **62**(6): p. 1888-96.
196. Sammons, M.F. and D.A. Price, *Modulation of adipose tissue thermogenesis as a method for increasing energy expenditure*. Bioorg Med Chem Lett, 2014. **24**(2): p. 425-9.
197. Bukowiecki, L., et al., *Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia*. Am J Physiol, 1982. **242**(6): p. E353-9.
198. Cederberg, A., et al., *FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance*. Cell, 2001. **106**(5): p. 563-73.
199. Liu, X., et al., *Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice*. Endocrinology, 2015. **156**(7): p. 2461-9.
200. Oh, J.E., et al., *Inhibition of mouse brown adipocyte differentiation by second-generation antipsychotics*. Exp Mol Med, 2012. **44**(9): p. 545-53.
201. Yang, X., S. Enerback, and U. Smith, *Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance*. Obes Res, 2003. **11**(10): p. 1182-91.
202. Deed, R., et al., *Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan*. Int J Cancer, 1997. **71**(2): p. 251-6.
203. Slevin, M., et al., *Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways*. Matrix Biol, 2007. **26**(1): p. 58-68.
204. Vitali, A., et al., *The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes*. J Lipid Res, 2012. **53**(4): p. 619-29.
205. Lim, S., et al., *Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice*. Nat Protoc, 2012. **7**(3): p. 606-15.
206. St-Onge, M.P., *Relationship between body composition changes and changes in physical function and metabolic risk factors in aging*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2005. **8**(5): p. 523-8.
207. Atlantis, E., et al., *Lifestyle factors associated with age-related differences in body composition: the Florey Adelaide Male Aging Study*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(1): p. 95-104.
208. Wang, Y., et al., *Hyaluronan synthase 2 protects skin fibroblasts against apoptosis induced by environmental stress*. J Biol Chem, 2014. **289**(46): p. 32253-65.

Literaturverzeichnis

209. Kim, J.K., *Hyperinsulinemic-euglycemic clamp to assess insulin sensitivity in vivo*. Methods Mol Biol, 2009. **560**: p. 221-38.
210. Charriere, G., et al., *Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9850-5.
211. Cousin, B., et al., *A role for preadipocytes as macrophage-like cells*. FASEB J, 1999. **13**(2): p. 305-12.
212. Cristancho, A.G. and M.A. Lazar, *Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(11): p. 722-34.
213. Nagy, N., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis*. Circulation, 2010. **122**(22): p. 2313-22.
214. Omar, B., G. Pacini, and B. Ahren, *Differential development of glucose intolerance and pancreatic islet adaptation in multiple diet induced obesity models*. Nutrients, 2012. **4**(10): p. 1367-81.
215. Winzell, M.S., C. Magnusson, and B. Ahren, *Temporal and dietary fat content-dependent islet adaptation to high-fat feeding-induced glucose intolerance in mice*. Metabolism, 2007. **56**(1): p. 122-8.
216. Ahren, J., B. Ahren, and N. Wierup, *Increased beta-cell volume in mice fed a high-fat diet: a dynamic study over 12 months*. Islets, 2010. **2**(6): p. 353-6.

Originalarbeiten

Originalarbeiten

Grandoch, M., Feldmann K., Gothert, J. R., Dick, L. S., Homann, S., Klatt, C., **Bayer, J. K.**, Waldheim, J. N., Rabausch, B., Nagy, N., Oberhuber, A., Deenen, R., Kohrer, K., Lehr, S., Homey, B., Pfeffer, K., Fischer, J. W. *Deficiency in lymphotoxin beta receptor protects from atherosclerosis in apoE-deficient mice.* Circ Res, 2015. 116(8): p. e57-68.

Kongressbeiträge

Kongressbeiträge

Posterpräsentationen

Bayer, J. K., Grandoch, M., Castañeda, T. R., Fender, A. C., Al-Hasani, H., Fischer, J. W. Role of hyaluronan matrix in white and brown adipose tissue: Possible implications for obesity and insulin resistance. Book of Abstracts, 10th International Conference on Hyaluronan, Juni 2015, Florenz.

Bayer, J. K., Grandoch, M., Fender, A. C., Fischer, J. W. Hyaluronan promotes differentiation and modulates function of white and brown adipocytes: implications for obesity and insulin resistance. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2015;388(Suppl.1):S24.

Schmetter, R., Driesen, T., Schuler, D., Feldmann, K., **Bayer, J. K.**, Grandoch, M., Heiss, C., Kelm, M., Fischer, J. W., Freudenberger, T. Blood-flow recovery after unilateral hind limb ischemia is influenced by hyaluronan synthesis. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2015;388(Suppl.1):S38.

Bayer, J. K., Grandoch, M., Fender, A. C., Rütter, U., Fischer, J. W. Role of HA matrix in adipose tissue: Possible implications for adipose tissue expansion, inflammation and insulin resistance. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2014;387(Suppl.1):S29.

Kurzvorträge

Bayer, J. K., Grandoch, M., Castañeda, T. R., Fender, A. C., Al-Hasani, H., Fischer, J. W. Role of hyaluronan matrix in white and brown adipose tissue: Possible implications for obesity and insulin resistance. 10th International Conference on Hyaluronan, Juni 2015, Florenz.

Lebenslauf

Lebenslauf

Person

Name Julia Katharina Maier (geb. Bayer)
Geburtsdatum 8. November 1986
Geburtsort Lich, Hessen
Staatsangehörigkeit deutsch

Promotion

06/2015 – 05/2016 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf

06/2012 – 05/2015 Promotionsstipendiatin im Graduiertenkolleg „vivid“
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf
Betreuer Prof. Dr. Jens W. Fischer
Thema „Untersuchungen zur Rolle der Hyaluronsäure im
Fettgewebe im Kontext der Entstehung einer Adipositas und
Insulinresistenz“

Studium

05/2012 Approbation als Apothekerin
05/2012 3. Staatsexamen
05/2011 – 10/2011 Pharmaziepraktikantin bei der Bayer Animal Health GmbH in
Monheim, Abteilung Formulierungstechnologie
11/2011 – 04/2012 Pharmaziepraktikantin in der Windmühlen Apotheke Köln
10/2010 2. Staatsexamen
08/2008 1. Staatsexamen
10/2006 – 10/2010 Studium der Pharmazie an der Goethe-Universität Frankfurt
a.M.

Schule

09/1997 – 07/2006 Augustinerschule Friedberg, Gymnasium
09/1993 – 07/1997 Grundschule im Ried, Reichelsheim

Düsseldorf, den 18.03.2016

Danksagung

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer für die Überlassung des Projekts sowie die Betreuung der vorliegenden Arbeit bedanken. Durch die konstruktiven Diskussionen konnten stets neue Ideen und Ansätze ausgearbeitet werden, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders dankbar bin ich für die Möglichkeit, diese Arbeit als Stipendiatin im Rahmen des Graduiertenkollegs „vivid“ der HHU Düsseldorf anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Eckhard Lammert danke ich für die Übernahme der Mentorenschaft und die anregenden Diskussionen während der *Progress Meetings*.

Weiterhin möchte ich mich von Herzen bei Frau Dr. Maria Grandoch für die immerwährende Unterstützung, die vielen gewinnbringenden Gespräche und ihre entscheidende Rolle für den Fortschritt des Projekts bedanken. Frau Dr. Anke Fender möchte ich dafür danken, dass sie mir die Eingewöhnungsphase und Einarbeitung am Institut sehr erleichtert hat.

Herrn Dr. Prof. Al-Hasani und Frau Dr. Tamara Castañeda danke ich für die Hilfe bei der Messung des Kälte-induzierten Energieumsatzes. Besonders die zahlreichen fachlichen Diskussionen mit Tamara Castañeda, aber auch das ein oder andere private Gespräch haben mir sehr weitergeholfen. Ein Dank gilt zudem unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Michael Roden, Dr. Tomas Jelenik sowie Dr. Zhou Zhou für die Unterstützung bei diversen metabolischen Untersuchungen und Fragestellungen.

Eine große Hilfe im Laboralltag stellten Annika Zimmermann, Petra Rompel, Kerstin Freidel, Beate Weyrauther und Irmhild Rüter dar – so konnte meist eine schnelle Lösung für das ein oder andere experimentelle Problem gefunden werden. Vielen Dank auch an Erika Lohmann, Karin Montag sowie Susanne Mansfeld für die Hilfe bei der Bewältigung anfallender organisatorischer und formeller Hürden.

Bei dem gesamten Kollegium möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit, gegenseitige Unterstützung und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Meinen langjährigen Mitdoktoranden danke ich außerdem für die zahlreichen schönen Stunden, die wir auf der Arbeit, aber auch privat verbracht haben. So sind während der Promotionszeit gute Freundschaften entstanden, welche doch des Öfteren dazu beigetragen haben, ein Licht am Ende des Tunnels erkennen zu können. Dies gilt ebenso für meine vivid-Mitstipendiaten – wie schön, dass wir von Beginn an so ein wunderbares Team waren und entsprechend tolle Zeiten bei den wissenschaftlichen *Retreats* oder auf Weihnachtsmärkten verbracht haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen lieben Freunden und meinem Mann bedanken, die mir jederzeit eine liebevolle Stütze waren und ohne deren Rückhalt ich vermutlich nie so weit gekommen wäre.

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 18.03.2016

Julia Katharina Maier