Aus dem Institut für Translationale Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Maria Grandoch

Untersuchung der Hyaluronsäure-reichen Matrix im Fettgewebe des Knochenmarks während der Entwicklung und Progression von Typ 2 Diabetes Mellitus

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Katja Heller

aus Aachen

Düsseldorf, Januar 2024

aus dem Institut für Translationale Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referentin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2024

Inhaltsverzeichnis

InhaltsverzeichnisIII			
Abkürzı	ungsverzeichnis	VIII	
1.Einlei	tung	1	
1.1 A	dipositas und Typ 2 Diabetes Mellitus	1	
1.2 F	ettgewebe	2	
1.3 K	nochenmarkfettgewebe	4	
1.3.1	Morphologie und Anatomie von Knochenmarkfettgewebe	4	
1.3.2	Ursprung von Knochenmarkfettgewebe	6	
1.3.3	Metabolische Charakteristika und Funktionen von BMAT	8	
1.3.	3.1 Alters- und geschlechtsspezifische Physiologie von BMAT	8	
1.3.	3.2 BMAT-Lipidmetabolismus	10	
1.3.	3.3 Insulinsensibilität und Glukoseaufnahme von BMAT	10	
1.3.	3.4 Sekretorische Eigenschaften von BMAT	11	
1.3.4	Veränderungen des BMAT bei Adipositas und Stoffwechselstörungen	12	
1.3.5	Funktionen von BMAT in Physiologie und Pathologie	16	
1.3.	1.3.5.1 Beziehung zwischen BMAT und der Hämatopoese16		
1.3.	5.2 Einfluss von BMAT auf den Energiemetabolismus	18	
1.4 E	xtrazelluläre Matrix	21	
1.5 H	lyaluronsäure	22	
1.5.1	Synthese, Vorkommen und Degradation der HA	22	
1.5.2	HA- Rezeptoren und -Bindeproteine	24	
1.5.	2.1 CD44	24	
1.5.3	HA im Fettgewebe und bei T2DM	25	
1.6 Z	ïelsetzung der Arbeit	28	
2.Material und Methoden29			
2.1 T	ïerversuche	29	
2.2 T	ïerhaltung	29	
2.2.1	Verwendete Tiere	29	

	2.2.	1.1 Ubiquitäre Has1-Knockout Maus (C57BL/6J.Cg-Has1tm)	29
	2.2.	1.2 Ubiquitäre <i>Has2-Knockout</i> Maus (Rosa26CreER ^{T2} /Has2 ^{flox/flox})	
2	2.2.2	Injektion von Tamoxifen zur Induktion des Has2-Knockouts	
2	2.2.3	Fütterung und experimentelles Schema	
2	2.2.4	Intraperitonealer Glukosetoleranztest	
2	2.2.5	Organentnahme und Gewebepräparation	
2	2.2.6	Generierung von Blutplasma	
2	2.2.7	Plasma Insulin ELISA	34
2	2.2.8	Überstand des Knochenmarkfettgewebes	34
2	2.2.9	Multiplex Zytokin-Assay	
2	2.2.10	Laktatdehydrogenase-Assay	
2	2.2.11	Durchflusszytometrie	
	2.2.	11.1 Blut	
	2.2.	11.2 Knochenmarkfett	
	2.2.	11.3 Milz	
2.3	Μ	lolekularbiologische Analysen	
2	2.3.1	Gesamt-RNA Extraktion aus dem Knochenmarkfettgewebe	
2	2.3.2	cDNA-Synthese	
2	2.3.3	Quantitative <i>Real-time</i> -PCR	
2.4	Ν	letabolische Analyse von Knochenmarkfett mittels Seahorse XFe Ar	nalysator
			40
2.5	Н	listologische Analysen	42
2	2.5.1	Hyaluronsäure Färbung	44
	2.5.	1.1 Immunhistochemische Färbung der HA	44
2	2.5.2	Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung	45
2.6	Ν	likro-Computertomographie-Scan (μCT)	45
2.7	Z	ellkulturversuche	46
2	2.7.1	Isolierung und Differenzierung von Prä-Adipozyten aus der s	tromalen
		Knochenmarkfraktion	47
	2.7.	1.1 Präparation und Isolierung	48 IV

2	2.7.1.2 Adipogene Differenzierung
2	2.7.1.3 Zellzahlbestimmung:49
2.7.	.2 Öl Rot-Färbung49
2.7.	.3 CD44-Blockierung <i>in vitro</i> 49
2.8	Statistische Analysen
3.Erg	jebnisse
3.1	Einfluss von Adipositas und Glukoseintoleranz nach diabetogener Fütterung auf das Stammzell-/Immunzell-Reservoir im Knochenmark von C57BL/6J- Mäusen
3.1.	.1 Analyse der HSZ in den Knochenmarkfettsubtypen prä-diabetischer C57BL/6J-Mäuse
3.1.	.2 Analyse von Immunzellen in den Knochenmarkfettsubtypen prä- diabetischer C57BL/6J-Mäuse
3.2	cMAT-Sekretionsprofil von C57BL/6J Mäusen im Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz60
3.3	Auswirkungen von Diät-induzierter Adipositas und Glukoseintoleranz auf die cMAT-Stoffwechselaktivität von C57BL/6J Mäusen62
3.4	Charakterisierung der HA-Matrix im Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen64
3.5	Rolle von CD44 bei der Knochenmarkadipogenese in vitro66
3.6	Effekt der genetischen <i>Has</i> -Defizienz im Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz67
3.6.	.1 Einfluss der Diät-induzierten Adipositas auf das Körpergewicht sowie die Glukosetoleranz bei <i>Has2-</i> Defizienz <i>in vivo</i>
3.7	Einfluss der HAS2 auf die Heterogenität der Knochenmarknische in einem Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz
3.8	Einfluss von HAS2 auf die Adipogenese im Knochenmark in vitro71
3.9	Einfluss von HAS2 auf den cMAT-Energiestoffwechsel des Knochenmarkfettgewebes im Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz
3.10	Beeinflussung der Laktathomöostase des Knochenmarksfettgewebes durch HAS2 im Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz74

3.11	Einfluss von HAS2 auf das Stammzell-/Immunzellreservoir im Knochenmark
	nach Induktion von Adipositas und Glukoseintoleranz75
3.11	1.1 Analyse von Immunzellen in den Knochenfettsubtypen prä-diabetischer Has2-Knockout-Mäuse
3.12	BMAT-Sekretionsprofil in Has2-defizienten Mäusen im Modell der Diät-
	induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz81
3.13	Auswirkung der HAS2 auf die zirkulierenden Immunzellen im Modell der Diät-
	induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz
3.14	Auswirkung der HAS2 auf die periphere Immunantwort der Milz im Modell der
	Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz
3.15	Auswirkungen eines Has2-Mangels auf Knochenparameter bei Diät-
	induzierter Adipositas und Glukoseintoleranz
3.16	Einfluss der Diät-induzierten Adipositas auf das Körpergewicht sowie die
	Giukosetoleranz bei Has1-Detizienz in vivo
3.17	Einfluss von HAS1 auf die Adipogenese im Knochenmark in vitro
3.18	Einfluss von HAS1 auf den Energiestoffwechsel des
	Glukoseintoleranz
3.19	Einfluss von HAS1 auf das Stammzell-/Immunzellreservoir im Knochenmark
	nach Induktion von Adipositas und Glukoseintoleranz95
3.19	9.1 Analyse von Immunzellen in den Fettsubtypen prä-diabetischer Has1-
	Knockout-Mäuse97
3.20	Auswirkung der HAS1 auf die zirkulierenden Immunzellen im Modell der Diät-
	induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz
4.Disl	kussion100
4.1	Dysregulation des Knochenmarkstromas in prä-diabetischen C57BL/6J- Mäusen
4.2	Charakterisierung der HA im Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen104
4.3	Metabolischer Phänotyp von Has-defizienten Mäusen
4.4	Auswirkungen der HA auf den Energiestoffwechsel im Knochenmark107
4.5	Einfluss von HA auf die Immunantwort im Knochenmark und in der Peripherie

4.6	HA als wichtiger Faktor der Osteogenese	113
4.7	Ausblick und Limitierung	116
5.Zu	sammenfassung	118
6.Su	mmary	
7.Ap	pendix	
8.Ab	bildungsverzeichnis	
9.Ta	bellenverzeichnis	
10.	Referenzen	
11.	Konferenzbeiträge	139
12.	Lebenslauf	
13.	Danksagung	141
14.	Eidesstattliche Erklärung	

Abkürzungsverzeichnis

¹⁸ F-FDG	Fluorodeoxyalukose F 18
4-MU	4-Methylumbelliferon
Abs.	Abschnitt
AF	Alexa Fluor
ANOVA	analysis of variance
APC	antigen presenting cell
ATGI	
ATP	Adenosintriphosphat
	Braunes Fettgewebe brown adipose
BAT	tissue
	Knochenmarkadipozyt, bone marrow
BMAd	adipocvte
	Knochenmarkfettgewebe. <i>bone marrow</i>
BMAI	adipose tissue
BMI	bodv-mass-index
BMP	bone morphogenic protein
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
	CCAAT/enhancer-binding protein-
C/ΕΒΡ α/β	alpha/beta
	Calciumchlorid
CaCl ₂	
CCL	Chemokin-Ligand
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
cm	Centimeter
- 5.4.6 -1	Konstitutiver Knochenmarkadipozyt,
CIMAD	constitutive marrow adipocyte
oMAT	Konstitutives Knochenmarkfettgewebe,
CIMAT	constitutive marrow adipose tissue
CMP	common myeloid progenitor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCL	Chemokin (C-X-C motif) Ligand
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DD	Diabetogene Diät
DDZ	Deutschen Diabetes Zentrum
Dio2	Typ-II-Iodthyronin-Deiodinase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DPP4	Dipeptidylpeptidase-4
DTA	Diphtherietoxin
ECAR	extracellular acidification rate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Estrogenrezeptor
EZM	Extrazelluläre Matrix
FABP4	Fettsäurebindungsprotein aP2
FACS	fluorescence activated cell sorting

FCCP	Carbonylcyanid-P-
ECS	Fotolos Kölborsorum
	Feldles Kalbelselulli Erojo Eottoöuron
	freie reusaulen
FU	
g	Gramm
ġ	gravity
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GlcA	Glucuronsäure
GlcNAc	N-acetyl-Glucosamin
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie- stimulierender Faktor
GMP	granulocyte/macrophage progenitor
Grem1	Gremlin 1
GTT	Glukosetoleranztest
GV	Gesamtvolumen
h	Stunde hour
H ₂ O	Wasser
HaOa	Wasserstoffperoxid
ΗΔ	Hvaluronsäure bvaluronic acid
	hyaluronic acid hinding protein
	Hydiulolisaulesyllillase
	Hank's balanced sail solution
HRP	norse radish peroxidase
HSZ	Hamatopoetische Stammzelle
HYAL	Hyaluronidase
I.p.	
	Interreron-gamma
	Insulinresistenz
	Insulinrezeptor-positiv
KC	keratinocyte cnemoattractant
KCI	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
Kit	Tyrosinkinase
KMD	Knochenmineraldichte
КО	knockout
kV	Kilovolt
KV	Knochenvolumen
L	Liter
LANUV	Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LDH	Laktatdehydrogenase
LepR	Leptinrezeptor
LT	long term
Ly6	Lymphozytenantigen 6
m	Meter
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein 1

MEP	megakaryocyte/erythrocyte progenitor
mg	Miligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
MIP	macrophage inflammatory protein
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	Milimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPP	multipotent progenitor
mRNA	messenger RNA
MSZ	Mesenchymale Stammzelle
mU	Miliunits
Myf5	myogenic factor 5 gene
NaCl	Natriumchloird
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaH ₂ PO ₄	Dinatriumhvdrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhvdrogencarbonat
ng	Nanogramm
NH₄CI	Ammoniumchlorid
NK	natural killer
nm	Nanometer
OCR	oxygen consumption rate
Osx	Osterix
OxPhos	Oxidativen Phosphorylierung
	platelet-derived growth factor receptor
Pdgfra	alpha
PE	Polvethylen
PEB	Phosphat, EDTA, BSA
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
	peroxisome proliferator-activated
PGC1a	receptor gamma coactivator 1-alpha
На	pondus hvdrogenii
Pmol	Pikomol
	peroxisome proliferator-activated
ΡΡΑRγ	receptor-gamma
Prx1	paired related homeobox 1
PS	Penicillin-Streptomycin
aPCR	quantitative polymerase chain reaction
RANKL	receptor activator of NF-ĸB ligand
	regulated on activation, normal T cell
RANTES	expressed and secreted
	Regulatorischer Knochenmarkadipozyt.
rMAds	
	regulative marrow adipocyte
	regulative marrow adipocyte Regulatorisches
rMAT	<i>regulative marrow adipocyte</i> Regulatorisches Knochenmarkfettgewebe, <i>regulative</i>
rMAT	regulative marrow adipocyte Regulatorisches Knochenmarkfettgewebe, regulative marrow adipose tissue
rMAT	regulative marrow adipocyte Regulatorisches Knochenmarkfettgewebe, regulative marrow adipose tissue Ribonukleinsäure
rMAT RNA RT	regulative marrow adipocyte Regulatorisches Knochenmarkfettgewebe, regulative marrow adipose tissue Ribonukleinsäure Raumtemperatur
rMAT RNA RT RUNX	regulative marrow adipocyte Regulatorisches Knochenmarkfettgewebe, regulative marrow adipose tissue Ribonukleinsäure Raumtemperatur runt-related transcription factor
rMAT RNA RT RUNX S.	regulative marrow adipocyte Regulatorisches Knochenmarkfettgewebe, regulative marrow adipose tissue Ribonukleinsäure Raumtemperatur runt-related transcription factor siehe
rMAT RNA RT RUNX s. SCF	regulative marrow adipocyte Regulatorisches Knochenmarkfettgewebe, regulative marrow adipose tissue Ribonukleinsäure Raumtemperatur runt-related transcription factor siehe Stammzellfaktor. stem cell factor

Sca-1	stem-cell antigen 1
SD	Standardabweichung, standard deviation
SSC	sidewards scatter
ST	short term
SVF	Stromal-vaskuläre Fraktion
T2DM	Typ 2 Diabetes Mellitus
Tab.	Tabelle
TAG	Triglycerid
ТВ	Trispuffer
Tb.N	Trabekelanzahl
Tb.Sep	Trabekelseparation
TF	Transkriptionsfaktor
TGF-β	transforming growth factor-β
TLR	toll-like receptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
U	Units
u.a.	unter anderem
UCP1	uncoupling protein 1
Vcam1	vascular cell adhesion protein 1
vgl.	vergleiche
VOI	volume of interest
WAT	Weißes Fettgewebe, <i>white adipose tissue</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZETT	Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben
μΑ	Mikroampere
μCT	Mikrocomputertomographie
μΙ	Mikroliter
O°	Grad-Celsius
%	Prozent

1. Einleitung

1.1 Adipositas und Typ 2 Diabetes Mellitus

Global ist ein kontinuierlicher Anstieg der Adipositasprävalenz zu verzeichnen. Nahezu 60 % der Erwachsenen und fast jedes dritte Kind (29 % der Jungen und 27 % der Mädchen) allein in der Europäischen Region der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind übergewichtig oder adipös [1]. Die Einstufung erfolgt anhand des *Body-Mass-Index* (BMI) – der sich aus dem Körpergewicht in Kilogramm (kg) dividiert durch das Quadrat der Körpergröße in Metern errechnet [2]. Laut WHO beginnt Übergewicht bei Erwachsenen ab einem BMI von 25 kg/m² und eine Adipositas bei Werten über 30 kg/m² [3]. Ein Index zwischen 25 und 29,9 kg/m² wird als prä-adipöser Zustand definiert. Insbesondere Adipositas ist durch eine übermäßige Fettansammlung im Körper gekennzeichnet. Vorherrschende Risikofaktoren sind vor allem ein langfristiger Kalorienüberschuss, oft in Kombination mit Bewegungsmangel.

Die Trias aus Adipositas mit Insulinresistenz, arterieller Hypertonie und Dyslipidämie ist charakteristisch für das sogenannte metabolische Syndrom, das nachweislich mit einer hohen kardiovaskulären Mortalität einhergeht [4, 5].

Adipositas gilt als wesentlicher Treiber zahlreicher Stoffwechselpathologien und führt oftmals zur Entwicklung eines Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM). T2DM ist mit über 90 % weltweit die häufigste Stoffwechselerkrankung [6-9]. Charakteristisch für die Progression des T2DM sind hohe Blutzuckerwerte, die sowohl auf eine verminderte Insulinempfindlichkeit der Gewebe als auch auf eine gestörte Insulinproduktion der pankreatischen Betazellen zurückzuführen ist. Die Entwicklung einer Hyperglykämie als Leitsymptom des gestörten Glukosestoffwechsels korreliert mit einem systemischen Entzündungszustand des Organismus sowie einer langfristigen Schädigung zahlreicher Organsysteme wie dem Herz-Kreislauf-System, den Augen und den Nieren [9, 10].

Das Peptidhormon Insulin gilt als zentraler Regulator des Blutzuckerspiegels, indem es die Glukoseaufnahme der Zellen verschiedener Organe wie Herz, Leber, Skelettmuskulatur oder Fettgewebe stimuliert. Unter normalen Bedingungen wird Insulin in den Blutkreislauf sezerniert, induziert durch Bindung an Insulinrezeptoren die Translokation von intrazellulären Glukosetransportern in die Zellmembran und damit die Aufnahme von Glukose in die Zellen. Ein T2DM liegt vor, wenn die Betazellen des Pankreas zwar Insulin sekretieren, dies aber nicht ausreicht, um die eingeschränkte Wechselwirkung zwischen den Insulinrezeptoren und dem Peptidhormon zu kompensieren [8]. Eine gestörte Insulinwirkung und - sekretion ist ursächlich für abnorm hohe Blutglukosespiegel, wobei die fehlerhafte Signalübertragung des Insulins auch als Insulinresistenz (IR) bezeichnet wird [6]. Eine Betazell-Dysfunktion in Verbindung mit einer IR manifestiert einen hyperglykämischen Zustand [9, 11].

Pathophysiologisch gesehen ähnelt der prä-diabetische Zustand dem initialen Mechanismus des T2DM mit gestörter Insulinsensitivität, erhöhten Lipidwerten und geringgradiger chronischer Inflammation [12, 13].

Mit Adipositas assoziierte Komorbiditäten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind häufig das Ergebnis metabolischer Dysfunktionen. Bei Patienten mit T2DM wiederum sind kardiovaskuläre Pathologien eine der häufigsten Begleiterkrankungen [14, 15]. T2DM erhöht nachweislich das Risiko für Herzinsuffizienz [16] und verschlechtert das *Outcome* nach kardiovaskulären Ereignissen, einschließlich akutem Myokardinfarkt [17].

Vorrangiges Ziel der aktuellen Forschung ist die Identifizierung früher Veränderungen und der zugrundeliegenden Mechanismen, die zur Entwicklung eines manifesten Diabetes führen, um Langzeitkomplikationen zu verhindern und das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und die damit verbundene Mortalität zu senken.

1.2 Fettgewebe

Das Fettgewebe - eines der größten Organe des Körpers - besteht zu 99 % aus Adipozyten [18, 19]. Angesichts seines Einflusses auf den Energiehaushalt und seiner komplexen endokrinen Funktionen ist das Fettgewebe fundamental für die Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase [20]. Zur Unterteilung der verschiedenen Fettgewebstypen werden diverse Merkmale berücksichtigt, u.a. der Entwicklungsursprung, charakteristische Protein-Biomarker, die anatomische Lokalisation, die zelluläre Zusammensetzung und nicht zuletzt die metabolische und physiologische Funktion [21]. Grundsätzlich unterscheiden die derzeitigen Klassifikationen zwischen weißem, braunem und beigem Fett.

Weißes Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT) bildet mit circa 85 % des Gesamtfettanteils das größte Depot des Menschen [22, 23]. Anatomisch betrachtet wird weißes Fett hinsichtlich seiner Lokalisation im Körper gegliedert. Subkutanes Fett liegt direkt unter der Haut, indessen viszerales Fett mesenterial um die Organe dominiert. Ersteres dient der Wärmeisolierung des Körpers, das viszerale Fett dem Schutz der inneren Organe [21, 24, 25].

Die zentrale Funktion von WAT besteht in der Regulation des Energiehaushaltes. Das Gewebe besteht hauptsächlich aus lipidreichen monovakuolären Adipozyten. Einerseits wird bei Nahrungsüberschuss Energie in Form von Triglyceriden (TAG) gespeichert, andererseits können die weißen Adipozyten bei Energiemangel – z.B. während des Fastens oder bei erhöhter körperlicher Aktivität – die gespeicherten Reserven enzymatisch abbauen und entsprechend freie Fettsäuren (FS) mobilisieren. Charakteristisch für WAT ist die Insulinsensitivität. Bekanntlich moduliert das Peptidhormon Insulin neben Glukoseaufnahme auch die TAG-Synthese [26]. Folglich reagieren die Zellen auf Insulin und stimulieren dadurch sowohl die insulinabhängige Glukoseaufnahme als auch Lipogenese [23]. Darüber hinaus wird WAT als größtes endokrines Organ des menschlichen Körpers angesehen. Diese bedeutsame autokrine, parakrine und endokrine Funktion beruht insbesondere auf der Sekretion von Fettgewebshormonen (Adipokinen) wie Leptin und Adiponektin sowie pro-entzündlichen Zytokinen [18, 27].

Im Gegensatz zum WAT ist das braune Fettgewebe (brown adipose tissue, BAT) durch eine hohe Mitochondrien-Anzahl sowie morphologisch multivakuoläre Adipozyten gekennzeichnet (vgl. Abbildung 1). Ein weiteres spezifisches Charakteristikum von BAT ist die Fähigkeit, Energie in Form von Wärme durch den Prozess der zitterfreien Thermogenese zu erzeugen [28]. Ausschlaggebend hierfür ist das Vorhandensein des BAT-spezifischen uncoupling protein 1 (UCP1) [29]. Obgleich der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht vollständig verstanden ist, scheint die Regulation der BATvermittelten Thermogenese über β -3-Rezeptoren eine essenzielle Rolle zu spielen [30]. Das Erscheinungsbild des BAT-Depots variiert in Abhängigkeit verschiedener Faktoren wie Geschlecht, Alter oder BMI. Bei Neugeborenen und auch bei Nagetieren findet man braune Adipozyten vor allem interskapulär – bei Erwachsenen hauptsächlich in den Gewebedepots des Halses sowie in der supraklavikulären, paravertebralen und suprarenalen Körperregion [31-33]. Die Autoren um Lowell et al. zeigten bereits 1993, dass die chirurgische Entfernung von BAT bei Mäusen mit Adipositas und Komorbiditäten wie IR gekoppelt zu sein scheint [34]. In Übereinstimmung damit wurde beobachtet, dass die Aktivierung des murinen BAT den Glukosestoffwechsel verbessert und den Energieverbrauch steigert [35].

Beige Fettzellen stellen eine Mischvariante der beiden zuvor beschriebenen Fettphänotypen dar. Obwohl die Adipozyten im weißen Fettdepot lokalisiert sind, exprimieren auch sie das BAT-spezifische UCP1. Konträr zum WAT weisen beigefarbene Adipozyten demnach thermogene Eigenschaften auf, d.h. sie können ähnlich wie braune Fettzellen zur Energieverbrennung angeregt werden, um Wärme zu erzeugen [36].

Neben WAT als Energiespeicherorgan gewinnt das energieverbauchende BAT als vielversprechende Zielstruktur in der Behandlung von Stoffwechselerkrankungen zunehmend an Bedeutung. Eine gezielte kälte- oder pharmakologische Aktivierung des BAT bei T2DM-Patienten verbesserte nachweislich die Insulinsensitivität und stellt somit einen potenziellen Therapieansatz im Rahmen der Stoffwechselforschung dar [37, 38].

1.3 Knochenmarkfettgewebe

Das zunehmende Forschungsinteresse an WAT sowie BAT der letzten Jahre korreliert steigenden Prävalenz der Fettleibigkeit [39]. mit der Die Arbeiten zum Knochenmarkfettgewebe (bone marrow adipose tissue, BMAT) reichen zwar bis in die Mitte des 19ten Jahrhunderts zurück, wurden jedoch jahrzehntelang vernachlässigt. Knochenmarkadipozyten (bone marrow adipocytes, BMAds), lange Zeit nur als Markraumfüller angesehen, charakterisieren ein einzigartiges Gewebe der Knochenhöhle [40]. Die heterogene stromal-vaskuläre Fraktion (SVF) des Knochenmarks besteht aus adipogenen Vorläuferzellen, Stammzellen, Immunzellen, Endothelzellen sowie reifen Adipozyten [41].

Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass es sich bei diesem Gewebe um ein metabolisch inertes Organ handelt, konnte unlängst gezeigt werden, dass BMAT ein distinktes und dynamisches Fettzelldepot darstellt (s. Abbildung 1). Festgestellt wurde, dass die Markadipozyten unter diversen physiologischen und klinischen Konditionen akkumulieren, daher konzentriert sich die stoffwechselorientierte Wissenschaft zunehmend auf die Rolle des Gewebes bei verschiedenen pathophysiologischen Zuständen, einschließlich Adipositas, T2DM, Anorexie und Knochenerkrankungen. Auf der Grundlage der bisher gewonnenen Erkenntnisse wird die Thematik in den folgenden Abschnitten näher beleuchtet.

1.3.1 Morphologie und Anatomie von Knochenmarkfettgewebe

Neben seiner Hauptfunktion als strukturelle Stütze, dient der Knochen als Calciumreservoir und als hämatopoetisches Kompartiment. Anatomisch umschließt die kompakte kortikale Hülle des Knochens sowohl die spongiöse Trabekelstruktur als auch das heterogene Knochenmark [42]. Innerhalb des Marks differenzieren die Vorläufer der Adipozyten, auch Prä-Adipozyten genannt, in zwei lokal divergente Populationen, die

sich in ihrer Morphologie sowie in ihren funktionellen Eigenschaften unterscheiden [43-45].

Regulatorisches Knochenmarkfettgewebe (regulative marrow adipose tissue, rMAT) bildet sich bereits während der embryonalen Entwicklung im axialen sowie proximalen Regulatorische Knochenmarkadipozyten appendikulären Skelett. (rMAds) charakterisieren kleine Zellcluster mit einer durchschnittlichen Zellgröße von 31 bis 33 µm, welche im hämatopoetisch aktiven Knochenmark prädominieren. Konträr dazu entsteht das konstitutive Knochenmarkfettgewebe (constitutive marrow adipose tissue, cMAT) erst nach der Geburt, überwiegend im distalen appendikulären Skelett. Neben einem größeren Zelldurchmesser (38 bis 39 µm) formen konstitutive Adipozyten (cMAds) zusammenhängende Zellverbände innerhalb des Knochenmarks, vermutlich resultierend in einer Stabilität gegenüber systemischen Veränderungen. Weitere regionsspezifische BMAT-Unterschiede bestehen in der Lipidzusammensetzung sowie in der Genexpression. Während rMAds sowohl mehr gesättigte Fettsäuren als auch eine geringere Expression adipogener Marker (z.B. peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding protein- α/β , (C/EBP α/β)) aufweisen, zeichnen sich cMAds durch einen höheren Ungesättigtheitsindex sowie eine erhöhte Expression adipogener Transkriptionsfaktoren (TF) aus. Darüber hinaus variiert auch die Vaskularisierung zwischen den Subtypen – bemerkenswerterweise bezeichnet durch eine höhere cMAT-Kapillardichte in der Maus [46, 47].

Histologisch ähneln reife cMAds den Adipozyten des peripheren WAT (s. Abbildung 1). Gleichermaßen ist das Gewebe durch monovakuoläre Zellen geprägt, welche nahezu ausschließlich aus Triglyceriden bestehen. Trotz ihrer beträchtlichen adaptiven Plastizität weisen die Zellen des Knochenmarks tendenziell dennoch ein geringeres Volumen auf [48]. In Relation zum weißen Fett verfügt das Knochenmarkfett zwar über ein dichteres mitochondriales Netzwerk, eine ausreichende Expression verschiedener Thermogeneseregulatoren wie z.B. *Ucp1*, und damit die Fähigkeit zur Entkopplung der Respiration wie im BAT blieb jedoch aus [49, 50]. Die Erforschung von BMAT als separates Fettdepot gewinnt zunehmend an Aufmerksamkeit, gleichwohl der bisherige Kenntnisstand über die verschiedenen stoffwechselrelevanten Funktionen noch rudimentär ist.



Abbildung 1: Schematische Darstellung der Adipozytensubtypen modifiziert nach Austin *et al.*, 2023 [50].

a, Brauner, **b**, beiger und **c**, weißer Adipozyt. **d**, Knochenmarkadipozyt unterteilt in cMAd (links) und rMAd (rechts). Dargestellt sind Zellkerne (braun), Vakuolen (gelb/beige) und längliche Mitochondrien (braun).

1.3.2 Ursprung von Knochenmarkfettgewebe

Das Knochenmark repräsentiert eine multidimensionale Struktur, die vorrangig dem Erhalt des homöostatischen Gleichgewichts des Knochens und der Hämatopoese dient [49]. Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits auf das Vorkommen und die Expansion von Adipozyten in der Markhöhle und deren Bedeutung für vielfältige Dysfunktionen hingewiesen. Ausgehend von einer hochkomplexen Regulation der Adipogenese im Knochenmark steht die Heterogenität der Fettzellpopulation und ihr Einfluss auf das zunehmend beeinträchtigte Stamm-/Progenitorzellreservoir im Fokus aktueller Forschungsbemühungen. Grundlegend wird das sich selbsterneuernde Knochenmark von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) sowie mesenchymalen Stammzellen (MSZ) gebildet, deren Differenzierung eng miteinander verknüpft ist. Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass sich Adipozyten aus Vorläuferzellen ihres spezifischen lokalen Depots differenzieren. Kohärent dazu demonstrieren die Erkenntnisse der letzten 30 Jahre, dass sich die BMAT-Progenitoren genetisch von denen des BAT sowie WAT unterscheiden. Im Gegensatz zu weißen Fettprogenitoren sind BMAd-Vorläufer beispielsweise Osterix (Oxz)- positiv [51, 52], obgleich Oxz nicht alleinig als wichtiger TF der Osteoblasten, sondern auch als Marker mesenchymaler Vorläufer gilt [19, 53]. Braune Prä-Adipozyten entwickeln sich aus myogenic factor 5 gene (Myf5)- positiven myogenen Vorläuferzellen [54], wobei das Vorhandensein von Myf5 in Markadipozyten nicht bestätigt werden konnte [52]. Widerlegt werden konnte auch ein früher vermuteter hämatopoetischer Ursprung der BMAds [51].

Im Jahr 2015 postulierten Berry *et al.* einen strahlenresistenten, nicht endothelialen und hämatopoetischen, sondern mesenchymalen Ursprung der BMAd-Vorläuferzellen [52]. MSZ, multipotente Vorläuferzellen, differenzieren im Allgemeinen in strukturell und

funktionell unterschiedliche Zelltypen, darunter Osteoblasten, Myozyten und Adipozyten. Zur Konkretisierung der Hypothese einer mesenchymalen Subpopulation mit stammzellähnlichen Eigenschaften hat insbesondere die Gruppe um Ambrosi *et al.,* 2017 beigetragen und die zelluläre Identität der Adipozyten-Linie spezifiziert [43]. Innerhalb der Nische scheint das Differenzierungsschicksal der multipotenten MSZ zunächst kompetitiv ausbalanciert zu sein, wobei eine Interaktion zahlreicher Signalwege und linienspezifischer Transkriptionsregulatoren die Festlegung der MSZ entweder zu osteochondrogenen oder zu adipogenen Vorläuferzellen definiert [55, 56] (s. Abbildung 2).

Der Wnt/β-Catenin-Signalweg als auch die Aktivierung spezifischer TFs sind maßgeblich an der Differenzierung zu Osteoblasten beteiligt [57]. Auf der Prä-Osteoblastenebene schafft runt-related transcription factor 2 (RUNX2) als primärer Transkriptionsregulator die Voraussetzungen für die Osterixaktivierung, gefolgt von Markern terminaler Osteoblasten wie receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) und Osteocalcin [19]. Eine Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signals wirkt nachweislich anti-adipogen [58]. In Korrelation dazu zeigte eine Studie von Guo et al., 2008, dass eine Inaktivierung der Signalkaskade die Adipogenese humaner MSZ stimuliert [59]. Bei Adipositas ist die Hochregulation pro-adipogener Marker (z.B. C/EBP, $PPAR\gamma$, Fettsäurebindungsprotein aP2 (FABP4)) mit der Herunterregulation von Runx2 assoziiert [43, 49, 60]. Auffallend ist, dass speziell die Aktivierung von PPARy in der MSZ-Vorläuferzelllinie eine adipozytäre Differenzierung auf Kosten der Osteoblastogenese initiiert [19]. TFs der C/EBP-Familie vermitteln eine nachgeschaltete Kaskadenreaktion im Verlauf der Adipogenese, resultierend in der Aktivierung von C/EBPa. Bemerkenswerterweise interagieren die verschiedenen C/EBP-Subtypen nicht nur mit PPARy, sondern regulieren sich über eine Rückkopplungsschleife gegenseitig [61, 62]. Experimentelle Studien mit C/EBP-defizienten Mäusen bestätigten die Relevanz der TF durch eine beeinträchtigte Adipogenese sowie Insulinempfindlichkeit [63]. Additiv besitzen auch knochenmorphogene Proteine, kurz BMP (bone morphogenic *proteins*), die Fähigkeit, die Adipogenese durch Induktion von PPARγ und C/EBPα zu stimulieren [64]. Insgesamt fungiert das vom PPARy-Gen (Pparg) kodierte Protein direkt und indirekt als zentraler Regulator der adipozytären Differenzierung. Sowohl die konditionale als auch die globale Deletion von Pparg in Adipozyten führt bei Mäusen zum Verlust von Fettgewebe [19, 65-67].

Der Entscheid der multipotenten MSZ zur Differenzierung in Adipozyten wird also primär durch die Expression adipogener Faktoren wie PPARγ und C/EBP geprägt. Nach

Initiierung der Signalübertragung führt die erhöhte Expression adipozytärer TF zur Hochregulation spezifischer Marker reifer Adipozyten, darunter FABP4, Leptin und Adiponektin [57, 68, 69]. Neben den bereits erwähnten Kaskaden wird sowohl die Adipogenese als auch die Osteogenese maßgeblich durch den Leptin/Leptinrezeptor (LepR)- Signalweg reguliert [70]. In einer Studie an Mäusen resultierte ein konditionaler LepR-*Knockout* in den Extremitätenknochen in der Favorisierung der osteogenen Differenzierung [70, 71].

Bis heute ist die Identität der BMAd-Vorläuferzellen nur vage definiert. BMAds entstehen im Verlauf der Markadipogenese unterhalb der Wachstumsfuge in der Meta- und Diaphyse. Ob die Vorläufer jedoch in der primären Spongiosa oder im gesamten Knochenmark lokalisiert sind, verbleibt zu untersuchen [43, 51].

Festgehalten werden kann, dass die multipotente Differenzierung der MSZ in der heterogenen Mikroumgebung des Knochenmarks einer komplexen Regulation, und den damit verbundenen Signalwegen und Faktoren unterliegt. Aufgrund der Variabilität des Zelltyps, des Differenzierungsstadiums oder der allgemeinen experimentellen Bedingungen ist das Verständnis eines zentralen Signaltransduktionsweges bislang nicht gänzlich homogen [23].





1.3.3 Metabolische Charakteristika und Funktionen von BMAT

1.3.3.1 Alters- und geschlechtsspezifische Physiologie von BMAT

Fettgewebe bildet einen integralen Bestandteil des Knochenmarks. Faktisch differenzieren sich Markadipozyten in zwei lokal divergente Populationen, welche sich in ihrer Morphologie und Charakteristik unterscheiden [43-45]. Vorhergehend in Kapitel 1.3.1 angesprochen wurde, dass rMAds sowohl beim Menschen als auch bei Nagetieren vorwiegend im zentralen Skelett zu finden sind, während cMAds hauptsächlich in den

Diaphysen der langen Röhrenknochen, insbesondere der Tibia, lokalisiert sind. Unter der Annahme, dass die Knochenmarkressourcen aufgrund der Erythrozytenproduktion erschöpft sind, bleibt das Vorhandensein von cMAds in der hämatopoetischen Markhöhle neugeborener Säugetiere vorerst aus [72]. Im Laufe des Lebens wird eine exponentielle Anhäufung von Adipozyten im hämatopoetischen Mark beschrieben. Perinatal beginnt eine Transformation des hämatopoetisch aktiven Markes in Fettmark [44]. Vorwiegend wird das Fett beim Menschen bis zum siebten Lebensjahr in den distalen Epiphysen der Röhrenknochen und ab dem Alter von 12-14 Jahren in der Mitte des Schaftes identifiziert [73]. Erstaunlicherweise machen BMAds insgesamt etwa 10 % des Körperfetts und bis zu 70 % des Knochenmarkvolumens eines gesunden 25-jährigen Menschen aus, zudem sich die Adipozyten auch in den Wirbeln, dem Brustbein, den Rippen sowie dem Becken finden [48, 49, 73, 74]. Indes Mäuse eine geringere Markadipositas aufweisen als Menschen, ähnelt sich die zeitliche Abfolge der Entwicklungsstadien [40]. Generell wird eine unkontrollierte Akkumulation von intramedullären Fettzellen mit zunehmendem Alter und unter pathologischen Bedingungen wie Adipositas und verschiedenen Stoffwechselstörungen beschrieben [41]. Diese Erkenntnisse wurden u.a. durch eine Studie von Ambrosi et al., 2017 verifiziert. Hier wurde eine signifikant erhöhte Genexpression des adipogenen Markers PPARγ in den langen Röhrenknochen von vergleichsalten Mäusen (25 Monate versus 2 Monate) nachgewiesen [60]. Anerkannt ist, dass Männer grundsätzlich ein höheres BMAT-Volumen erlangen als Frauen, wobei das Erreichen der Menopause bei Frauen mit einer Zunahme der Knochenfettmasse einhergeht [49, 74, 75]. In Anbetracht dessen wurde ein Östrogenmangel in der Postmenopause der Frau mit einer erhöhten Adipogenese im Knochenmark in Verbindung gebracht [76]. Analog zeigten Studien mit HFD (high fat diet)- gefütterten Mäusen identische Auswirkungen eines Östrogen-Defizits auf die Physiologie des Fettdepots [77]. Neben geschlechtsspezifischen Unterschieden hinsichtlich des BMAT-Volumens konnten in einer weiteren Humanstudie auch Differenzen in den molekularen Eigenschaften nachgewiesen werden. Bei Frauen wurde im Geschlechtervergleich eine geringere Lipidsättigung des Fettgewebes ermittelt [78]. Zusammenfassend ändert sich das zelluläre Kompartiment des Knochenmarks mit dem Alter, dem Geschlecht sowie der Stoffwechsellage [71]. Ungeachtet dieser Erkenntnisse bleiben Herausforderungen für das Verständnis von BMAT als kritischem Akteur u.a. im Alterungsprozess bestehen. Auch der Einfluss geschlechtsspezifischer Sexualhormone auf die Entwicklung und die Beschaffenheit des BMAT bedarf weiterer Forschung.

1.3.3.2 BMAT-Lipidmetabolismus

Grundlegend wurden lipolytische Eigenschaften des Markfetts verzeichnet. In vitro kultivierte BMAds reagieren nur geringfügig auf eine Katecholamin-stimulierten Lipolyse [79], während auch Studien in vivo auf eine verminderte katabole Reaktion des BMAT in Korrelation zum WAT hinweisen [80, 81]. Addierend zu einer verminderten BMAT-Lipidmobilisation im Vergleich zum WAT eruierten Scheller et al., 2015 regionsspezifische Variationen der lipolytischen Aktivität, wobei rMAds weniger resistent sind als cMAds [82]. Paradoxerweise akkumulieren BMAds auch im Rahmen eines systemischen Energiedefizits – beispielsweise der Kalorienrestriktion bei Mäusen [83] oder bei Patienten mit Anorexia Nervosa [44, 84]. Die Kenntnisse über die inter- und intrazellulären Mechanismen, die bei der Nutzung von BMAT als Energiereserve eine Rolle spielen, sind jedoch noch fragmentarisch. Es wird angenommen, dass eine unzureichende Energiebereitstellung mit einer erhöhten Lipolyse peripherer Gewebe (z.B. WAT) korreliert – gefolgt von einer erhöhten Sekretion freier FS, die direkt und/oder indirekt auf die BMAds wirken [79, 85]. Die Signifikanz der BMAd-Lipolyse für die Knochenhomöostase konnte unlängst durch wissenschaftliche Arbeiten belegt werden. Mit Hilfe eines BMAd-spezifischen Cre-Mausmodells wurde die Triglycerid-Lipase (ATGL, Pnpla2-Gen) - ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Lipolyse deletiert, gefolgt von einem defizitären Katabolismus sowie einer erhöhten Anzahl und Größe von Fettzellen im Knochenmark [85]. Zukünftige Untersuchungen sind dringend erforderlich, um den Beitrag des klinisch relevanten Fettdepots als lokale Energiequelle im somatischen Energiestoffwechsel zu verifizieren.

1.3.3.3 Insulinsensibilität und Glukoseaufnahme von BMAT

Die Relevanz der weißen Fettzellen, die als komplexes endokrines Organ vielfältige systemische Wirkungen ausüben [83, 86], wurde eingangs dargestellt (vgl. Abs. 1.2). Ein metabolisches Merkmal der Adipozyten ist die Reaktion auf Insulin mit einer stimulierten Glukoseaufnahme [23]. Adipozyten im Knochenmark tragen ebenfalls zur systemischen Glukosehomöostase bei. *In vivo*-Studien an Mäusen konnten erstmals zeigen, dass die relative Glukoseaufnahme im BMAT gleich oder sogar höher ist als im WAT und in der Skelettmuskulatur. Obgleich das periphere Skelett ein signifikant höheres Fettvolumen kennzeichnet, weisen die BMAds sowohl in der axialen als auch der appendikulären Region eine erhöhte basale Glukoseaufnahmekapazität auf. Interessanterweise zeigte sich, dass BMAds resistent gegenüber Insulin und Kälte-stimulierter Glukoseaufnahme sind [87]. Die Annahme, dass BMAT als insulinsensitives Organ komplett analog zum WAT agiert, konnte in der Vergangenheit stellenweise widerlegt werden. Nachgewiesen

werden konnte, dass weder das Level von Insulinsignalgenen noch an phosphoryliertem (p)-AKT in isolierten Knochenmarkzellen von HFD-behandelten Mäusen nach Insulinstimulation ansteigt [88].

1.3.3.4 Sekretorische Eigenschaften von BMAT

WAT fungiert sowohl als Energiespeicher als auch Wärmeisolator [86]. Nunmehr besteht ein umfassendes Verständnis über die bedeutende endokrine Funktion des hormonproduzierenden Organs im Rahmen des Ganzkörpermetabolismus. Es wird ein direkter Zusammenhang zwischen IR und chronischer Entzündungsreaktion des Gewebes im Rahmen eines adipösen Phänotyps suggeriert [89]. So begünstigt eine übermäßige WAT-Expansion aufgrund von Zellhypertrophie und -hyperplasie Anomalien des metabolischen Gleichgewichts. Des Weiteren wird eine Kausalität von Adipositas vermittelten Komorbiditäten mit einem chronisch-inflammatorischen Phänotyp und einer erhöhten Expression von Entzündungsgenen (z.B. Monozyten chemotaktisches Protein 1 (MCP-1), Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6)) angenommen [90].

Ergänzend beeinflussen verschiedenartige inflammatorische Fettgewebshormone, sog. Adipokine, zahlreiche Stoffwechselvorgänge [23]. Das pro-inflammatorische Peptidhormon Leptin, ein essenzieller Regulator des Hungergefühls, war bereits Bestandteil vorheriger Abschnitte (vgl. Abs. 1.3.2). Das anti-inflammatorische Adiponektin wird wie Leptin fast ausschließlich von Adipozyten gebildet; als Antagonist zu Leptin sinkt der Spiegel des Hormons hingegen bei Adipositas und/oder IR [91]. Neben der Insulinantwort fördert Adiponektin auch die Oxidation von freien FS, sodass eine erhöhte Serumkonzentration mit einer Gewichtsabnahme verknüpft ist. Die Messung des zirkulierenden Adiponektin-Spiegels fungiert daher als etablierter Biomarker u. a. für kardiometabolische Erkrankungen [91, 92].

Auch für das BMAT konnten seither etliche parakrine und endokrine Eigenschaften identifiziert werden [83, 86, 91]. In Konformität mit dem WAT ist sowohl eine erhöhte Leptin-Expression und -sekretion im BMAT mit Adipositas und IR assoziiert als auch eine Abnahme während einer Kalorienrestriktion [83, 93]. Es erscheint zunächst paradox, dass nicht nur unter adipösen Bedingungen, sondern auch unter Mangelbedingungen neben einer dynamischen Zunahme des Fettgewebes eine Hochregulation der Adiponektin-Sekretion beobachtet wird. Anlässlich mehrerer Studien in Maus und Kaninchen wird resümiert, dass BMAds die Fähigkeit besitzen die Adiponektin-Synthese zumindest während eines Energiedefizits zu beeinflussen [83, 86]. In diesem Kontext wurde beispielsweise gezeigt, dass eine BMAT-Ablation den Serumspiegel des

Peptidhormons reduziert [83, 93]. Auch in Menschen wurde eine enge Beziehung zwischen BMAT und Adiponektin verzeichnet, wobei eine Erhöhung bei jungen Mädchen [94] sowie prä-menopausalen Frauen [95] beschrieben wurde. In einer gemischtgeschlechtlichen Kohorte wurde keine Kausalität festgestellt.

Komplementär zu den zentralen und metabolisch relevanten Adipokinen sezernieren BMAds weitere Signalmoleküle, darunter zahlreiche Zytokine wie IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, *chemokine (C-X-C motif) ligand* (CXCL) 1, CXCL2 und CXCL12 [86]. Zunehmend untersuchen Studien den inflammatorischen Status des Fettdepots. Neben der ausbleibenden IR (vgl. Abs. 1.3.3.3) wiesen isolierte Knochenmarkzellen von HFD-behandelten Mäusen verminderte mRNA-Spiegel verschiedener Entzündungsgene wie TNF- α und IL-1 β auf [88]. Sowohl für ein pro-adipogenes und pro-apoptotisches [96] als auch für ein pro-inflammatorisches [97] BMAT-Zytokinprofil wurden bisher widersprüchliche Daten publiziert. Konsens besteht jedoch über eine altersabhängige Regression des Expressionsniveaus, die mit einer Abnahme des pro-inflammatorischen BMAT-Profils einhergeht.

Im Übrigen besitzen BMAds sowohl adipogene als auch osteogene Eigenschaften, da sie TFs beider Differenzierungslinien sezernieren können – beispielsweise das adipogene PPARγ oder das osteogene RANKL [98] (vgl. Abs. 1.3.2). Nebst der Manipulation des MSZ-Differenzierungspotentials durch sekretorische Adipozyten wird deren Einwirkung auf die Hämatopoese als Quelle des pro-hämatopoetischen Stammzellfaktors (*stem cell factor*, SCF) [99] kontrovers diskutiert (s. Abs. 1.3.5.1). Grundsätzlich geht aus der Literatur hervor, dass es sich bei BMAT um ein anpassungsfähiges Gewebe mit ausgeprägter Stoffwechsel- und Sekretionsaktivität handelt.

1.3.4 Veränderungen des BMAT bei Adipositas und Stoffwechselstörungen

Derzeit anerkannt ist, dass Adipositas und der pathophysiologische Verlauf des T2DM das Risiko für verschiedene Folgeerkrankungen wie Osteoporose und ein steigendes Frakturrisiko erhöhen [60, 74]. Verschiedene Studien an Menschen und Mäusen konnten die Hypothese einer charakteristischen Veränderung des Knochenmarks unter diabetischen Bedingungen festigen. So geht ein diabetischer Phänotyp in der Regel unmittelbar mit einer Abnahme des Anteils an hämatopoetischem Gewebe, einer vermehrten Fettablagerung und einer Ausdünnung der Knochenstruktur einher [44]. Diabetiker zeigten eine erhöhte Prävalenz von Frakturen und erhöhte Werte freier FS im

Knochenmark, die mit dem etablierten T2DM-Mausmodell korrelierten [44]. Der gemeinsame mesenchymale Ursprung von Osteoblasten und Adipozyten war bereits vorheriger Abschnitte (vgl. Abs. 1.3.2). Gegenstand Nahe liegt, dass ein hyperglykämischer Zustand die adipogene Differenzierung fördert und somit einen Knochenverlust begünstigt [100]. Inwieweit BMAds einen essenziellen Osteoblasten-Suppressor darstellen, bleibt zunächst dahingestellt. Um die Mechanismen der Dysbalance des diabetischen Knochens zu explorieren, wurden bisher mehrere Ansätze publiziert. Einen wesentlichen Hinweis lieferte zuletzt die Gruppe um Tencerova et al., die postulierte, dass eine zelluläre metabolische Programmierung im Rahmen der MSZ-Differenzierung entweder zu Adipozyten oder zu Osteoblasten entscheidend ist. Denkbar ist ein hypermetabolischer Zustand der adipogenen Vorläufer, der auf einer erhöhten Expression von Genen u.a. der Insulinsignalkaskade, des Lipidstoffwechsels und der Glukoseverwertung beruht [101]. Zudem ist beschrieben, dass reife BMAds Osteoblasten hemmen, indem sie zahlreiche Signalmoleküle wie Zytokine [86, 96], Lipide [102] und auch adipogene RNA [103] sezernieren (vgl. Abs. 1.3.3.4). Darüber hinaus setzen Prä-Adipozyten vermehrt den osteoklastenspezifischen Botenstoff RANKL frei und fördern eine Hochregulierung knochenabbauender Zellen [98, 104, 105]. Eine neuere Studie untermauert die bisherige Datenlage: Ein durch Diphtherietoxin (DTA) induzierter Verlust von BMAds führt zu einer Zunahme der lokalen Knochenmasse in der distalen Tibia und in den kaudalen Wirbeln [67].

Festgehalten werden kann, dass das Fettdepot aufgrund seiner Lokalisation an Orten aktiver Hämatopoese sowie Osteogenese sowohl lokale als auch systemische Stoffwechselvorgänge direkt und/oder indirekt durch exponentielle Expansion beeinflussen kann [39].

Zuzüglich zu den zellulären Aspekten haben Ambrosi und Schulz Adipositas als starken Induktor für die Entstehung und die adaptive Plastizität von BMAT nachgewiesen [60]. Die Fähigkeit des Knochens, Glukose aufzunehmen, ist inzwischen bekannt [50]. Das Wissen über die Glukoseaufnahmekapazität von BMAT und ihren möglichen Einfluss auf die Glukosehomöostase ist jedoch limitiert. Wie zuvor in Abschnitt 1.3.3.3 thematisiert, dokumentieren aktuelle Arbeiten z.B. von Suchacki *et al.* auf der Basis von PET/CT-Analysen eine geringe Aufnahme von Glukose bzw. Fluorodeoxyglukose F 18 (¹⁸F-FDG) im BMAT langer Röhrenknochen. Allerdings wurde eine erhöhte Aufnahmefähigkeit im axialen sowie appendikulären Skelett gemessen, welches gleichzeitig durch eine erhöhte basale Glukoseaufnahme im Vergleich zum WAT charakterisiert ist [87]. Darüber hinaus wurde ein Kausalzusammenhang zwischen systemischer IR und potenzierter Markadipositas anhand verschiedener Untersuchungen am Mausmodell verifiziert [106-108]. Inwieweit BMAT jedoch einen insulinresistenten Phänotyp annimmt, ist bislang umstritten. Eine Deletion des Insulinrezeptors im murinen Knochen ist mit einem reduzierten Fettmark der proximalen Tibia assoziiert [109]. Analog führt ein fettspezifischer Insulinrezeptor-Knockout zu signifikant reduzierten BMAds [110]. Erst kürzlich konnte mit Hilfe von PET/CT-Analysen bei Mäusen demonstriert werden, dass Adipozyten im Knochenmark resistent gegenüber der insulinstimulierten Glukoseaufnahme sind [87]. Inkongruent dazu widerlegten Forscher um Tencerova et al. 2018 die Hypothese der IR anhand von isolierten Knochenmarkvorläuferzellen aus HFD-gefütterten Mäusen [88]. Entsprechende Messungen sowohl des phosphorylierten (p)-AKT-Spiegels als auch der Insulinsignalgene ergaben nach Insulinstimulation normale Werte, wodurch das Fehlen der IR im BMAT impliziert wird. Angesichts der heterogenen Datenlage zur Insulinregulation im BMAT stehen die kontextspezifischen Mechanismen – sowohl während der basalen als auch der deregulierten Glukosehomöostase – im Mittelpunkt jüngster Forschungsarbeiten. In ähnlicher Weise müssen auch die regionsspezifischen Unterschiede im Rahmen der BMAT-Insulinsensitivität definiert werden.

Im Allgemeinen hat die IR eine Reihe von Immunreaktionen zur Folge. Obwohl der komplexe immunologische Prozess noch nicht vollständig verstanden ist, wird eine Fehlfunktion sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort vermutet [8]. Somit spielen nicht nur die Adipozyten selbst, sondern auch das zelluläre Immunsystem eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Adipositas und der damit verbundenen Krankheitsentstehung des T2DM. Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten und Monozyten-differenzierte Makrophagen sind maßgeblich an der immunvermittelten Entzündungsreaktion im Verlauf des niedriggradigen chronischen T2DM beteiligt [111]. So ist eine gesteigerte Hämatopoese, insbesondere eine Leukozytose, ein gängiges Symptom bei Patienten mit unkontrolliertem T2DM [112].

Ein Ungleichgewicht zwischen dem sich ansammelnden Fett und den hämatopoetisch aktiven Zellen des Knochenmarks könnte die Ursache für dieses sich abzeichnende klinische Problem sein. Zunehmend belegen Hinweise eine veränderte Komposition des Knochenmarkmilieus zugunsten der Markadipozyten, korrelierend mit einer Abnahme der hämatopoetischen Funktion [49, 113]. Dies äußert sich u.a. durch eine Verschiebung innerhalb der myeloischen Vorläuferzelllinie. Eine fehlerhafte Leukogenese konnte im Knochenmark adipöser Mäuse beobachtet werden [114]. Ferner wurde sowohl in experimentellen als auch in klinischen Studien unter hyperglykämischen Bedingungen eine Steigerung der Myelopoese zulasten der Lymphopoese nachgewiesen. U.a. Barett et. al. 2017 verifizierten, dass Diabetespatienten aufgrund einer Monozytose eine signifikant erhöhte Produktion und Aktivität zirkulierender Monozyten aufweisen [112]. In diesem Kontext gilt die Monozytose auch als anerkannter Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen [115]. Beispielsweise konnte eine Kohärenz zwischen einer erhöhten Monozytenrekrutierung und der Induktion einer Atherogenese in verschiedenen tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden [116]. Summarisch Leukozytose indiziert eine demnach den systemischen Krankheitsverlauf [115] – gekennzeichnet durch eine übermäßige Infiltration von Immunzellen in die Peripherie und anschließend weiter in das entzündete Gewebe [90, 115, 117-119].

Naheliegend ist, dass neben Immunzellen auch pro- und anti-inflammatorische Zyto- und Chemokine in der Blutbahn und im betroffenen Gewebe Hinweise auf das Entzündungsgeschehen geben [120, 121]. Bekanntermaßen gelten Monozyten und proinflammatorische Makrophagen als Hauptakteure chronischer Stoffwechselstörungen, da sie entscheidend zur Produktion und Sekretion weiterer Entzündungsmediatoren beitragen. MCP-1 wurde exemplarisch als Regulator der Makrophagenrekrutierung an Entzündungsherden nachgewiesen, sodass eine Erhöhung des Plasmaspiegels die Infiltration in das Fettgewebe adipöser Tiere erklärt [122]. Durch die vermehrte Freisetzung inflammatorischer Botenstoffe in die Blutbahn wird das metabolische Gleichgewicht gestört. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine erhöhte Exkretion von beispielsweise TNF- α aus Fettzellen mit der Entwicklung einer IR und einer verminderten Glukoseaufnahme korreliert [90].

Ersichtlich wird, dass die adipozytäre Transformation des Knochenmarks in direktem Zusammenhang mit einer physiologischen Veränderung des hämatopoetischen Knochenmarkmilieus steht. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass eine HFD bei Mäusen mit einer Suppression von IL-7, einem wichtigen Faktor für die Lymphogenese, einhergeht. Die Sekretion von Faktoren durch BMAds lässt auf eine Reduktion in der lymphoiden Zelllinie schließen [114]. Übereinstimmend damit konnte eine verminderte B-Lymphopoese durch die parakrine Sekretion von BMAds *in vitro* manifestiert werden [123, 124]. Außerdem wird in einer Publikation von Tencerova *et al.* ein erhöhter Adiponektinspiegel im BMAT als Folge von HFD mit einer verminderten B-Lymphozytenzahl in Verbindung gebracht [88].

Ob die funktionelle Interaktion zwischen BMAds und der Hämatopoese beim chronisch entzündlichen T2DM ausschließlich auf die beträchtliche endokrine Aktivität des Fettdepots zurückzuführen ist, bedarf weiterer Klärung. Bemerkenswert ist, dass dem BMAT eine elementare Funktion bei der immunvermittelten Entzündungsreaktion zugeschrieben wird, die im Folgenden ausführlich diskutiert wird.

1.3.5 Funktionen von BMAT in Physiologie und Pathologie

1.3.5.1 Beziehung zwischen BMAT und der Hämatopoese

Knochenmark – als primär hämatopoetisch aktives Organ – ist ein hierarchisch aufgebautes, sich selbst erneuerndes Gewebe, das hauptsächlich durch Stammzellen wie HSZ und MSZ aufrechterhalten wird [49, 125]. Das blutbildende Knochenmark ist u.a. für die Myelo-, Erythro, Thrombo- und Lymphopoese verantwortlich [126]. Nebst der Fähigkeit zur Linien-determinierten Differenzierung sind sowohl HSZ als auch MSZ wichtige Akteure in verschiedenen physiologischen Prozessen, einschließlich der Hämatopoese und Osteogenese [49].

Die Heterogenität der hämatopoetischen Nische wird nicht nur beim Menschen sondern auch bei der Maus beobachtet [127]. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Ort der Hämatopoese bei Wirbeltieren im Laufe der Entwicklung ändert, wobei die Erkenntnisse über die Mikroumgebung des adulten Knochenmarks dominieren [128]. Ein komplexes Netzwerk koordiniert die Zellproduktion und -freisetzung und trägt so entscheidend zur Funktion und Homöostase der hämatopoetischen Zellen bei [129, 130]. Nahe liegt, dass die Blutbildung im Knochenmark in engem Kontakt mit dem dort lokalisierten MSZ-Stroma steht, welches das Wachstum und die Differenzierung der HSZ strukturell und funktionell unterstützt [49, 131, 132]. Das Stroma besteht aus multiplen Zelltypen, darunter Endothelzellen, glatte Muskelzellen, retikuläre Zellen, stromale Fibroblasten, Osteoblasten und Adipozyten [41, 133].

Das Vorkommen von Fettzellen im Knochenmark wurde bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben. Dabei wurde deutlich, dass sich BMAds je nach physiologischen und pathologischen Bedingungen in unterschiedlicher Dichte in der heterogenen Zellnische situieren. Die Bedeutung der Fettzellen in der vielfältigen Mikroumgebung des Knochenmarks wird vor diesem Hintergrund diskutiert.

Generell wird vermutet, dass BMAds in der Lage sind, auf den Ganzkörpermetabolismus zu reagieren, wobei multiple Dysfunktionen, einschließlich der Hämatopoese oder der Osteogenese, mit einer signifikanten Zunahme des Fettdepots verbunden sind. Tatsächlich geht die Anhäufung von intramedullärem Fett mit einer Verarmung der hämatopoetischen Zellularität einher (vgl. Abs. 1.3.4). Eine Studie von Turner *et al.,* 2018, belegte, dass ein Markadipozyt der Maus aufgrund seines Volumens etwa 30 kernhaltige hämatopoetische Zellen verdrängt [49]. Neben der Mutmaßung, dass die betroffenen Zellen aufgrund des begrenzten Platzangebots in der Knochenmarkhöhle konkurrieren [134], liefern zahlreiche funktionelle Studien der letzten Jahre widersprüchliche Ergebnisse zum Beitrag der ausgeprägten BMAT-Plastizität auf die hämatopoetische Potenz.

Die Fettzellanzahl ist oft invers zum hämatopoetischen Bedarf. Diverse Studien weisen darauf hin, dass BMAds die Mikroumgebung des Knochenmarks überwiegend negativ regulieren. Dass Adipozyten im Knochenmark die Granulopoese durch direkten Zell-Zell-Kontakt unterdrücken, konnte *in vitro* gezeigt werden [135]. Auch Neiveiras *et al.*, 2009 verifizieren BMAds als negative Regulatoren der Hämatopoese. Die Studie lieferte Anhaltspunkte über eine funktionelle Interaktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Neben der reduzierten Häufigkeit hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen in BMAT-reichen Wirbeln des Mäuseschwanzes deuten weitere Daten in diesem Zusammenhang auf eine klinische Relevanz der Hemmung der Adipogenese hin. So wurde bei lipoatrophischen A-ZIP/F1 "fettfreien" Mäusen eine verbesserte Regeneration nach Knochenmarktransplantation nach Bestrahlung beobachtet [99].

Im Kontrast dazu berichten andere *in vitro* Studien, dass humane BMAds die Stammzelldifferenzierung durch die Sekretion pro-hämatopoetischer Faktoren (z.B. Tyrosinkinase (Kit), *vascular cell adhesion protein 1* (Vcam1)) positiv beeinflussen können [136, 137]. In Übereinstimmung damit fördern BMAds die hämatopoetische Regeneration von Mäusen nach Bestrahlung durch die Sekretion des HSZ-regulierenden SCF [138].

Weiterhin fungiert BMAT als lokale Energiequelle im Knochenmark, wodurch die Erhaltung der Knochen- und blutbildenden Zellularität postuliert wird. In einem bewährten BMAd-spezifischen Cre-Mausmodell konnte die Gruppe um MacDougald *et al.,* 2022 die Bedeutsamkeit der Lipolyse im Knochenmark demonstrieren (vgl. Abs. 1.3.3.2). Mäuse ohne adipöse ATGL (*Pnpla2*-Gen) zeigten eine dysfunktionale BMAd-Lipolyse mit Hypertrophie und Hyperplasie. Obwohl die Auswirkungen der Deletion unter basalen Bedingungen marginal waren, schmälerte ein BMAd-*Pnpla2*-Mangel die Myelopoese nach energetischem Stress, wie er im Kalorienrestriktionsmodell bei Mäusen auftrat. Kalorienrestriktion korrelierte hier nicht nur mit abnormer Hämatopoese, sondern auch mit verminderter trabekulärer Knochenmasse in BMAd-*Pnpla2*-^{/-} Mäusen.

Ein systemisches Energiedefizit durch BMAd trägt somit zu einer Fehlfunktion der zellulären Knochenmarknische bei [85].

BMAds als Modulatoren der Hämatopoese wurden kollektiv nachgewiesen, obwohl allgemeine Unterschiede in den Ergebnissen einerseits auf kontextspezifische und andererseits auf regionsspezifische Variablen zurückzuführen sind.

1.3.5.2 Einfluss von BMAT auf den Energiemetabolismus

Glukose wird sowohl unter normalen als auch unter pathologischen Bedingungen durch den Prozess der Glykolyse in Pyruvat umgewandelt. In Gegenwart von Sauerstoff kann Pyruvat weiter zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) metabolisiert und im Krebszyklus oxidiert werden. Der Prozess der oxidativen Phosphorylierung (OxPhos) dient der Energiegewinnung durch die Produktion hoher Mengen Adenosintriphosphat (ATP) [139]. Laktat ist das Endprodukt der anaeroben Glykolyse. Es wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH) aus Pyruvat synthetisiert. Nachdem Laktat lange Zeit als Nebenprodukt der Glykolyse vernachlässigt wurde, hebt eine aktuelle Veröffentlichung die Bedeutung von Laktat im entzündlichen Fettgewebe bei Fettleibigkeit hervor. Ein adipozytenspezifischer LDH-*Knockout* bei Mäusen hat einen protektiven Effekt auf die Glukosetoleranz, die IR und die Reduktion entzündlicher Mediatoren [140]. Die regulatorische BMAd-Aktivität als Reaktion auf verschiedenste Stimuli oder unter pathologischen Zuständen ist umfangreich dokumentiert. Im dynamischen Prozess der Energiegewinnung ist daher eine ähnliche Physiologie und Funktion der BMAds zu erwarten.

Bekanntermaßen besteht die Hauptfunktion des WAT in der Energiespeicherung, während die primäre Aufgabe des BAT eher dem Energieverbrauch zugeschrieben wird [86]. Über das metabolische Profil von Knochenfett gibt es bisher jedoch nur wenige Informationen. Zunehmend belegen Hinweise, dass das stoffwechselaktive BMAT Eigenschaften des energiespeichernden WAT als sowohl die auch des energieverbrauchenden BAT annehmen kann. Mutmaßlich reagiert BMAT als lokales Energiereservoir im Knochen auf unterschiedliche exogene Stimuli [55, 141]. Mit einer Abnahme des peripheren Fettgewebes korreliert eine verminderte Effizienz der Energieverwertung im Rahmen des Alterns oder metabolischer Erkrankungen [142]. Konträr dazu nimmt das Volumen des BMAT unter den genannten Konditionen zwar zu, aber die metabolische Aktivität scheint ebenfalls beeinträchtigt zu sein. Eine altersbedingte Umverteilung von Lipiden in Organe wie dem Knochenmark, verbunden mit einer Induktion von Lipotoxizität, wird zunächst vermutet [143]. Alterung induziert

eine pathologische Modulation der Fettqualität und eine Abnahme ungesättigter FS im BMAT [144]. Ein Vergleich der Stoffwechselwege zwischen WAT und BMAT ergab eine geringere Glykogenmenge im BMAT [145]. Hinzukommend wurde ein insulinresistenter Phänotyp der BMAds bereits diskutiert [87] (vgl. Abs. 1.3.3.3).

BAT-ähnliche Eigenschaften scheinen mit zunehmendem Alter und Diabetes vermindert zu sein. In diesem Zusammenhang war die Expression der BAT-spezifischen Genmarker Ucp1, Dio2, Pgc1a und β 3-Adrenozeptor im BMAT von 24 Monate alten C57BL/6J-Mäusen und diabetischen Yellow-Agouti-Mäusen reduziert [33]. Erst kürzlich konnte eine Studie von Craft et al., 2019 das Potenzial einer UCP1-vermittelten Thermogenese in BMAds ausschließen. Die Ergebnisse dieser Publikation legen nahe, dass UCP1-unabhängige Mechanismen wie Lipid- und Kreatinzyklen in den einzigartigen Adipozyten involviert sind, die sich sowohl von BAT als auch von WAT unterscheiden [145]. In der Tat kann jedoch konstatiert werden, dass die BMAds - wie Fettsubtypen – auf Veränderungen auch die anderen des systemischen Energiestoffwechsels reagieren.

Das zelluläre Stoffwechselprogramm von MSZ während metabolischer Anomalien und damit die Interaktion von Adipogenese und Osteogenese im Knochenmark sind von wachsendem wissenschaftlichem Interesse. Symptomatisch für Fettleibigkeit in Verbindung mit einer atypischen Glukosehomöostase ist eine verstärkte Reaktion auf Insulin, begleitet von einer unbalancierten adipo-osteogenen Differenzierung zugunsten der Adipogenese. Im Allgemeinen haben MSZ einen hohen Energiebedarf zur Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase, wobei sowohl der Glukose- als auch der FS- und Aminosäurestoffwechsel von Relevanz sind [146-148]. Tencerova et al. gingen 2019 erstmals der Frage nach, ob MSZ-Vorläuferzellen im Knochenmark einer spezifischen metabolischen Vorprogrammierung unterliegen. Dies ist kein unbekanntes Phänomen: So nutzen auch HSZ, bestimmt durch ihren bioenergetischen Zustand, differenzierungsabhängig die Glykolyse oder die OxPhos. Adipozytenvorläufer waren tatsächlich durch eine verstärkte Insulinsignalisierung und eine maximierte OxPhos-Kapazität sowie Lipidspeicherung gekennzeichnet. Gegensätzlich dazu zeigten osteogene Progenitoren eine verminderte Insulinsignalisierung, eine fehlende Lipidspeicherung und möglicherweise daraus resultierend eine bevorzugte Nutzung der Glykolyse [101]. Damit stimmten die Resultate mit der Literatur überein. Auch Guntur et al., beobachteten ein glykolytisches Profil während der osteogenen Differenzierung, wohingegen bei Prä-Adipozten der 3T3-L1-Linie eine erhöhte OxPhos zu verzeichnen war [149].

Adipositas induziert zahlreiche metabolische Abnormalitäten - darunter auch eine Hyperinsulinämie. Die verstärkte Insulinsignalisierung korreliert mit der Akkumulation adipogener Vorläuferzellen in MSZ-Kulturen adipöser Patienten [150]. Auch in vivo wurde eine erhöhte Menge an charakteristischen Leptinrezeptor-positiven (LepR⁺) und Insulinrezeptor-positiven (IR⁺) Zellen im cMAT detektiert. Ausgehend von einem hypermetabolischen Phänotyp aufgrund der mit Fettleibigkeit assoziierten Begleiterkrankungen resultiert ein Ungleichgewicht der Vorläuferzellen in Richtung Adipozyten sowohl in einer erhöhten Glukoseverwertung als auch in einer verstärkten mitochondrialen OxPhos. Reaktive Sauerstoffspezies und eine beschleunigte metabolische Seneszenz der MSZ im Knochenmark sind die Folge. Eine interessante Perspektive für die klinische Translation bietet die Modifikation des Insulinsignalwegs. Es konnte aufgezeigt werden, dass eine Insulin-Hemmung die Adipogenese und damit die OxPhos und das seneszente Knochenmark-Mikromilieu reduziert [150]. Generell wird die Verbesserung des MSZ-Energieprofils als Ziel bei der Behandlung von Adipositas und Diabetes angesehen. Ambrosi et al. haben kürzlich gezeigt, dass die Hemmung der Dipeptidylpeptidase-4 (DPP4), ein proteolytisches Enzym, den Glukosestoffwechsel und die Lipolyse stimulieren und die osteogene Differenzierung unterstützen kann [43, 151].

Andere Krankheitsbilder, darunter die akute myeloische Leukämie (AML), sind ebenfalls zunehmend mit der Redundanz von Adipozyten im Knochenmark konfrontiert. Berichtet wurde beispielsweise, dass AML das *Remodelling* sowie den Katabolismus von BMAds stimuliert und dadurch die metabolische Aktivierung der Fettsäureoxidation fördern und eine Entkopplung der OxPhos durch die Synthese von Acetyl-CoA aus FS bewirken kann [139].

Grundsätzlich bleibt der genaue Nutzungsmechanismus von Glukose, FS und Aminosäuren während der MSZ-Differenzierung zu klären. Weitere Studien sind vonnöten, um die Rolle der adipogenen Vorstufen und/oder der reifen BMAds als endokrines Organ und möglicherweise als Regulatoren der Energiehomöostase zu präzisieren. Die Möglichkeit, das Schicksal der MSZ zu bestimmen, könnte einen therapeutischen Ansatz für viele Knochenmark assoziierte Erkrankungen wie Adipositas, Osteoporose oder Leukämie darstellen [55].

1.4 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist eine hochkomplexe, nichtzelluläre Struktur, die hauptsächlich aus Kollagenen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen, Elastin, Fibronektin, Laminin und verschiedenen anderen Glykoproteinen besteht [152, 153]. komplexe Netzwerk aus Matrixelementen und Das verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren ist für Zellfunktionen wie Überleben, Wachstum, Migration, Differenzierung und die Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase unerlässlich [153]. Die EZM-Integrität ist entscheidend für die adäquate Funktion verschiedener Zellen bzw. Organe und eine Fehlfunktion der EZM-Zusammensetzung und -Struktur ist mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Besonders Adipositas bedingt eine dramatische Vergrößerung der Adipozyten einhergehend mit der Notwendigkeit eines kontinuierlichen Remodellings der EZM [154, 155]. Unter adipösen Bedingungen reagiert Fettgewebe dynamisch mit Hypertrophie und Hyperplasie [156]. In Abschnitt 1.2 wurde beschrieben, dass Adipozyten vakuoläre Tröpfchen enthalten, in denen Lipide gespeichert werden. Ein Platzen der Lipidtropfen unter starker mechanischer Belastung kann durch die Strukturgebung der EZM verhindert werden [157]. Ein hohes Aktivitätsniveau und eine schnelle mikroanatomische Anpassungsfähigkeit der Matrix ermöglichen dabei die mechanische Unterstützung der Fettzellen. Eine veränderte Nährstoffverfügbarkeit beeinflusst die Expression von Matrixproteinen und katabolen Enzymen in Adipozyten [23, 158]. Bei fehlender Anpassung der Matrix wird eine hypertrophe Grenze der Zellen erreicht, die mit charakteristischen Adaptationen der weißen Adipozyten korreliert. Diese können Hypoxie, systemische Entzündung oder Fibrose sein [155, 159]. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind unter pathologischen Bedingungen maßgeblich an der Umgestaltung der EZM beteiligt [160]. Als Folge der Degradation von EZM-Komponenten resultiert eine vermehrte Sekretion matrixgebundener Moleküle, insbesondere inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren. Ein fibrotischer Zustand, der durch eine übermäßige Ablagerung von Matrixbestandteilen im Gewebe hervorgerufen wird, initiiert selbst vielfältige pathologische Prozesse wie die Produktion und Sekretion inflammatorischer Botenstoffe und die Infiltration von Immunzellen [161, 162].

Neben ihrer mechanischen Stützfunktion stellt die EZM somit ein Reservoir für eine Vielzahl unterschiedlicher Signalmoleküle sowie einen Ausgangspunkt für multiple rezeptorvermittelte zelluläre Prozesse dar. Postuliert wird, dass die Matrix als wesentlicher Modulator der Fettgewebshomöostase, der Immunzellantwort sowie der

Zellphysiologie eine tragende Rolle bei der Regulation von Stoffwechselerkrankungen innehat [163].

1.5 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA), ein lineares Glykosaminoglykan, stellt einen wichtigen Bestandteil der EZM von Säugetieren sowie einiger Prokaryoten dar. Strukturell setzt sich die HA aus Disacchariden, bestehend aus β -D-Glucuronsäure (GlcA) und N-acetyl- β -D-Glucosamin-Bausteinen (GlcNAc), zusammen, welche über β -1,3 beziehungsweise β -1,4 glykosidische Bindungen verknüpft werden [164] (s. Abbildung 3). Jedes Dimer weist ein Molekulargewicht von circa 400 Dalton (Da) auf [165], wobei Moleküle mit einem Gewicht von bis zu 2x10⁶ Da gebildet werden können [166]. HA ist weder sulfatiert noch anderweitig modifiziert, im Gegensatz zu vielen anderen Glykosaminoglykanen wie Chondroitinsulfat oder Heparansulfat [167, 168].



Abbildung 3: Chemische Struktur der Hyaluronsäure modifiziert nach Jiang et al., 2011 [169].

HA besteht aus alternierenden Einheiten von N-acetyl- β -D-Glucosamin (GlcNAc) und β -D-Glucuronsäure (GlcA), die über β -1,3 und β -1,4 glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind.

1.5.1 Synthese, Vorkommen und Degradation der HA

Die HA-Synthese erfolgt gegensätzlich zur Biosynthese anderer Glykosaminoglykane nicht im Golgi-Apparat der Zellen, sondern direkt an der zellulären Plasmamembran und ist mit verschiedenen HA-bindenden Proteinen zur Bildung eines komplexen HA-Matrixnetzwerks assoziiert. Mithilfe drei verschiedener integraler HA-Synthase-Isoenzyme (HAS1, HAS2, HAS3) wird HA aus den zytosolischen Substraten UPD- α -Glucuronsäure und UDP- α -N-acetyl-D-Glucosamin synthetisiert, welche abwechselnd magnesiumanhängig an das reduzierte Ende des Polysaccharids angehangen werden. Diese extrudieren die entstehenden länglichen HA-Ketten anschließend transmembranär in den extrazellulären Raum [166-168]. Die strukturelle Identität der Isoenzyme beträgt ca. 55-70 %, wobei die *Has*-Expression je nach betrachtetem Zelltyp und Gewebe variiert [170]. Obwohl HA von zahlreichen Zelltypen sezerniert wird, werden mesenchymale Zellen als Hauptquelle von HA angesehen [169]. In den meisten Geweben wie Herz, Fettgewebe sowie in MSZ bildet HAS2 die Hauptisoform, wodurch ihr die größte HA-Produktionsfähigkeit zugeschrieben wird [171]. Eine zentrale Rolle der HAS2 konnte auch während der Embryogenese im Rahmen muriner Studien nachgewiesen werden. Beobachtet wurde, dass ein kongenitaler *Knockout* der murinen *Has2* aufgrund einer schweren kardialen Fehlbildung embryonal letal ist [172], wodurch eine essentielle Funktion der HAS2 bereits zu Beginn der embryonalen Entwicklung postuliert wird. Demgegenüber weisen *Has1*- sowie *Has3*-defiziente Mäuse weder einen veränderten Phänotyp während der Embryogenese noch eine eingeschränkte Lebensfähigkeit auf.

Ein wesentliches Charakteristikum der HA ist die Fähigkeit, große Mengen Wassers binden zu können. Die hydrophile HA-Struktur ist eine wesentliche Komponente fast aller Gewebe des menschlichen Körpers. Prominente Mengen der HA sind hauptsächlich in weichem Bindegewebe, einschließlich der Haut, dem Glaskörper des Auges oder der Nabelschnur lokalisiert [173].

Darüber hinaus konnte jedoch auch die Relevanz der HA als Signalmolekül in inflammatorischen Prozessen gezeigt werden [174], wobei multiple Signalmoleküle, Wachstumsfaktoren sowie Zytokine, wie *transforming growth factor-* β (TGF- β), IL-1 β , TNF- α die Synthese der HA beeinflussen [171]. Hinzukommend belegen zahlreiche Studien, dass HA als Ligand mit HA-Bindeproteinen (Hyaladherine) über Zelloberflächenrezeptoren selbst Entzündungsantworten zu modulieren vermag. Infolge der Ligand-Rezeptor-Interaktion werden vielzählige Prozesse reguliert, darunter die intrazelluläre Signalübertragung, Rezeptor-vermittelte Zelladhäsion, Migration/Proliferation oder Apoptose [164, 171, 172].

Im Allgemeinen erfolgt die Degradierung der HA enzymatisch durch Hyaluronidasen (HYAL). Die β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetyl-D-Glucosamin und D-Glucuronsäure der HA werden an der Zelloberfläche oder in den Lysosomen hydrolysiert, resultierend in der Freisetzung von HA-Fragmenten. Bis dato wurden sechs HYAL-Formen identifiziert, von denen HYAL1 und HYAL2 zu den am häufigsten vorkommenden Formen gehören [175]. Neben diesen Schlüsselenzymen spielt das *cell migration-inducing protein* (CEMIP), auch KIAA1199 genannt, eine entscheidende Rolle

bei der Depolarisation der HA [176, 177]. Weiterhin kann eine HA-Fragmentierung durch reaktive Sauerstoffspezies verursacht werden [178].

1.5.2 HA- Rezeptoren und -Bindeproteine

HA-bindende Proteine sind essenzielle Bestandteile der EZM. HA ist in der Lage, mit Rezeptoren auf der Oberfläche verschiedener Zellen zu interagieren, um primär die Übertragung von Signalen zu ermöglichen. Nachfolgend werden sowohl strukturelle als auch funktionelle Eigenschaften des wichtigen HA-Rezeptors CD44 erläutert.

1.5.2.1 CD44

CD44, ein polymorphes Typ-1-Transmembranglykoprotein, wird auf multiplen Zelltypen exprimiert. Die Diversität des Rezeptors wird hauptsächlich durch alternatives Spleißen sowie posttranslationale Modifikationen, wie der Glykosylierung, bestimmt [179]. Neben einer zytoplasmatischen und einer transmembranen Domäne besteht der Rezeptor aus einem N-terminalen Linkmolekül, welches in die EZM ragt und für die Bindung der HA verantwortlich ist [180]. CD44 bindet dabei an mindestens sechs HA-Zuckerreste, besitzt jedoch eine Affinität für größere HA-Moleküle [181]. CD44 selbst besitzt keine intrinsische Kinase-Aktivität, wodurch das Adhäsionsmolekül nur in Abhängigkeit anderer Rezeptoren Signalwege modulieren kann [182].

Resultierend aus seiner strukturellen Vielfalt und der HA-CD44-Wechselwirkung ist das Transmembranprotein durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt [180]. Studien an Menschen und Mäusen demonstrierten, dass CD44 eine wichtige Rolle bei der Fettgewebe-Inflammation sowie der IR spielt. Kodama et al., 2012 belegten in einem diabetogenen Mausmodell, dass eine Deletion des Zelloberflächenrezeptors sowohl eine Verbesserung der Entzündung als auch der IR innerhalb des Fettgewebes zur Folge hatte. Darüber hinaus war eine erhöhte CD44-Expression im pathologischen Fettgewebe adipöser humaner Probanden festzustellen, einhergehend mit einem erhöhten CD44-Serumspiegel, ebenfalls verbunden mit einer verminderten Insulinsensitivität [183]. Erst kürzlich konnte evaluiert werden, dass eine Injektion monoklonaler Anti-CD44-Antikörper die systemische Progression der Entzündung im viszeralen weißen Fettgewebe adipöser Mäuse minimierte [184]. erforderlich. Dennoch sind weitere Untersuchungen um einen konkreten Zusammenhang zwischen der HA-CD44-vermittelten Signalweiterleitung und dem Entstehen sowie dem Verlauf des T2DM aufzeigen zu können. Die bisherigen Resultate

deuten darauf hin, dass CD44 den systemischen Metabolismus beeinflussen kann, was diesen HA-Rezeptor zu einem potenziellen Target der Diabetes-Therapie macht.

Ein weiterer Aspekt ist die Rolle der HA-CD44-Interaktion in der hämatopoetischen Nische. So ist etwa bekannt, dass das Adhäsionsmolekül an der Reifung und dem *Homing* von Entzündungszellen beteiligt ist. Die HA-Bindungsfähigkeit von CD44 wurde für verschiedene Zelltypen nachgewiesen, darunter Monozyten [185] oder Makrophagen [186] und lymphoide Zellen, vor allem T-Zellen [187] und B-Zellen [188].

Interessanterweise eruierten *in vitro* Studien an Langzeitkulturen von murinem Knochenmark eine beeinträchtigte Proliferation hämatopoetischer Vorläufer nach Blockade des CD44-Rezeptors [189]. Weiterhin wurde beobachtet, dass insbesondere die Plasmamembran von MSZ von einer intensiven HA-Schicht umgeben ist, die ihrerseits in der Lage ist, CD44 zu binden [190, 191]. Inwieweit die Bindung von HA an CD44 die Plastizität der MSZ moduliert oder als kritischer Akteur in den frühen Stadien der Hämatopoese agiert, bleibt zu definieren.

1.5.3 HA im Fettgewebe und bei T2DM

Die Mechanismen, die den pathologischen Umbauprozessen der EZM bei Adipositas zugrunde liegen, sind weitgehend unbekannt, obwohl die chronische Entzündungsreaktion als treibende Kraft angesehen wird [192]. Zahlreiche Studien haben sich bislang auf das Fettgewebe als Inflammationsherd unter adipösen Bedingungen konzentriert [193].

Die Synthese der HA stellt einen Ausgangspunkt der Glykolyse dar, woraus sich ein direkter Einfluss auf den Glukosestoffwechsel ableiten lässt. Da Glukosederivate die Vorstufe von HA bilden, lässt eine erhöhte Verfügbarkeit von aktivierten Zuckervorläufern unter hyperglykämischen Bedingungen eine gesteigerte Synthese von HA erwarten [28, 164, 194].

Bisher gewonnene Daten *in vitro* und *in vivo* lassen auf HA als wesentlichen Modulator des fettleibigkeitsbedingten EZM-*Remodellings* im weißen und braunen Fettgewebe schließen [28, 169]. Zellen des WAT sind potenziell in der Lage, HA zu synthetisieren. Ein bewährtes *in vitro* Modell verifizierte Veränderungen der HA-Spiegel während der Differenzierung von 3T3-L1 Prä-Adipoztyen [195]. Ein Anstieg der HA-Konzentration wurde in der Zelllinie hauptsächlich während der klonalen Expansionsphase registriert. In diesem Zuge wurde auch die Expression der *Has2* mRNA induziert [195, 196], weshalb primär von einer HAS2-vermittelten HA-Synthese nach Induktion der
Adipogenese ausgegangen wird. Die Supplementierung von HA im Kulturmedium verlängerte außerdem die Lebensdauer und erhöhte das Differenzierungspotential der stromalen Zellen im murinen Fettgewebe [197]. Ji und Kollegen validierten durch Behandlung mit exogener Hyaluronidase bzw. der Reduzierung der HAS2-Aktivität eine Hemmung der Adipogenese in 3T3-L1-Zellen [198].

Ein wesentliches Charakteristikum weißer Adipozyten ist die zelluläre Hyperplasie und Hypertrophie bei Energieüberschuss [199]. Interessanterweise bestätigten Han *et al.,* 2007 frühere Kenntnisse in hypertrophen Fettzellen. Ein signifikanter Anstieg der HA-Expression ist an eine erhöhte HA-Synthese im WAT gekoppelt [200]. Diskutiert wird auch, dass hypertrophe Adipozyten mit einem Entzündungszustand sowie einer gesteigerten HA-Sekretion korrelieren. In diesem Kontext wurde sowohl die Autophagozytose als auch die Synthese einer monoadhäsiven HA-Matrix von 3T3-L1-Zellen beobachtet [200].

Auch *in vivo* wurde eine abnorme HA-Konzentration im murinen T2DM-Modell charakterisiert. In der Tat kommt es unter diabetischen Konditionen zu einer exzessiven Ablagerung von HA im WAT und in der Skelettmuskulatur. Im Zuge dessen wird suggeriert, dass dies zur IR während der Progression von T2DM beiträgt [89, 201]. Eine unspezifische Inhibition der HAS-Aktivität durch 4-Methylumbelliferon (4-MU) reduzierte nicht nur die Hypertrophie der weißen Fettzellen, sondern auch den Entzündungsstatus. Grandoch *et al.*, zeigten so eine Abnahme des Volumens, der Rekrutierung von Immunzellen und des Gehalts an pro-inflammatorischen Zytokinen wie CCL2 und IL-1β in den weißen Adipozyten. Die pharmakologische Hemmung von HA hatte auch einen positiven Effekt auf die Glukosehomöostase durch eine erhöhte zelluläre Glykolyse [28]. Auch Kang *et al.*, beschrieben die übersteigerte HA-Exposition als Merkmal insulinresistenter Skelettmuskeln. Eine dosisabhängige Suppression von muskulärer HA diabetischer Mäuse reduzierte die Adipozytengröße und die IR in Leber und Skelettmuskulatur [89].

Über die Funktion sowie Komposition der HA-reichen EZM in braunen Fettzellen ist bislang weniger bekannt. BAT wird insbesondere durch seine thermogenen und sekretorischen Eigenschaften determiniert, wodurch ein zentraler Beitrag zur metabolischen Homöostase vermutet wird. Im Jahr 2019 zeigte eine funktionelle Studie von Grandoch und Kollegen, dass eine 4-MU-induzierte HA-Hemmung sowohl die IR als auch den Glukosestoffwechsel im BAT verbessert. Hinzukommend bestätigten selbige ein moduliertes BAT-Energieprofil durch eine Verschiebung des Glukoseflusses zur Glykolyse infolge der Inhibierung von HA [28]. Funktionell verbessert die Unterdrückung der HAS-Aktivität durch 4-MU die systemische Glukosetoleranz und die IR in verschiedenen Geweben wie der Skelettmuskulatur oder dem WAT und BAT, wodurch eine Schlüsselrolle der HA in frühen Stadien des T2DM postuliert wird.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Adipositas ist mit einer erhöhten Inzidenz von Folgeerkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder einem T2DM sowie einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert. Insbesondere die Inzidenz und Prävalenz des T2DM hat in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen, so dass ein großes Interesse an der Erforschung geeigneter Zielstrukturen für die Prävention und Therapie der Adipositas bedingten Glukoseintoleranz und IR besteht.

Während die Bedeutung des weißen und braunen Fettgewebes umfassend untersucht zu sein scheint, ist die Bedeutung eines bisher wenig beachteten Fettdepots, des BMAT, in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus des Forschungsinteresses gerückt. Es wurde festgestellt, dass BMAT unter verschiedenen physiologischen und klinischen Bedingungen akkumuliert, einschließlich Alterung, Adipositas, T2DM und Osteoporose. BMAT scheint durch seine spezifischen endokrinen und parakrinen Eigenschaften zum systemischen Stoffwechsel und – aufgrund der engen anatomischen Wechselbeziehung in der Knochenmarknische – auch zur Hämatopoese und Osteogenese beizutragen [39].

Als zentraler Bestandteil der EZM vieler Gewebe wurde für die HA-reiche Matrix eine wichtige funktionelle Rolle im weißen und braunen Fettgewebe festgestellt. Auch für das stromale Mikromileu des Knochenmarks kann HA bzw. seine modifizierte Synthese in direktem Zusammenhang mit der Glukosehomöostase einerseits und der Hämatopoese andererseits stehen.

Ob eine HA-Matrix auch im BMAT zu finden ist und, ob diese im Rahmen eines sich entwickelnden Prä-Diabetes ebenfalls Remodellierungsprozessen unterliegt, ist bislang völlig unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Charakterisierung einer spezifischen BMAT-HA-Matrix sowie die damit verbundene pathophysiologische Relevanz im Hinblick auf Veränderungen des BMAT-Substratstoffwechsels und der hämatopoetischen Potenz in der frühen Phase des Prä-Diabetes. Um die Rolle des Fettdepots und mögliche Auswirkungen eines genetischen HA-Defizits zu evaluieren, wurde ein etabliertes Mausmodell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz bzw. IR in männlichen C57BL/6J und verschiedenen *Has*-defizienten Mäusen verwendet.

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Sämtliche Tierversuche wurden mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen, Bezirksregierung Düsseldorf, unter den Aktenzeichen 81-02.04.2018.A079 bzw. 81-02.04.2020.A130 durchgeführt.

2.2 Tierhaltung

Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums der Heinrich-Heinrich-Universität Düsseldorf. Alle Versuchstiere wurden unter Berücksichtigung eines zirkadianen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten, wobei den Tieren entkeimtes Wasser und Futter der Firma Ssniff (sniff Spezialdiät GmbH, DE-59494 Soest) *ad libitum* zur Verfügung stand. Für die folgenden Versuche wurden ausschließlich männliche Tiere im Alter von 13 bis 17 Wochen verwendet.

2.2.1 Verwendete Tiere

Männliche C57BL/6J-Mäuse wurden von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. Verwendet wurden die Tiere, um die Rolle von BMAT in der heterogenen Marknische bei Diät-induzierter Adipositas und IR zu charakterisieren.

Zur Validierung des HA-Systems im BMAT und der möglichen Auswirkungen eines genetischen HA-Defizits wurde das etablierte Mausmodell für Diät-induzierte Adipositas und Glukoseintoleranz bzw. IR [202, 203] auch in verschiedenen *Has*-defizienten Mäusen verwendet. Die Mauslinien werden im Folgenden detailliert beschrieben. Alle eingesetzten Tiere haben einen C57BL/6J Hintergrund.

2.2.1.1 Ubiquitäre Has1-Knockout Maus (C57BL/6J.Cg-Has1tm)

Für die *in vivo* sowie *in vitro* Versuche wurden ausschließlich männliche, ubiquitär konstitutiv *Has1*-defiziente Mäuse sowie entsprechende Wildtyp (WT)-Kontrollen verwendet. Zur Liniengenerierung wurde eine DNA-Sequenz im Exon 5, die für den Has1-Lokus kodiert, durch ein Neomycin-resistentes Gen ersetzt [204].

2.2.1.2 Ubiquitäre Has2-Knockout Maus (Rosa26CreER^{T2}/Has2^{flox/flox})

Für die *in vivo* sowie *in vitro* Experimente wurden ausschließlich männliche, ubiquitär konditionale *Has2*-defiziente Mäuse (Rosa26CreER^{T2}/Has2^{flox/flox}) [205], freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Y. Yamaguchi, sowie entsprechende WT-Kontrollen (Rosa26CreER^{T2}) [206] (Taconic; Hudson, NY, USA) verwendet.

Da eine kongenitale Deletion von murinem *Has2* embryonal letal verläuft, wurde der *Knockout* erst im adulten Alter induziert. Die Generierung der Mauslinie basiert auf einem Cre/LoxP-Rekombinase-System. Die tägliche intraperitoneale (i.p.) Applikation von 1 mg Tamoxifen/Maus/Tag (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) an 5 aufeinanderfolgenden Tagen führt zur Kerntranslokation der Cre-Rekombinase, gebunden an einen mutierten Estrogenrezeptor (ER^{T2}). Als Folge der Translokation in den Zellkern in Verbindung mit einer Aktivierung des ER^{T2} wird die loxP-flankierte DNA-Sequenz von Exons 2 des murinen *Has2*-Gens deletiert und degradiert. Die genetische Deletion der *Has2*-kodierenden DNA-Sequenz erfolgt im Exon 2, welches das Startcodon sowie zwei Transmembrandomänen in der N-terminalen Region umfasst.

Eingesetzt wurden Tiere, die hemizygot für die Expression der Cre-Rekombinase und homozygot für das gefloxte *Has2*-Segement waren (ROSA26CreER^{T2+/wt}/Has2^{flox/flox}). Als Kontrollen dienten Mäuse, die lediglich hemizygot für die Cre-Rekombinase waren (ROSA26CreER^{T2+/wt}). Nach einer 2-wöchigen Auswaschphase des Tamoxifens wurden die Tiere für die in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Fütterungsversuche verwendet.

2.2.2 Injektion von Tamoxifen zur Induktion des Has2-Knockouts

Zur Induktion des *Knockouts* der murinen *Has2* wurde Tamoxifen in einer Konzentration von 10 mg/ml in Erdnussöl (Sigma-Aldrich, P2144) gelöst. Eine tägliche Dosis von 1 mg Tamoxifen/Maus wird im Alter von 13 Wochen i.p. appliziert. Die Tamoxifen-Gabe erfolgt repetitiv an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, gefolgt von einer 2-wöchigen Auswaschphase, um einen möglichen Einfluss des Tamoxifens auf die Versuchsergebnisse auszuschließen.

2.2.3 Fütterung und experimentelles Schema

Das Mausmodell der Diät-induzierten Adipositas sowie Glukoseintoleranz bzw. IR wurde mit Hilfe einer diabetogenen Diät (DD) generiert. Dazu erhielten alle Tiere ab einem Alter von 13 Wochen für die Dauer von 9 Wochen eine hochkalorische Diät (DD, sniff Spezialdiät GmbH, 59494 Soest). Abweichend hiervon wurde die Fütterung der *Has2*-Mäuse erst zwei Wochen nach der letzten Tamoxifengabe begonnen (Alter der Mäuse 17 Wochen). Die Fütterung einer fettarmen Standarddiät (Chow, sniff Spezialdiät GmbH, DE-59494 Soest) diente der Überprüfung des etablierten Prä-Diabetes-Modells. Die Zusammensetzung der jeweiligen Diäten ist in Tabelle 1 aufgeschlüsselt.

Inhaltstoffe	Chow (%)	DD (%)
Rohprotein	18,2	20,5
Rohfett	4,1	36,0
Rohfaser	5,0	-
Rohasche	5,3	3,5
Stärke	43,5	-
Zucker	6,8	24,0

Tabelle 1: Futterzusammensetzung von Chow und DD.

Im Verlauf der Fütterung wurden Stoffwechseluntersuchungen zur Validierung des adipösen/diabetischen Phänotyps durchgeführt. Neben der wöchentlichen Dokumentation des Gewichtsverlaufs wurden intraperitoneale Glukosetoleranztests (i.p. GTT) durchgeführt. Ergänzend wurden durchflusszytometrische Messungen des Schwanzspitzenblutes zur Immunzellanalyse vorgenommen. Um einen potenziellen Einfluss der HA auf die Knochenmarknische zu verifizieren, wurden diverse Endzeitpunktanalysen durchgeführt, die im Folgenden dargestellt werden. Das experimentelle Schema der jeweiligen Linien ist in Abbildung 4 ersichtlich.



Abbildung 4: Experimentelles Schema.

Experimentelles Schema der a, C57BL/6J, b, Has1- und c, Has2-defizienten Mäuse.

2.2.4 Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Zur Analyse der Glukosehomöostase und damit eines diabetischen Phänotyps wurden i.p. GTTs durchgeführt. Unmittelbar nach einer 6-stündigen Nahrungskarenz wurde die basale Blutglukosekonzentration gemessen, um mögliche nahrungsinduzierte physiologische Prozesse zu eliminieren. Anschließend erfolgte eine i.p. Injektion von Glukoselösung (Dosis 1 mg/g Körpergewicht Glukose; Stocklösung 40 g Glukose-Monohydrat in 100 ml Wasser; sterilfiltriert). Der Verlauf nach Applikation wurde über die Folgezeit von 2 Stunden durch erneute Bestimmung der Blutglukosekonzentration nach 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten (min) ermittelt. Die Blutentnahme (1,5 µl Bluttropfen) erfolgte durch Punktieren der Schwanzvene. Die Kontrolle des Blutzuckerspiegels wurde per Einzelbestimmung mit dem Blutzuckermessgerät *Accu-Check Compact Plus* (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Der GTT wurde in den jeweiligen Mauslinien nach 3, 6 und 9 Wochen Fütterung wiederholt.

2.2.5 Organentnahme und Gewebepräparation

Nach einer 9-wöchigen Fütterungsperiode wurden die Tiere mittels Kohlendioxids unter Verwendung einer *GasDocUnit*® euthanasiert und die Hinterläufe anschließend mit Ethanol 70 % (v/v) desinfiziert. Die Tibiae wurden entnommen, indem zunächst die Haut vom Sprunggelenk bis zur Leiste sowie die Muskulatur beider Beine entfernt wurden. Sofern erforderlich wurde der Knochen samt Knochenmark in einen proximalen und einen distalen Bereich separiert und durch Zentrifugation bei 54335 × *g* RT für 2 min isoliert. In Abhängigkeit der finalen Analyse wurde das Gewebe entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80° C gelagert oder zur Weiterverarbeitung auf Eis gehalten. Eine anschauliche Darstellung der verschiedenen Subtypen des Knochenmarks findet sich in Abbildung 5. Eine detaillierte Beschreibung der Subtypen findet sich in Abschnitt 1.3.1. Ein entscheidender Unterschied zwischen den jeweiligen Geweben besteht darin, dass das hämatopoetisch aktive regulierte rMAT hauptsächlich aus Blutzellen besteht, während Adipozyten den Hauptbestandteil des konstitutiven cMAT bilden.



Abbildung 5:Schematische Darstellung der Knochenmarkseparation.

Unterteilung der BMAT-Subtypen mit rMAT im proximalen und cMAT im distalen Knochenkompartiment. Vergrößerung: 40fach, Maßstabsbalken: 100 µm.

2.2.6 Generierung von Blutplasma

Zur Gewinnung von Blutplasma wurde der rechte Herzventrikel punktiert und das gewonnene Blut mittels 50 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (100 mM) antikoaguliert. Im Anschluss wurden die Proben für 15 min bei 800 × g und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 15871 × g und 4°C pelletiert. Das gewonnene Plasma wurde aliquotiert und zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Tabelle 2: Verwendete kommerzielle Lösungen und Substanzen zur Generierung vonPlasma und Knochenmarkfett-Überstand.

Lösung/Substanz	Katalognummer	Hersteller	
Ethylendiamintetraessigsäure	6381 02 6	Carl Roth, Karlsruhe,	
(EDTA)	0301-92-0	Deutschland	
		Gibco®, Life	
Fetales Kälberserum (FCS)	11573397	Technologies™, Paisley,	
		USA	
		Gibco®, Life	
Penicillin-Streptomycin (PS)	15140122 Technologies™, P		
		USA	
Dulbagag's Madified Eagle		Gibco®, Life	
	10741574	Technologies™, Paisley,	
		USA	

Tabelle 3: Verwendete nicht kommerzielle Puffer zur Generierung von Knochenmarkfett-Überstand.

Puffer	Produkt / Zusammensetzung
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	10 % FCS 1 % PS

2.2.7 Plasma Insulin ELISA

Die Insulin-Konzentration wurde im Plasma der Mäuse (vgl. Abs. 2.2.6) unter Verwendung des Maus-Insulin-Sandwich-ELISAs (*Insulin Mouse ELISA Kit*, Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt. Die Analysen wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die Messung der Proben erfolgte durch Frau Irmhild Tibbe vom Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie.

2.2.8 Überstand des Knochenmarkfettgewebes

Zur Gewinnung des BMAT-Überstandes wurden beide Unterschenkelknochen *post mortem* nach 6-stündiger Nahrungskarenz isoliert, in die verschiedenen Knochenmarkzonen getrennt (vgl. Abbildung 5), gewogen und durch 2-minütige Zentrifugation bei 54335 × *g* RT isoliert. Darauffolgend wurde das Gewebe in 120 μ l DMEM-Medium aufgenommen und für 24 h bei 38°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 × *g* wurde der Überstand vollständig entnommen, aliquotiert und für weitere Analysen bei -80°C gelagert.

2.2.9 Multiplex Zytokin-Assay

In Kooperation mit Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr wurden Analysen sowohl von murinem Plasma (vgl. Abs. 2.2.6) als auch von BMAT-Überstand (vgl. Abs. 2.2.8) im Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Multiplex-Analyse erfolgte mit Hilfe des kommerziellen Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Kits (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) und diente zur Bestimmung der nachfolgend aufgelisteten Zytokine und Chemokine: Interleukin-1a (IL-1α), IL-1β, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17, Eotaxin, MIP-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β), MIP-1 α (macrophage inflammatory TNF-α (Tumor-Nekrose-Faktor- α), INFy *protein*-1α), (Interferon-y), G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor), GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor), CCL5 (C-Chemokin-Ligand 5)/RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), CXCL1 (Chemokin (C-X-C motif)-Ligand 1)/KC (keratinocyte chemoattractant).

2.2.10 Laktatdehydrogenase-Assay

Zur Isolierung des Fettgewebes wurden die Unterschenkelknochen entnommen (vgl. Abs. 2.2.5), das cMAT entsprechend vom Rest der Tibia separiert (vgl. Abbildung 5) und durch Zentrifugation bei 54335 × g RT für 2 min sedimentiert. Die Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) im cMAT wurde mit dem LDH-Aktivitäts-Assay Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gemäß Herstellerangaben gemessen.

Zur Quantifizierung diente ein Plattenlesegerät (*Synergy Mx Microplate Reader*, Biotek™ Instruments). Dieser erfasst kalorimetrisch die enzymatische LDH-induzierte Reduktion von NAD⁺ zu NADH bei einer Extinktion von 450 nm.

2.2.11 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Analysen *(fluorescence activated cell sorting,* FACS) wurden zur Charakterisierung von Stamm- und Immunzellen in Blut, Knochenmark und Milz durchgeführt. Die Gewebe wurden den Mäusen unmittelbar nach der Tötung entnommen und entsprechend aufbereitet. Einzelzellsuspensionen wurden hergestellt und mittels Antikörperfärbung hinsichtlich ihrer zellulären Komposition untersucht. Alle Proben wurden am LSR-Fortessa[™] Durchflusszytometer der Firma BD Biosciences (San Jose, CA, USA) vermessen. Unter Einsatz von Flow-Count Fluoropheres[™] (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) wurden absolute Zellzahlen ermittelt. Resultierende Zellzahlen sind als absolute Zellzahlen pro µl Blut bzw. pro Gewebe oder

prozentual dargestellt. Die Datenauswertung erfolgte anhand der FlowJo[™] Software (BD Franklin Lakes, NJ, USA). Alle verwendeten Antikörperkombinationen und die entsprechenden Klone sowie Puffer und Lösungen sind in den untenstehenden Tabelle 4 und Tabelle 5 dokumentiert. Repräsentative *Gating*-Schemata aller durchgeführten Analysen finden sich im Appendix.

Tabelle	4:	Verwendete	Antikörper	für	die	durchflusszytometrische	Analyse	von	Blut,
Knoche	nma	ark und Milz.							

Myeloiden/lymphoiden Immunzellen in Blut, Knochenmark, Milz			
Antikörper	Klon	Hersteller	
Ly6G-BrilliantViolet 650	148	BioLegend, San Diego,	
	140	CA, USA	
CD45-PE	20 E11	BioLegend, San Diego,	
	30-F11	CA, USA	
CD3-AlexaFluor 700	1740	BioLegend, San Diego,	
		CA, USA	
CD115-BrilliantViolet 711	AFS98	BioLegend, San Diego,	
		CA, USA	
CD11b-PE/Dazzle 594	M1/70	BioLegend, San Diego,	
		CA, USA	
Ly6C-APC/Cy7		BioLegend, San Diego,	
	11111.4	CA, USA	
CD19-PacificBlue	605	BioLegend, San Diego,	
	005	CA, USA	
CD16/22 (Ec Block)	03	BioLegend, San Diego,	
CD10/32 (FC BIOCK)	95	CA, USA	
		Life Technologies,	
Live/Deau Aqua	N/A	Eugene, OR, USA	
	Ter 110	Miltenyi Biotec, Bergisch	
		Gladbach, Deutschland	

Hämatopoetische Stammzellen in Knochenmark			
Lineage-AF700	17A2; RB6-8C5; RA3-6B2;	BioLegend, San Diego,	
	Ter-119; M1/70	CA, USA	
CD34 BE Dazzla		BioLegend, San Diego,	
	1 110134	CA, USA	
CD16/32 BV/421	03	BioLegend, San Diego,	
GD10/32-DV421	95	CA, USA	
		BioLegend, San Diego,	
CD40-PE	TIVI40-1	CA, USA	
	289	BioLegend, San Diego,	
	200	CA, USA	

Sca-1-BV650	D7	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD150-PE/Cy5	TC1512F12.2	BioLegend, San Diego, CA, USA

Fabelle 5: Verwendete Puffer u	nd Lösungen für die	Durchflusszytometrie.
--------------------------------	---------------------	-----------------------

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
	155 mM NH₄CI	
Hypotoner Lysepuffer	10 mM KHCO₃	Eigene Herstellung
	0,1 mM EDTA	
	2 mM EDTA,	
PEB-Puffer	0,5 % (w/v) BSA	Eigene Herstellung
	in DPBS	
Fixiorlösung	1 % Roti®-Histofix 10 %	Carl Roth GmbH & Co
Fixienosung	in DPBS	KG, Karlsruhe
	1,26 mM CaCl ₂	
	0,49 mM MgCl ₂	
	0,41 mM MgSO₄	
Hank's balanced salt	5,3 mM KCl	Gibco® Life
solution (HBSS)	0,44 mM KH ₂ PO ₄	Technologies [™] ,
	4,17 mM NaHCO₃	Paisley, England
	137,39 mM NaCl	
	0,34 mM NaH₂PO₄	
	5,55 mM Glukose	
Enzymatische	549 U/ml Kollagenase I	
Verdaulösund	60 U/ml DNase I	Eigene Herstellung
Verdaulosung	in HBSS	

2.2.11.1 Blut

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Blutproben unter Zuhilfenahme von EDTA-Microvetten® der Firma Sarstedt aus der Schwanzvene entnommen und Eis anschließend ausschließlich auf gehalten. Um eine unspezifische Antikörperadsorption an Fc-Rezeptor exprimierende Zellen zu vermeiden, wurden diese zunächst mit einem aufgereinigten rekombinanten Fc-Protein (CD16/32-Antikörper) für 10 min bei 4°C blockiert. Anschließend erfolgte die Antikörperfärbung mit spezieller Antikörpermischung (15 min, 4°C, lichtgeschützt) (vgl. Tabelle 4). Danach wurden die Proben zur Lyse der Erythrozyten für 7 min bei 4°C mit einem hypotonen Lysepuffer versetzt, um eine unspezifische Antikörperbindung an die erythroiden Zellen zu minimieren. Anschließend erfolgte die Sedimentierung der Zellen bei 800 × g 10 min bei 4°C. Das Zellpellet wurde in 50 µl PEB-Puffer suspendiert und mittels Fixierlösung für 20 min bei RT fixiert. Nach einem finalen PEB-Waschschritt wurden die Proben im BD LRS-Fortessa durchflusszytometrisch vermessen.

2.2.11.2 Knochenmarkfett

Zur Generierung der Knochenmark-Einzelzellsuspension wurden die Unterschenkelknochen entnommen (vgl. Abs. 2.2.5), entsprechend in rMAT und cMAT getrennt (vgl. Abbildung 5) und durch Zentrifugation bei 54335 × g RT für 2 min sedimentiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte probenspezifisch.

Das gewonnene rMAT einer Tibia wurde direkt in 1 ml DPBS resuspendiert. Das cMAT von zwei Tibiae wurde in einem zusätzlichen Schritt mit 1 ml Verdaulösung für 20-30 min bei 37°C enzymatisch verdaut. Die Zellsuspensionen aller Gewebe wurden schließlich mittels 70 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One, Frankfurt, Deutschland) filtriert, bei 4°C 300 x g 10 min zentrifugiert und in PEB aufgenommen. Um eine unspezifische Antikörperadsorption an Fc-Rezeptor exprimierende Zellen zu vermeiden, wurden diese zunächst mit einem aufgereinigten rekombinanten Fc-Protein (CD16/32-Antikörper) für 10 min bei 4°C blockiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von LIVE/DEAD[™] fixable aqua für 30 min bei 4°C zur Markierung toter Zellen. Nach einem Waschschritt wurden die Zellen mit spezifischen Antikörperkombinationen (vgl. Tabelle 4) für 15 min bei 4°C lichtgeschützt gefärbt und anschließend zur Erythrozyten-Lyse mit hypotonem Lysepuffer versetzt. Der Schritt erfolgte hier lediglich in rMAT-Proben. Nach 7-minütiger Einwirkzeit wurde zentrifugiert (800 x g, 4°C, 10 min). Parallel dazu wurden die cMAT-Proben mit einem Antikörper gegen Ter119 für 15 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert und ebenfalls zentrifugiert. Die korrespondierenden Zellen beider Fraktionen (cMAT und rMAT) wurden in PEB aufgenommen und mittels Fixierlösung für 20 min bei RT fixiert. Nach einem finalen Waschschritt wurden die Proben im BD LRS-Fortessa durchflusszytometrisch vermessen.

2.2.11.3 Milz

Weiterhin wurde die extramedulläre Hämatopoese in der Milz charakterisiert. Um Einzelzellsuspensionen zu erhalten, wurde die Milz nach der Entnahme aus der Maus zusammen mit 3 ml PEB in ein *gentleMACS* C-Röhrchen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gegeben und mithilfe eines gentleMACS Dissoziators (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) mechanisch zerkleinert. Die erhaltene Suspension wurde durch einen 70 μ m Nylonfilter (Greiner Bio-One, Frankfurt, Deutschland) filtriert, bei 4°C und 300 x *g* zentrifugiert und in PEB-Puffer aufgenommen. Um eine unspezifische Antikörperadsorption an Fc-Rezeptor exprimierende Zellen zu

vermeiden, wurden diese zunächst mit einem aufgereinigten rekombinanten Fc-Protein (CD16/32-Antikörper) für 10 min bei 4°C blockiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von *LIVE/DEADTM fixable aqua* für 30 min bei 4°C zur Markierung toter Zellen. Die Zellen wurden mit PEB gewaschen und hiernach mit einer spezifischen Antikörperkombination (vgl. Tabelle 4) für 15 min bei 4°C lichtgeschützt gefärbt. Nach 7-minütiger Erythrozyten-Lyse mit hypotonem Lysepuffer bei 4°C wurde erneut zentrifugiert (800 x *g*, 4°C, 10 min), das so erhaltene Zellpellet in PEB aufgenommen und mittels Fixierlösung für 20 min bei RT fixiert. Nach einem finalen Waschschritt wurden die Proben im BD LRS-Fortessa durchflusszytometrisch vermessen.

2.3 Molekularbiologische Analysen

2.3.1 Gesamt-RNA Extraktion aus dem Knochenmarkfettgewebe

Zur Bestimmung der mRNA-Expression von HA-abhängigen Genen wurde die Gesamt-RNA aus dem cMAT zweier Tibiae mit dem *RNeasy*® *Lipid Tissue Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

Quantität sowie Reinheit der aufbereiteten RNA wurden mithilfe des NanoDrop 1000 Spektrometers (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) durch Messung der Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bzw. durch Bestimmung des Quotienten aus 260 nm/280 nm erfasst. Anschließend wurde die RNA bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.3.2 cDNA-Synthese

Zur Transkription der isolierten RNA in cDNA wurde das *QuantiTect*® *Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll verwendet. Pro Probe wurde 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3.3 Quantitative Real-time-PCR

Eine quantitative *Real-time* PCR (qPCR) wurde unter Verwendung eines *StepOnePlus*[™] *Real-Time PCR Systems* (Life Technologies, Eugene, OR, USA) durchgeführt. Die angewandte SYBR Green-Methode basierte auf der Nutzung des Fluoreszenz-farbstoffes *Platinum*[™] *SYBR*[™] *Green qPCR SuperMix-UDG* (Life Technologies, Eugene, OR, USA). Der finale Reaktionsansatz lag mit einer Primer-Konzentration von 0,625 µM sowie einer eingesetzten cDNA-Konzentration von 2,083 ng/µl vor, wobei

Duplikate jeglicher Proben vermessen wurden. Die relative Genexpression wurde mittels $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ - Methode berechnet, wobei das 18S-Referenzgen als interne Kontrolle diente. Die Auswertung erfolgte anhand der *StepOnePlusTM* Software Version 2.3. Eine Liste der eingesetzten Primer-Sequenzen kann Tabelle 6 entnommen werden.

Gen	Vorwärts-Primer 5'- 3'	Rückwärts-Primer 5'- 3'
18S		
ribosomale	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA
RNA		
Has1		
(Hyaluronan	TATGCTACCAAGTATACCTCG	TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC
synthase 1)		
Has2		
(Hyaluronan	CGGTCGTCTCAAATTCATCTG	ACAATGCATCTTGTTCAGCTC
synthase 2)		
Has3		
(Hyaluronan	GATGTCCAAATCCTCAACAAG	CCCACTAATACATTGCACAC
synthase 3)		
CD44	GACCGGTTACCATAACTATTGTC	CATCGATGTCTTCTTGGTGTG

 Tabelle 6: Verwendete Primer-Sequenzen in der quantitativen Real-time PCR.

2.4 Metabolische Analyse von Knochenmarkfett mittels Seahorse XFe Analysator

Analysen am XF24 *Extracellular Flux Analyzer* (Agilent Technonogies, CA, USA) ermöglichen nicht-invasive Echtzeitmessungen der zwei wesentlichen zellulären Stoffwechselwege – der mitochondrialen Atmung und der Glykolyse. Basierend auf dem Prinzip der Sauerstoff- und pH-Sensorik des Analysators erfolgen Messungen der zellulären Sauerstoffverbrauchsrate *(oxygen consumption rate, OCR)* und der extrazellulären Azidifizierungsrate *(extracellular acidification rate,* ECAR) unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sensorplatten [207].

Zur Erstellung eines Stoffwechselprofils wurde das cMAT unmittelbar nach der Isolierung durch 2-minütige Zentrifugation bei 54335 × *g* in 100 μ l Hungermedium auf eine Seahorse 24-Well XF-Mikroplatte (Agilent Technologies, CA, USA) überführt. Hiernach wurde 400 μ l warmes Testmedium zugegeben (s. Tabelle 8). Vor Messbeginn wurde die Sensorplatte für 60 min in einem 37°C Brutschrank ohne CO₂-Zusatz inkubiert. Das standardisierte Testprotokoll des verwendeten mitochondrialen Stresstests (Agilent Technologies, CA, USA) umfasst eine 3-Zyklen-Messung der OCR/ECAR-Basislinie,

gefolgt von einer schrittweisen Injektion von Substanzen mit spezifischen Wirkungen auf verschiedene Komponenten der Elektronentransportkette: 1. dem Komplex V-Inhibitor Oligomycin (1,25 μ M), 2. dem Atmungskettenentkoppler Carbonylcyanid-P-Triflouromethoxyphenylhydrazon (FCCP) (3 μ M) und 3. einer Mischung aus dem Komplex I-Inhibitor Rotenon (10 μ M) und dem Komplex III-Inhibitor Antimycin (3 μ M). Die Quantifizierung des Energieprofils erfolgte anhand von OCR- und ECAR-Änderungen in Korrelation zu Fluoreszenzsignalen, die kontinuierlich mit Sensoren erfasst wurden. Mit Hilfe der zugehörigen Software wurden grundlegende Parameter der mitochondrialen Atmung berechnet: basale, maximale und nicht-mitochondriale Atmungskapazität.

Zur Normalisierung wurden alle Versuchsdaten mit einem Faktor $(((Gewebe (mg)/Knochen (mg))/Knochenlänge (cm)) \times 100)$ normiert. Die ECAR wurde zeitgleich zur OCR erfasst – die Daten werden jedoch in dieser Arbeit nicht gezeigt.

 Tabelle 7: Verwendete kommerzielle Puffer und Substanzen der metabolischen Analyse

 am Seahorse XFe Analysator.

Puffer/Substanz	Katalognummer	Hersteller
Hungermedium: Dulbecco's	103575 100	Agilent Technologies, CA,
Modified Eagle Medium (DMEM)	103373-100	USA
Oligomycin	103015-100	Sigma-Aldrich, USA
Carbonylcyanid-P-		
Triflouromethoxyphenylhydrazon	103015-100	Sigma-Aldrich, USA
(FCCP)		
Rotenon/Antimycin	103015-100	Sigma-Aldrich, USA
Natriumpyruvat	103578 100	Agilent Technologies, CA,
Nathumpyruvat	103378-100	USA
Clutamin	103570 100	Agilent Technologies, CA,
Gidtariin	103379-100	USA
Clukese	103577 100	Agilent Technologies, CA,
Giukose	103377-100	USA

Tabelle 8: Zusammensetzung	nicht-kommerzielle	Puffer d	ler metabolischen	Analyse	am
Seahorse XFe Analysator.					

Puffer	Zusammensetzung	
	1 mM Natriumpyruvat	
Tastmadium	2 mM Glutamin	
	10 mM Glukose	
	in DMEM pH 7, 4	

2.5 Histologische Analysen

Die Tibia des rechten Hinterlaufs diente zur histologischen Untersuchung und wurde entsprechend für die Paraffineinbettung aufgearbeitet. Die Knochen wurden hierzu zunächst für 1 h bei 4°C in PBS rehydriert und anschließend mittels 10%iger Fixierlösung für 48 h bei 4°C fixiert. Mehrmaliges Waschen mit PBS sowie destilliertem H₂O diente zur Entfernung der Lösung. Durch Einsatz von 25%igem EDTA-Entkalker wurden die Knochen für 14 Tage entkalzifiziert. Nach erneutem Waschen und Lagerung in Ethanol 50 % (v/v) für 24 h erfolgte die maschinelle Dehydrierung mit dem Autotechnikon (Sakura Tissue Tek VIP, Sakura Finetek, Torrance, USA). Schließlich wurden die Knochen in Paraffin eingebettet, um entweder Längs- oder Querschnitte anzufertigen. Die Lagerung erfolgte bis zur Weiterverarbeitung bei RT.

Mithilfe eines Rotationsmikrotoms (Rotationsmikrotom RM2255, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden 5 µm dicke konsekutive Schnitte angefertigt. Jeweils zwei Schnitte wurden auf SuperFrost®Plus Objektträger aufgenommen. Bei der Generierung von Längsschnitten wurden die Paraffinschnitte erst aufgezogen, nachdem das gesamte Knochenmark angeschnitten vorlag, um eine repräsentative Darstellung sowie Analyse des Knochenmarks zu realisieren. Die erhaltenen Schnitte wurden über Nacht bei RT getrocknet und am Folgetag für 60 min bei 60°C hitzefixiert.

Die Entparaffinierung und Rehydratation der Schnitte erfolgte vor Beginn der jeweiligen Färbung per absteigender Ethanolreihe. Hierzu wurden die Objektträger dreimal für 15 min mit Roticlear® (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und anschließend jeweils 2 min mit 100 %, 96 % sowie 70 % Ethanol versetzt. Darauffolgend wurden die Knochenschnitte dreimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte anhand spezifischer Antikörper oder Farbstoffe die Färbung, die nachstehend beschrieben wird.

Die verwendeten Puffer, Lösungen und Substanzen sowie die eingesetzten Antikörperverdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabelle 9 und Tabelle 10 aufgeführt. Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe eines Zeiss AxioObserver.Z1-Mikroskops aufgenommen und unter Verwendung der Software ZEN 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) verarbeitet. Die HA-Färbung dient in dieser Arbeit ausschließlich der Repräsentativität.

Puffer/Lösung/Substanz	Katalognummer	Hersteller
		Roti®-Histofix 10 %, Carl
Fixierlösung	P087.1	Roth GmbH & Co KG,
		Karlsruhe, Deutschland
		Carl Roth GmbH & Co
Entkalker <i>soft</i>	6484.4	KG, Karlsruhe,
		Deutschland
	02212	Sigma-Aldrich, St. Louis,
	90010	MO, USA
Bovines Serumalbumin	10711454001	Sigma-Aldrich, St. Louis,
(BSA)	10711434001	MO, USA
		Carl Roth GmbH & Co
H ₂ O ₂ -Blockierlösung	CP26.1	KG, Karlsruhe,
		Deutschland
Hämalaun	1 00240	Merck KGaA, Darmstadt,
Hamalaun	1.09249	Deutschland
3 3' Diaminahanzidin (DAR)	DA 530	Zytomed Systems GmbH,
	DA-330	Berlin, Deutschland
Eccin	22855	Sigma-Aldrich, St. Louis,
Eosin	52055	MO, USA
Fetales Kälberserum (FCS)		Gibco®, Life
	11573397	Technologies™, Paisley,
		USA
Avidin Biotin Blockierlösung	P37627	Thermo Fisher Scientific,
Avium-Bioum-Biockierlosung		Waltham, MA, USA

Tabelle 9: Verwendete kommerzielle Puffer, Lösungen und Substanzen für histologische Färbungen.

Tabelle 10: Zusammensetzung nicht-kommerzieller Puffer und Lösungen für histologische Färbungen.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
	137 mM NaCl
	2,7 mM KCI
1 % PBS	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	8,3 mM NaH ₂ PO ₄
	pH 7,4
	50 mM Tris-HCl
Trispuffer (TB)	рН 7,6
	in H ₂ O
Blockierlösung	20 mM Tris-HCI
	137 mM NaCl
	10 % FCS
	1 % BSA

1 % BSA-Lösung	1 g BSA in 100 ml PBS
3 % H ₂ O ₂ -Blockierlösung	10 ml 30 % H ₂ O ₂ in 90 ml PBS

Tabelle 11:	Verwendete	Antikörper i	in der	Immunhistochemie.

Antikörper	Firma	Katalognummer	Verdünnung
Biotinyliertes	EMD Milipore Corp., Merck		
HA-Bindeprotein,	KGaA,	385911	1:100
Rind	Darmstadt, Deutschland		
Streptavidin,			
HRP-konjugiert,	Sigma-Aldrich, St. Louis,	60428	1.200
Streptomyces	MO, USA,	32430	1.200
avidinii			
Streptavidin, Cy3-			
konjugiert,	Invitrogen, Carlsbad, CA,	SA1010	1.200
Streptomyces	USA	SATUTO	1.200
avidinii			

2.5.1 Hyaluronsäure Färbung

2.5.1.1 Immunhistochemische Färbung der HA

Für die Färbung von HA im Gewebe wurden zunächst endogene Biotinstrukturen anhand einer Avidin-Biotin-Blockierlösung gesättigt. Über Nacht folgte die spezifische Färbung mit einem biotinylierten HA-Bindeprotein *(hyaluronic acid binding protein,* HABP) bei 4°C. Der Kontrolle diente ein Gewebeschnitt nur mit 1 % BSA-Lösung in PBS.

2.5.1.1.1 HA-Detektion mittels DAB

Nach wiederholtem Waschvorgang wurden endogene Peroxidasen anhand einer 3%igen H₂O₂-Blockierlösung neutralisiert und die Präparate erneut dreimal mittels PBS gereinigt. Als Sekundärantikörper wurde HRP *(horse radish peroxidase)-* konjugiertes Streptavidin verwendet, welches nicht-kovalent an das biotinylierte HABP bindet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen und 10-minütiger Behandlung mit TB-Puffer folgte die Antikörper-Detektion mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Zusätzlich dazu wurde die Kernfärbung mit einer Hämalaun-Lösung durchgeführt. Die mit DAB gefärbten Schnitte wurden anschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 % Ethanol) jeweils 2 min

dehydriert und abschließend wasserfrei mit Roti[®]-Mount-Eindeckmedium (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

Ein exemplarischer Paraffinschnitt wurde einem Hyaluronidase-Verdau (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 1 h bei 37°C unterzogen und diente somit zur Negativkontrolle der spezifischen Bindung von HABP an HA.

2.5.1.1.2 HA-Detektion mittels Cy3-konjugiertem Strepatvidin

Die Inkubation der Gewebeschnitte mit biotinyliertem HABP erfolgte in Analogie zur HA-Färbung mit DAB über Nacht (vgl. Abs. 2.5.1.1.1). Cy3-konjugiertes Streptavidin wurde nach dreimaligem Waschen zur Detektion verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer. Im Kontrast zur vorherigen Färbung wurden die Objektträger im Anschluss an einen finalen Waschschritt und der Dehydrierung mit der aufsteigenden Ethanolreihe sowie Roticlear mit *ROTI®Mount FluorCare DAPI* (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt, wobei parallel die Zellkerne angefärbt wurden.

2.5.2 Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung

Zur Darstellung möglicher morphologischer Veränderungen der Gewebestruktur aufgrund einer *Has*-Defizienz wurden die Knochenpräparate mittels Hämatoxylins und Eosin (H&E) angefärbt. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte daher für 1 min mit Hämalaun-Lösung behandelt und über 5 min mit Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit einer 1 % (m/V) Eosin-Lösung für 1 min.

2.6 Mikro-Computertomographie-Scan (µCT)

Zur Validierung der Knochenparameter wurden den Mäuse *post mortem* sowohl Tibia als auch Femur entnommen, mit einer 10%igen Fixierlösung (Roti®-Histofix 10 %, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Die entsprechenden Knochen wurden anhand eines hochauflösenden μ CT-Systems (SkyScan1272 CMOS, Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) gescannt. Bilder mit einer Voxelgröße von 5,3 µm wurden mit einer Spannung von 60 kV, einem Quellstrom von 100 µA und einer Expositionszeit von 3000 ms aufgenommen. Die Tibia wurde unter Verwendung eines 79,5 µm hohen *volume of interest* (VOI) des trabekulären Knochens unmittelbar unter dem distalen Teil der Knorpelbrücke und eines 53 µm hohen VOI für die Bewertung der kortikalen Parameter untersucht. Analog wurde die Knochenstruktur des Femurs untersucht, indes ein VOI von 106 µm trabekulär und 79,5 µm kortikal verwendet wurde und die proximale Knorpelbrücke als Referenzpunkt diente. Die Messungen erfolgten durch Frau Jessica Steinbart und Herrn Dr. Anton Windfelder des Instituts für diagnostische und interventionelle Radiologie und pädiatrische Radiologie, Gießen, Deutschland.

2.7 Zellkulturversuche

Eine Übersicht über alle in der Zellkultur verwendeten Puffer, Lösungen und Substanzen findet sich in Tabelle 12, die Zusammensetzung der Nährmedien in Tabelle 13. Antikörper sind in Tabelle 14 aufgeführt. Alle Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Puffer/Lösung/Substanz	Katalognummer	Hersteller	
Dulbecco's Modified	10741574	4,5 g/L Glukose; Gibco®, Life	
Eagle Medium (DMEM)		Technologies, Paisley, USA	
Dulbecco's phosphate-	12559069	Gibco®, Life Technologies™,	
buffered saline (DPBS)		Paisley, USA	
Fetales Kälberserum (FCS)	11573397	Gibco®, Life Technologies™,	
		Paisley, USA	
Insulin	1342106	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	
Isopropanol	67-63-0	AnalaR NORMAPUR, VWR	
		Chemicals, Fontenay-sous-Bois,	
		Frankreich	
Öl Rot	O0625	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA	
		Merck KGaA, Darmstadt,	
		Deutschland	
Penicillin-Streptomycin (PS)	15140122	Gibco®, Life Technologies™,	
		Paisley, USA	
Rosiglitazon	557366-M	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA	
Type I Bovine Collagen	5006	Advanced Biomatrix, Carlsbad, USA	
Solution; PureCol			
StemXVivo Adipogenic	CCM011	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA	
Supplement			
Trypsin-EDTA Lösung (TE)	L 2143	Gibco®, Life Technologies™,	
		Paisley, USA	

Tabelle 12: Verwendete kommerzielle Puffer, Lösungen und Substanzen in der Zellkultur.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung		
Wachstumsmedium	4,5 g/l Glukose		
	20 % FCS		
	1 % PS (10.000 U/ml)		
	in DMEM		
Kontrollmedium	4,5 g/l Glukose		
	10 % FCS		
	1 % PS (10.000 U/ml)		
	in DMEM		
Adipogenes	30 % StemXVivo Adipogenic Supplement		
Differenzierungsmedium	1 μM Insulin		
	2 µM Rosiglitazon		
	in DMEM-Kontrollmedium		
Öl Rot-Lösung	35 ml 0,5%ige Öl Rot-Lösung		
	in Methanol		
Insulin	Insulin aus bovinem Pankreas		
	in H ₂ O mit Eisessig		
	pH 2		

Tabelle 13: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Tabelle 14: Verwendete Antikörper zur Neutralisierung von CD44 in vitro.

Antikörper	Konzentration	Katalognummer	Firma
Anti-CD44-Antikörper	10 µg/ml	1500-14	SouthernBiotech,
			Birmingham,
			England
IgG1к Isotyp	10 µg/ml	0116-14	SouthernBiotech,
			Birmingham,
			England

2.7.1 Isolierung und Differenzierung von Prä-Adipozyten aus der stromalen Knochenmarkfraktion

Zur Untersuchung des HA-Systems im Rahmen der Adipogenese *in vitro* wurde die stromal-vaskuläre Fraktion (SVF) des zellulären Knochenmarks isoliert, kultiviert und darauffolgend mittels adipogenem Differenzierungsmedium in primäre Adipozyten differenziert. Verwendet wurden sowohl C57BL/6J-Mäuse als auch *Has2-Knockouts, Has1-Knockouts* und entsprechende WT-Kontrollen. Alle Arbeiten wurden unter Sterilbedingungen ausgeführt.

2.7.1.1 Präparation und Isolierung

Wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, wurden die Tibiae der Tiere freipräpariert. Die SVF der Knochen wurde anschließend mit einer 26G-Kanüle und ca. 3 ml Wachstumsmedium herausgespült. Nachfolgend wurde die jeweilige Zellsuspension in eine T-25 ml Flasche ausgesät und das Medium nach 24-48 h ersetzt.

Konfluent gewachsene Zellen wurden nach 7-10 Tagen für die folgenden Experimente passagiert. Dazu wurde das Medium verworfen und die Zellen mit kaltem DPBS gewaschen. Die Inkubation mit 5 ml TE (5 min, 37°C) zum Lösen der Zellen erfolgte im nächsten Schritt, wobei die Reaktion durch Zugabe von warmen Kontrollmedium gestoppt wurde. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 290 × g und Resuspension des Pellets zur Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer bei einer Verdünnung von 1:10 (vgl. Abs. 2.7.1.3). Final wurde die erforderliche Zellzahl auf kollagenbeschichtete 12-Well Zellkulturplatten ausgesät. Um eine vollständige Konfluenz zu erreichen, wurden die Zellen erneut für 24 bis 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.7.1.2 Adipogene Differenzierung

Zur Initiierung der Adipogenese wurde das zuvor verwendete Wachstumsmedium durch ein spezielles adipogenes Differenzierungsmedium ersetzt. Die Differenzierung umfasste einen Zeitraum von maximal 10 Tagen, wobei die Endzeitpunkte für die Nachfolgeanalysen wie folgt festgelegt wurden: Tag 0, 3, 6, 10. Das Medium wurde alle 72 h erneuert. Für die Folgeexperimente wurden die Zellen mit Roti®-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) für 20 min RT fixiert und bei -20°C gelagert. Das Differenzierungsschema ist in Abbildung 6 dargestellt.





2.7.1.3 Zellzahlbestimmung:

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau inkubiert. Anschließend wurde 10 µl Zellsuspension auf die Platte gegeben, vier Quadrate der Zählkammer ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Zur Berechnung der Gesamtzellzahl/ml wurde folgende Formel verwendet:

Mittelwert der Zellzahl aus 4 Quadraten $\times 10^4 \times 2 \times Verdünnung$

Abschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 6 x 10⁵ Zellen/Well einer 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät.

2.7.2 Öl Rot-Färbung

Die Öl Rot-Färbung dient zur Quantifizierung eingelagerter Lipide. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem H₂O und anschließendem Trocknen für ca. 30 min bei RT wurden die Zellen für 5 min mit 60 % Isopropanol behandelt. Unter kontinuierlichem Schütteln erfolgte die Färbung mittels Öl Rot-Färbelösung für circa 20 min bei RT. Nach Abschluss wurde die Lösung verworfen und die überschüssige Farbe durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem H₂O entfernt. Nach Lyse der Zellen mittels 100%igem Isopropanol wurden diese im Plattenlesegerät (*Synergy Mx Microplate Reader*, Biotek™ Instruments) vermessen. Die Intensität der Öl Rot-Färbung wurde in Abhängigkeit vom Lipidgehalt und der Absorption der Färbelösung bei einer Extinktion von 492 nm quantifiziert. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität, normiert auf die Kontrolle.

2.7.3 CD44-Blockierung in vitro

Zur Blockierung der HA-Bindungsdomäne von CD44 wurde die Knochenmark-SVF von C57BL/6J-Mäusen vor Induktion der Adipogenese mittels Adipogencocktail für 24 h im Inkubator (37° C und 5 % CO₂) mit 10 µg/ml eines Antikörpers gegen CD44 oder 10 µg/ml IgG1κ Isotypkontrolle behandelt (s. Abbildung 7). Im Anschluss an die adipozytäre Ausdifferenzierung erfolgte die Quantifizierung der Lipide mittels Öl Rot-Färbung (s. Kapitel 2.7.2).



Abbildung 7: Schematische Darstellung der Neutralisierung der HA-Bindungsdomäne von CD44 in vitro.

2.8 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden anhand der *GraphPad Prism Software Version 8.0* (La Jolla, CA, USA) erhoben. Die Daten sind jeweils als Mittelwert \pm Standardabweichung (*Standard deviation*, SD) dargestellt. Statistische Ausreißer wurden grundsätzlich mit dem Grubbs-Test identifiziert und aus den Analysen exkludiert. Zum Vergleich zweier Datensätze wurde zunächst der Shapiro Wilk Test zur Bestimmung einer Normalverteilung angewandt. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde anschließend ein *Unpaired Students t-Test* durchgeführt, ansonsten der *Mann Whitney Test*. Daneben diente einem Vergleich mehrerer unabhängiger Datensätze eine *Two-way ANOVA* mit anschließendem multiplem Vergleichstest nach Sidak. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von Adipositas und Glukoseintoleranz nach diabetogener Fütterung auf das Stammzell-/Immunzell-Reservoir im Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen

Zunächst sollte geklärt werden, inwieweit die hämatopoetische Antwort des Knochenmarks im Kontext metabolischer und chronisch entzündlicher Erkrankungen wie Adipositas und damit verbundener Glukoseintoleranz und IR beeinflusst wird.

Hierzu wurden männliche C57BL/6J-Mäuse 9 Wochen lang mit einer DD- oder Chow-Diät gefüttert. Basierend auf der mehrwöchigen Fütterung der DD entwickeln die Tiere eine Adipositas sowie eine IR in Verbindung mit einer Glukoseintoleranz. Die Effektivität des Modells zur Induktion eines adipösen/prä-diabetischen Phänotyps wurde zuvor in eigenen Vorarbeiten bestätigt. Die Gewichtsdaten und die metabolischen Tests zur Validierung des prä-diabetischen Phänotyps in C57BL6/J-Mäusen stimmen mit der Literatur überein [202, 203] – werden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gezeigt.

Zur Charakterisierung der systemischen Inflammationsreaktion und zur Identifizierung des zellulären Ursprungs, wurden durchflusszytometrische Analysen des Knochenmarks durchgeführt. Das Knochenmark der Tiere wurde nach 9 Wochen Fütterung isoliert, aufbereitet und mit den in Tabelle 4 aufgeführten Antikörpern gefärbt. Regulatorisches und konstitutives Knochenmark wurden getrennt gemessen, um einerseits einen möglichen Effekt der DD auf die lokale Immunantwort zu erfassen und andererseits nachfolgend aber auch die Relevanz der BMAds im Kontext der Hämatopoese zu untersuchen. Im Folgenden werden die durchflusszytometrischen Analysen sowohl der HSZ als auch der myeloiden/lymphoiden Immunzellen der jeweiligen Subtypen (rMAT und cMAT) dargestellt. Die entsprechenden *Gating*-Schemata sind im Appendix zu finden.

3.1.1 Analyse der HSZ in den Knochenmarkfettsubtypen prä-diabetischer C57BL/6J-Mäuse

Um sowohl die HSZ im Rahmen einer systemischen Entzündung wie der Adipositas bedingten Glukoseintoleranz und IR zu charakterisieren, als auch potenzielle Einwirkungen expandierender Markadipozyten auf die Differenzierung der HSZ zu eruieren, wurden Einzelzellsuspensionen von rMAT und cMAT generiert und hinsichtlich ihrer Zellzusammensetzung untersucht. Die Differenzierung hämatopoetischer Zellen aus HSZ erfolgt stufenweise (vgl. Abbildung 8). Undifferenzierte Zellen exprimieren keine Linien-differenzierenden Oberflächenmarker (lineage-Marker, Lin-) sowie hohe Level des Stammzellantigens 1 (stem-cell antigen 1, Sca-1) sowie Kit. LSK-Zellen (Lin-Sca-1+Kit+) werden in Lang (CD34-)- und Kurzzeit (CD34+) HSZ unterteilt, die sich zu multipotenten Vorläuferzellen (multipotent progenitors, MPP) weiterentwickeln. Zu unterscheiden sind verschiedene MPP-Subtypen, wie MPP 2, 3 und 4. Liniendeterminiert werden Zellen der myeloischen Linie (common myeloid progenitor, CMP), Vorläufer für Granulozyten und Makrophagen (granulocyte/macrophage progenitor, GMP) sowie ein gemeinsamer Vorläufer für Megakaryozyten und Erythrozyten (megakaryocyte/erythrocyte progenitor, MEP) rekrutiert [127].



Abbildung 8: Schematische Darstellung der HSZ-Differenzierung. Erstellt mit Biorender.com.

Die Analysen im rMAT ergaben keine signifikanten Unterschiede in den Absolutwerten der verschiedenen Zellpopulationen zwischen DD- und Chow-gefütterten Tieren nach 9 Wochen (vgl. Abbildung 9 (I) (a-f)). Weder die undifferenzierten Lin⁻ Zellen noch die nachfolgenden Differenzierungsstadien der LSK⁺ und Sca1⁻ cKit⁺ myeloiden Vorläuferzellen differierten im Vergleich der Diäten. Lediglich die prozentuale Darstellung (II) zeigte hier einen signifikanten Anstieg der CD34⁻ Langzeit-HSZ in Relation zu LSK⁺ Zellen im Knochenmark der prä-diabetischen Tiere, wobei insgesamt eine niedrige LSK⁺ Gesamtanzahl im rMAT beider Behandlungsgruppen beobachtet werden konnte (vgl. Abbildung 9 (I)/(II) (b)). Darüber hinaus war ein Trend innerhalb der myeloischen Reihe in DD-gefütterten Tieren erkennbar, resultierend in einer erhöhten Anzahl CMP (Abbildung 9 (g)).



Abbildung 9: Moderater Einfluss der diabetogenen Diät auf die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen im regulatorischen Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen.

Durchflusszytometrische Analyse von HSZ im regulatorischen Knochenmark (*regulative marrow adipose tissue*, rMAT) von C57BL/6J-Mäusen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) oder respektiven Chow-Diät (n= 6, 5, außer GMP absolut: n = 5, 4). Liniendifferenzierende Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **a**, linien-negativen (Lin⁻) Zellen, **b**, LSK (Lin⁻Sca-1⁺Kit⁺) Zellen **c**, CD34⁻ Langzeit; *long term* (LT)-HSZ, **d**, CD34⁺ Kurzzeit; *short term* (ST)-HSZ, Multipotente Progenitorzellen (MPP) **e**, Typ 2 **f**, und Typ 3 & 4, **g**, myeloide Vorläuferzellen; *common myeloid progenitors* (CMP), **h**, Vorläufer für Granulozyten und Makrophagen; *granulocyte/macrophage progenitors* (GMP), **i**, Vorläufer für Megakaryozyten und Erythrozyten; *megakaryocyte/erythrocyte progenitors* (MEP). Dargestellt ist sowohl die **I**) absolute als auch die **II**) prozentuale (%) Anzahl lebender Zellen (**a**, **b**), LSK⁺ Zellen (**c-f**) oder Sca1⁻ cKit⁺ myeloider Vorläuferzellen (**g-i**). Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test*; * p ≤ 0,05.

Im Gegensatz zum rMAT zeigte sich im cMAT eine deutliche Deregulierung der HSZ. Sowohl die Anzahl der undifferenzierten Lin⁻ Zellen als auch die der LSK⁺ lag in den prädiabetischen Mäusen signifikant reduziert vor (vgl. Abbildung 10 (I) (a, b)). Ein ähnlicher Trend deutete sich auch in der MPP 2-Population an (e). Die übrigen Zellpopulationen waren nicht verändert (f-i). Die vorliegenden Daten demonstrieren somit einen Effekt der Diät-induzierten Markadipogenese im frühen Differenzierungsstadium der HSZ. Unter Berücksichtigung der zentralen Rolle myeloider Zellen bei metabolischen Pathologien korrelierte ein adipöser/prä-diabetischer Phänotyp der Tiere mit einer signifikanten Erhöhung des prozentualen CMP-Anteils (Abbildung 10 (II) (g)). Weitere Unterschiede waren nicht zu verzeichnen (vgl. (II) (a-f, h, i)).



Abbildung 10: Dysregulierte hämatopoetische Differenzierung als Folge der diabetogenen Diät im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe von C57BL/6J-Mäusen.

Durchflusszytometrische Analyse von HSZ im konstitutiven Knochenmark *(constitutive marrow adipose tissue,* cMAT) von C57BL/6J-Mäusen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) oder respektiven Chow. Liniendifferenzierende Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **a**, linien-negativen (Lin⁻) Zellen (n = 5), **b**, LSK (Lin⁻Sca-1⁺Kit⁺) Zellen (n = 5) **c**, CD34⁻ Langzeit; *long term* (LT)-HSZ (n = 5, 6), **d**, CD34⁺ Kurzzeit; *short term* (ST)-HSZ (n = 4, 6), Multipotente Progenitorzellen (MPP) **e**, Typ 2 (n = 5) **f**, und Typ 3 & 4 (n = 5, 6), **g**, myeloide Vorläuferzellen; *common myeloid progenitors* (CMP) (n = 5, 6), **h**, Vorläufer für Granulozyten und Makrophagen; *granulocyte/macrophage progenitors* (GMP) (n = 5, 6), **i**, Vorläufer für Megakaryozyten und Erythrozyten; *megakaryocyte/erythrocyte progenitors* (MEP) (n = 5, 6). Dargestellt ist sowohl die **I**) absolute als auch die **II**) prozentuale (%) Anzahl lebender Zellen (**a**, **b**) (n = 6), LSK⁺ Zellen (**c-f**) (LT HSZ: n = 5, 6; ST HSZ: 4, 5) oder Sca1⁻ cKit⁺ myeloider Vorläuferzellen (**g-i**) (CMP: n = 5; GMP: 5, 6; MEP: 5, 6). Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test*; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001;

3.1.2 Analyse von Immunzellen in den Knochenmarkfettsubtypen prädiabetischer C57BL/6J-Mäuse

Neben Untersuchungen hämatopoetischer Stammund Vorläuferzellen im Knochenmark wurden ausdifferenzierte Immunzellen der myeloiden und lymphoiden Linie analysiert. Obgleich nur eine marginal veränderte Komposition der HSZ im rMAT im Vergleich von DD und Chow validierbar war, konnten signifikante Effekte in allen hier betrachteten Immunzellpopulationen nachgewiesen werden. In Analogie zu den Ergebnissen der zirkulierenden Immunzellen von C57BL/6J-Mäusen (Daten nicht gezeigt) geht ein chronischer, systemischer Entzündungsverlauf aufgrund der DD-Fütterung mit einem Anstieg diverser Immunzellen in der hämatopoetisch aktiven Knochenmarkzone einher: Neben der signifikant erhöhten CD45⁺ Leukozytenzahl (Abbildung 11 (a)) waren auch die Absolutwerte von CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen (b), CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten (c) und CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten (d) signifikant erhöht. Ergänzend weisen die Daten auf eine Neutrophilen-vermittelte Entzündung hin, die sich in einem signifikant erhöhten Anteil der Zellen (in % der CD45⁺ Leukozytenzahl) infolge einer gestörten Glukosetoleranz äußert (s. (b, f)).



Abbildung 11: Gesteigerte Immunzell-vermittelte Entzündungsantwort im regulatorischen Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen nach Fütterung einer diabetogenen Diät.

Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Suptypen im regulatorischen Knochenmark (*regulative marrow adipose tissue*, rMAT) von C57BL/6J-Mäusen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) oder respektiven Chow-Diät (n= 5). Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **a**, CD45⁺ Leukozyten, **b**, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen, **c**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten und **d**, CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten verwendet. **e**, CD45⁺ Leukozyten, **f**, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophile, **g**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten und **h**, CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten, dargestellt als Anzahl positiver Zellen, normiert auf CD45⁺ Leukozyten. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test*; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01.

Zusätzlich sollte geklärt werden, inwieweit sich die beobachtete Reduktion hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen primär des frühen Differenzierungsstadiums in der cMAT-Immunantwort widerspiegelt. Nachfolgend wurde daher die Frage adressiert, ob die diätetisch-induzierte Akkumulation der cMAds auch die reifen Immunzellen innerhalb der hämatopoetischen Nische beeinflusst. Ersichtlich in Abbildung 12 (c) und (f) wiesen DD-gefütterte Mäuse einen signifikanten Anstieg der CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten nach 9-wöchiger Fütterungsperiode auf. Eine Expansion ist sowohl in den absoluten Zellzahlen als auch in Relation zu CD45⁺ Leukozyten erkennbar. Hinzukommend zur signifikanten Zunahme der CMP im cMAT von DD-gefütterten Tieren (vgl. Abbildung 10 (g)) kann demnach ein direkter Einfluss der Markadipogenese auf die hämatopoetische Zellularität abgeleitet werden, obgleich die übrigen Zellpopulationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten (vgl. a, b, d, e).



Abbildung 12: Anstieg der Monozyten im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe von C57BL/6J-Mäusen nach Fütterung der diabetogenen Diät.

Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Suptypen im konstitutiven Knochenmark (*constitutive marrow adipose tissue*, cMAT) von C57BL/6J-Mäusen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) oder respektiven Chow. Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **a**, CD45⁺ Leukozyten (n= 7, 8), **b**, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen (n= 6, 7) und **c**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten. (n= 7, 8) **d**, CD45⁺ Leukozyten (n= 6, 8), **e**, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophile (n= 6, 7) und **f**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten (n= 7, 8) dargestellt als Anzahl positiver Zellen, normiert auf CD45⁺ Leukozyten. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test*; * p ≤ 0,05.

3.2 cMAT-Sekretionsprofil von C57BL/6J Mäusen im Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz

Sowohl die verschiedenen Immunzellen als auch die pro- und antiinflammatorischen Zyto- und Chemokine, die aus dem betroffenen Gewebe sezerniert werden, geben Hinweise auf das inflammatorische Geschehen [120]. Im Zuge dessen wurden konditionierte cMAT-Überstände von 9 Wochen lang gefütterten C57BL/6J-Mäusen mittels Multiplex-Cytokin- bzw. Chemokin-ELISA auf das Vorhandensein verschiedener inflammatorischer Marker untersucht (s. Abs. 2.2.9).

Lediglich die MIP-1β-Sekretion im cMAT der prä-diabetischen Tiere zeigte nach 9 Wochen DD-Fütterung einen signifikanten Anstieg des pro-inflammatorischen Zytokins verglichen mit den Kontrolltieren (vgl. Abbildung 13). Alle anderen untersuchten Zytokine wiesen keine nennenswerten Unterschiede durch die Behandlung auf. Summierend verzeichnet das cMAT prä-diabetischer Tiere einen entzündlichen Zustand, charakterisiert durch die Interaktion von Stamm- und Immunzellen und einem erhöhten Spiegel von Entzündungssignalmolekülen, insbesondere MIP-1β.

250 15 1.5 50-5 0 200 40 MIP-1B (pg/ml) MIP-1a (pg/ml) TNFa (pg/ml) 10 IFNy (pg/ml) 1.0 IL-10 (pg/ml) 150 30 3 **::** 100 20-2 5 0.5 0 a 50 10-1 φ 0 0 0 0 0.0 0 1000 1.0-40-8 15-0 0 0 800 0.8-IL-12 p(40) (pg/ml) 30 IL-12 p(70) (pg/ml) IL-17A (pg/ml) 10 IL-13 (pg/ml) IL-6 (pg/ml) 600 0.6 20 4 ŏ 400 0.4 5 0 C 10 2 200 0.2 0 0.0 0 0 0 30 5 1.5 2.0 4 3 1.5 Eotaxin (pg/ml) (|m/bd) |-7 0.5 IL-1β (pg/ml) 20 IL-5 (pg/ml) IL-1α (pg/ml) 3 2 1.0 2 0 10 0.5 1 0 0 0.0 0.0 0 4000-60-500-8 0 400-0 3000 GM-CSF (pg/ml) 6 CXCL1 (pg/ml) G-CSF (pg/ml) CCL5 (pg/ml) 40 300 2000 4 :+• 8 8 200 20 0 1000 2 0 Chow 100 : പം DD 0 0 0 0



Die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen (pg/ml) wurden mittels Multiplex-Immunoassays im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe *(constitutive marrow adipose tissue,* cMAT) von C57BL/6J-Mäusen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) oder Chow-Diät bestimmt. Zur Normalisierung wurden alle experimentellen Daten mit einem Faktor *(((Gewebe (mg)/Knochen (mg))/Knochenlänge (cm)) x 100)* normiert. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sonja Hartwig und Dr. Stefan Lehr (beide Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Deutschland) erhoben. MIP-1 β (*Macrophage Inflammatory Protein*-1 β) (n = 7, 6), MIP-1 α (*Macrophage Inflammatory Protein*-1 α) (n = 7, 6), TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α)

Ergebnisse
(n = 7, 5), INFγ (Interferon-γ) (n = 5, 6), IL-10 (Interleukin-10) (n = 7, 6), IL-6 (Interleukin-6) (n = 5), IL-17A (Interleukin-17A) (n= 7, 6), IL-13 (Interleukin-13) (n = 7, 6), IL-12 (p40) (Interleukin-12 (p40)) (n = 7, 6), IL-12 (p70) (Interleukin-12 (p70)) (n = 7, 6), IL-5 (Interleukin-5) (n = 7, 6), IL-3 (Interleukin-3) (n = 7, 7), IL-1β (Interleukin-1β) (n = 7, 7), IL-1α (Interleukin-1α) (n = 7, 7), Eotaxin (n = 7, 7), G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) (n = 6, 7), GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) (n = 7, 7), CCL5 (C-Chemokin-Ligand 5/ Rantes) (n = 7, 5), CXCL1 (Chemokin (C-X-C motif)-Ligand 1/ KC) (n = 6, 5). Die Daten sind als Mittelwerte ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test;* * p ≤ 0.05.

3.3 Auswirkungen von Diät-induzierter Adipositas und Glukoseintoleranz auf die cMAT-Stoffwechselaktivität von C57BL/6J Mäusen

Fette sind essenziell für die Regulation der Energiehomöostase. Damit verbunden sind vielfältige Funktionen der verschiedenen Depots, wie z.B. des energiespeichernden WAT und des energieproduzierenden BAT [33, 208]. Das BMAT, ein separates Fettdepot, gewinnt im Rahmen metabolischer Untersuchungen zunehmend an Bedeutung [55].

Folglich sollten potenzielle BMAT-spezifische Eigenschaften und ihre metabolische Funktion im prä-diabetischen Stoffwechselkontext erforscht werden. Hierzu wurden Stoffwechselanalysen im cMAT von 9 Wochen DD- oder Chow- gefütterten C57BL/6J Mäusen mittels eines XF24 Extracellular Flux Analysators durchgeführt. Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, können mit Hilfe des Mito-Stress-Tests Rückschlüsse auf die zelluläre Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate, OCR) und die extrazelluläre Versauerungsrate (extracellular acidification rate, ECAR) – als Indikator der anaeroben Glykolyse – gezogen werden [209].

Bei einem Vergleich von DD und Chow ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede feststellen – weder in Bezug auf die gesamte OCR-Messung über die Zeit (Abbildung 14 (a)) noch in hinsichtlich der einzelnen OCR-Parameter wie der basalen (b), maximalen (c) und nicht-mitochondrialen (d) Atmungsaktivität. Darüber hinaus wurden keine Effekte mittels einer parallelen ECAR-Messung erfasst (Daten nicht dargestellt). Weitere Analysen sind notwendig, um die Physiologie und Funktion des Fettdepots im dynamischen Prozess der Energieverwertung im Falle des prädiabetischen Phänotyps genauer zu beleuchten.



Abbildung 14: Keine Effekte der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz auf die Stoffwechselaktivität des konstitutiven Knochenmarkfettgewebes von C57BL/6J-Mäusen.

Metabolische Analyse des konstitutiven Knochenmarkfettgewebes (constitutive marrow adipose tissue, cMAT) aus C57BL/6J-Mäusen mittels Seahorse XFe Analysators nach 9-wöchiger Fütterung einer diabetogenen Diät (DD) oder einer repräsentativen Chow-Diät. Messung der **a**, zellulären Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate, OCR) (pmol/min) nach Injektion von 1,25 μ M Oligomycin (1), 3 μ M Carbonylcyanid-P-triflouromethoxyphenylhydrazon (FCCP) (2) und einer Mischung aus 10 μ M Rotenon und 3 μ M Antimycin (3). **b**, Basale Respiration (pmol/min), **c**, maximale Respiration (pmol/min) und **d**, nicht-mitochondriale Respiration (pmol/min) im cMAT. Zur Normalisierung wurden alle experimentellen Daten mit einem Faktor (((Gewebe (mg)/Knochen (mg))/Knochenlänge (cm)) x 100) normiert. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Zweifache ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; ungepaarter Student's t-Test; n = 2, 4 entspricht 4, 8 biologischen n).

3.4 Charakterisierung der HA-Matrix im Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen

Eine zentrale Funktion der HA-reichen EZM in WAT und BAT konnte bereits im prädiabetischen Tiermodell gezeigt werden, während über die Matrix im BMAT bisher wenig bekannt ist.

In eigenen Vorarbeiten wurde das Vorkommen von HA im BMAT verifiziert. Zur detaillierteren Charakterisierung von HA sowie morphologischer Veränderungen wurden Querschnitte des distalen Knochenmarks nach 9 Wochen DD für HA angefärbt. Repräsentative Aufnahmen der HA-Färbung (s. Abbildung 15), detektiert mittels Cy3-konjuguiertem Streptavidin (a) oder einer 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)- Färbelösung (b), verdeutlichen die HA-Expression im heterogenen Knochenmark der Tiere.

Im Anschluss sollte einerseits die Genexpression der *Has* im cMAT und andererseits ein möglicher Einfluss der frühen Diabetesprogression auf die Matrix und damit auf die Expression der einzelnen HA-Isoenzyme ermittelt werden. Dazu wurde die Verteilung der *Has* mRNA Expression *in vivo* sowohl basal (c) als auch nach 9-wöchiger DD-Fütterung (d) analysiert. Bis dato sind keine Publikationen bekannt, in denen die drei *Has*-Gene im BMAT identifiziert wurden. Angesichts der hohen BMAd-Plastizität nicht nur im Alter, sondern auch unter pathologischen Bedingungen wird jedoch ein ausgeprägtes *Remodelling* der HA-reichen EZM erwartet. Hinweise darauf lieferten bereits frühere Arbeiten *in vitro*, in denen eine positive Korrelation zwischen Adipogenese und HA-Synthese in 3T3-L1-Zellen [195, 196] sowie der *Has2* mRNA-Expression [210] gezeigt werden konnte. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus WAT und BAT [28] konnte auch im BMAT zumindest unter basalen Bedingungen (c) eine maximierte *Has2* mRNA-Expression (89,64 %) nachgewiesen werden, indes die *Has3* mRNA (93,99 %) infolge der diabetogenen Fütterung (d) prädominant exprimiert wurde.



Abbildung 15: Charakterisierung der Hyaluronsäure (HA)-Matrix im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe von C57BL/6J-Mäusen.

Immunhistochemische Quantifizierung von HA in Querschnitten des distalen Knochenmarks von 13 Wochen (w) alten männlichen C57BL/6J-Mäusen nach 9-wöchiger diabetogener Fütterung (DD). Repräsentative Bilder HA-gefärbter Schnitte unter Verwendung eines biotinylierten HA-Bindeproteins (*hyaluronic acid binding protein*, HABP) sowie Detektion anhand **a**, eines Cy3-konjuguierten Streptavidins- oder **b**, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Vergrößerung: 40fach. Maßstabsbalken: 50 µm. Primereffizienzbestimmung der *Has1*, *Has2* und *Has3* mRNA im cMAT von C57BL/6J-Mäusen, **c**, basal (n = 3) und **d**, nach 9-wöchiger Fütterung der DD (n = 2). Basal: *Has1* (4, 21 %), *Has2* (89,64 %) und *Has3* (6,15 %); Prä-Diabetisch: *Has1* (4, 79 %), *Has2* (1,22 %) und *Has3* (93,99 %).

In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob Diät-induzierte Anomalien des Stoffwechsels mit einer veränderten Expression des wesentlichen HA-Rezeptors CD44 im BMAT *in vivo* einhergehen (vgl. Abbildung 16). Nach 3 Wochen diabetogener Fütterung zeigten sich keine Abweichung im Vergleich zur Kontrolle (a). Eine signifikante Herunterregulation von *Cd44* mRNA konnte jedoch im prä-diabetischen cMAT nach 9 Wochen Fütterung nachgewiesen werden (b).



Abbildung 16: Expression des HA-Hauptrezeptors CD44 im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe von C57BL/6J-Mäusen nach Fütterung der diabetogenen Diät.

Cd44-mRNA Expression im konstitutiven Knochenmarkfett (*constitutive marrow adipose tissue*, cMAT) von C57BL/6J-Mäusen nach **a**, 3 Wochen (n = *Cd44*: 5, 4; 2 n.d.) sowie **b**, 9 Wochen (n = *Cd44*: 4, 9) diabetogener Diät (DD) oder entsprechender Chow-Diät. Der relative Expressionsunterschied zwischen DD und Chow, normalisiert zum Referenzgen (18S) wird in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dargestellt. N.d. steht für nicht detektierbar. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test*; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01.

3.5 Rolle von CD44 bei der Knochenmarkadipogenese in vitro

Für eine genauere mechanistische Untersuchung von CD44 in der Adipogenese wurden Prä-Adipozyten aus stromal-vaskulären Zellen des Knochenmarks von C57BL/6J-Mäusen isoliert, nach dem beschriebenen Standardprotokoll differenziert und zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich der Lipidakkumulation mittels Öl Rot-Färbung untersucht (s. Kapitel 2.7). Anschließend erfolgte eine Neutralisierung der HA-Bindungsdomäne des HA-Hauptrezeptors für 24 h vor Initiierung der Adipogenese (vgl. Kapitel 2.7.3; Abbildung 7). Die Blockade der CD44-HA-Interaktion führte zu einer signifikanten Reduktion der Differenzierung primärer Prä-Adipozyten nach 6 Differenzierungstagen (d6) (vgl. Abbildung 17 (a)). CD44 scheint somit eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Adipogenese zu spielen.





Abbildung 17: CD44-Rezeptorblockierung beeinträchtigt die adipogene Differenzierung der stromal-vaskulären Knochenmarkfraktion in primäre Prä-Adipozyten.

a, Quantifizierung von Prä-Adipozyten des Knochenmarks mittels Öl Rot-Intensität (Absorption bei 492 nm) im Verlauf von 6 Differenzierungstagen (dx) (n= d0: 5, 5; d3: 7, 7; d6: 5, 5) von C57BL/6J-Mäusen nach Behandlung mit einem blockierenden Antikörper (AK) gegen die HA-Bindungsdomäne von CD44 oder der entsprechenden Isotypkontrolle für 24 h. **b**, Repräsentative Aufnahme der Öl Rot-Färbung 6 Tage nach Induktion der Adipogenese. Vergrößerung: 20fach, Maßstabsbalken: 200µm. Zweifache ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; * p ≤ 0,05.

3.6 Effekt der genetischen *Has*-Defizienz im Modell der Diätinduzierten Adipositas und Glukoseintoleranz

Die Synthese von HA hat einen direkten Einfluss auf die Funktionen des weißen und braunen Fettgewebes, so dass funktionelle Eigenschaften von HA bei der Regulation des Stoffwechsels postuliert werden [28, 169]. Inwieweit HA einen metabolischen Phänotyp im BMAT ähnlich wie in anderen Fettdepots beeinflusst, sollte subsekutiv geklärt werden.

Ob ein pathologischer Glukosestoffwechsel in Form eines Prä-Diabetes einen Effekt auf das HA-System im BMAT hat, wurde anhand zwei verschiedener *Has-Knockout*-Linien im etablierten Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz bzw. IR untersucht. Dazu erhielten Mäuse mit einem genetischen Defekt der HA-synthetisierenden Enzyme HAS1, und -2 sowie die jeweiligen WT-Kontrollen über einen

Zeitraum von 9 Wochen entweder eine DD oder eine entsprechende Chow-Diät (vgl. Abbildung 4). Tiere mit einer *Has3*-Defizienz sind nicht Teil dieser Arbeit.

3.6.1 Einfluss der Diät-induzierten Adipositas auf das Körpergewicht sowie die Glukosetoleranz bei *Has2-Defizienz in vivo*

Da der kongenitale *Knockout* der murinen *Has2* embryonal letal ist, erfolgte die Induktion des *Knockouts* mit Tamoxifen vor Beginn der Fütterung ab einem Alter von 10-13 Wochen. Die erhobenen Daten signalisieren, dass die Fütterung von DD zu einer erheblichen Zunahme des Körpergewichts beider Genotypen, *Has2-Knockout* sowie WT-Kontrolle, über einen Zeitraum von 9 Wochen führt (Abbildung 18 (a)).

Um unabhängig davon die Wirkung von DD auf den Glukosestoffwechsel und die systemische Glukosetoleranz zu evaluieren, wurde nach 3, 6 und 9 Wochen DD-Gabe ein i.p. GTT durchgeführt. Auch hier zeigten sich keine Abweichungen zwischen den *Has2-Knockout*-Mäusen und den WT-Kontrollen (c, d, e). Außerdem konnte kein Genotypen-Effekt auf die Insulinsekretion im murinen Plasma detektiert werden (b). Obwohl die *Has2*-Defizienz keinen direkten Effekt auf den metabolischen Phänotyp im Sinne einer verbesserten oder verschlechterten Glukosetoleranz oder Insulinsensitivität zeigte, konnte anhand von Chow-gefütterten *Has2-Knockout*-Mäusen die Effektivität des Mausmodells zur Generierung eines adipösen und prä-diabetischen Phänotyps gezeigt werden. Nachfolgend bildet der Genotypen-Vergleich DD-gefütterter Tiere die Basis sämtlicher Experimente.



Abbildung 18: Einfluss der diabetogenen Fütterung auf das Körpergewicht sowie die Glukosetoleranz bei *Has2*-Defizienz *in vivo.*

13 Wochen alte *Has2-Knockout* (KO)-Mäuse sowie entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen wurden mit einer diabetogenen Diät (DD) über einen Zeitraum von 9 Wochen gefüttert. Die Fütterung der *Has2*-KOs anhand der Chow-Diät diente als zusätzliche Kontrolle. **a**, Körpergewicht in Gramm (g) (n = *Has2*-WT 16, *Has2*-KO 9, *Has2*-KO Chow 4). **b**, Plasmainsulinspiegel (ng/ml) nach 9-wöchiger DD im Vergleich der Genotypen (n = 6). Intraperitonealer Glukosetoleranztest (mg/dl) nach **c**, 3 Wochen (n = 9, 3), **d**, 6 Wochen (n = 6, 4) und **e**, 9 Wochen (n = *Has2*-WT 9, *Has2*-KO 7, *Has2*-KO Chow 4). Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Zweifache ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; ungepaarter *Student's t-Test*.

3.7 Einfluss der HAS2 auf die Heterogenität der Knochenmarknische in einem Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz

Obwohl der *Has2-Knockout* keine Auswirkungen auf das Körpergewicht und die systemische Glukosetoleranz hat (vgl. Abbildung 18), konnte dennoch eine veränderte Komposition des Knochenmarks bei DD gefütterten *Has2-Knockout*-Mäusen im Vergleich zu WT-Kontrollen beobachtet werden (vgl. Abbildung 19). Es ist bekannt, dass Fettgewebe im Knochenmark auf Veränderungen des Ganzkörpermetabolismus reagiert, weshalb eine Fettgewebsexpansion mit einem pathophysiologischen Stoffwechsel in Verbindung gebracht wird [88]. Die makroskopische Quantifizierung der BMAds nach 9 Wochen DD-Fütterung offenbarte eine signifikante Reduktion der Fettablagerung im peripheren Teil der Tibia von *Has2-Knockout*-Tieren (a, b) und eine

positive Korrelation mit dem Körpergewicht der Tiere (c). Exemplarische HE-gefärbte Knochenbilder illustrieren die Reduktion des BMAT-Volumens bei prä-diabetischen *Has2-Knockout*-Mäusen – spezifisch von cMAT lokalisiert im distalen Bereich (d).



Abbildung 19: HAS2 induziert Veränderungen der Knochenmarknische im Modell der Diätinduzierten Adipositas und Glukoseintoleranz.

Quantitative Bestimmung des Fettgewebes im Vergleich zwischen den Genotypen, Has2-Knockout (KO) und Wildtyp (WT)-Kontrollen, in der Tibia nach 9-wöchiger Fütterung mit einer diabetogenen Diät (DD). a, Repräsentative Ausnahmen der Tibia von WT sowie KO. Die rote Markierung zeigt den Bereich des konstitutiven Knochenmarkfettgewebes (constitutive marrow adipose tissue, cMAT). b, Quantifizierung des cMAT-Anteils (mm) pro Knochen (n = 10). c, cMAT (mm)/Knochen in Relation zum Körpergewicht (g) der Tiere nach 9 Wochen Diät (n = 9,10). Der Korrelationskoeffizient R2 wurde bestimmt, wobei r > 0 eine positive Korrelation darstellt: cMAT (mm)/Knochen/Körpergewicht (g) Has2-KO = 0,1585 und WT = 0,0055. d, Exemplarische Aufnahmen des zugehörigen HE-gefärbten Knochenmarks, wobei die roten Markierungen die unterschiedlichen Knochenmarkfettsubtypen (cMAT und rMAT; regulatorisches Knochenmarkfettgewebe (regulative marrow adipose tissue) abbilden. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test; * $p \le 0.05$; ** $p \le 0.01$; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

3.8 Einfluss von HAS2 auf die Adipogenese im Knochenmark *in vitro*

Im Weiteren sollte geklärt werden, ob die adipogene Differenzierung *in vitro* im Rahmen eines genetischen *Has2*-Mangels einer Veränderung unterliegt. Zu diesem Zweck wurden Prä-Adipozyten aus stromal-vaskulären Zellen der Tibia von *Has2-Knockout-*Mäusen und entsprechenden WT-Kontrollen isoliert, nach dem beschriebenen Standardprotokoll differenziert und zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich der Lipidakkumulation mittels Öl Rot-Färbung untersucht (s. Kapitel. 2.7).



Abbildung 20: Adipogene Differenzierung der stromal-vaskulären Knochenmarkfraktion in primäre Prä-Adipozyten ist HAS2-vermittelt.

a, Quantifizierung von Prä-Adipozyten des Knochenmarks mittels Öl Rot-Intensität (Absorption bei 492nm) im Verlauf von 6 Differenzierungstagen (dx) (n = 5, 5) von 13 Wochen *Has2-Knockout* (KO)-Mäusen sowie entsprechender Wildtyp (WT)-Kontrollen. **b**, Repräsentative Aufnahme der Öl Rot-Färbung 6 Tage nach Induktion der Adipogenese. Vergrößerung: 20fach. Maßstabsbalken: 200µm. Zweifache ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest.

Kohärent zeigte sich eine tendenziell verminderte Lipidakkumulation nach einem *Knockout* von *Has2,* was zusätzlich die Idee einer pro-adipogenen HA-Signaltransduktion im Rahmen der frühen Adipozytendifferenzierung stützt.

3.9 Einfluss von HAS2 auf den cMAT-Energiestoffwechsel des Knochenmarkfettgewebes im Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz

Erwiesenermaßen beeinträchtigt eine unzureichende Sauerstoffversorgung die adipogene Differenzierung. Ergänzend zeigten adipöse C57BL/6J-Mäuse signifikant niedrigere Sauerstoffwerte im WAT [211, 212].

Dem dynamischen BMAT wird eine zentrale Funktion in Hinblick auf die Erhaltung des metabolischen Gleichgewichts zugeschrieben [87]. Zudem deuten bisher gewonnene Daten im WAT und BAT darauf hin, dass HA einen direkten Einfluss auf den Glukosestoffwechsel hat, zumal Glukosederivate die Vorstufe von HA bilden [164, 194]. Hinzukommend suggeriert sowohl die gesteigerte HA-Synthese während der Ausdifferenzierung zu Adipozyten *in vitro* [210, 213] als auch die HA-Akkumulation unter diabetischen Konditionen im WAT *in vivo* [200, 201, 214] eine funktionelle metabolische Rolle der HA.

Zur Erstellung eines Stoffwechselprofils für das konstitutive cMAT wurde der Mito-Stress-Test mittels XF24 Extracellular Flux Analysators durchgeführt. Unter Verwendung des standardisierten Tests können Aussagen sowohl über die OCR als auch die ECAR und somit die anaerobe Glykolyse getroffen werden (vgl. Abs. 2.4). Im Anschluss an eine 9-wöchige DD-Fütterung wurde das cMAT von Has2-Knockouts sowie WT-Kontrollen für Analysen der metabolischen Aktivität entnommen. Ein Vergleich der Genotypen ließ spezifisch signifikante Unterschiede in der OCR feststellen (Abbildung 21 (a)). Basierend auf den OCR-Parametern der basalen (b), maximalen (c) und nicht-mitochondrialen (d) Atmungsaktivität ergab sich ein signifikant reduziertes respiratorische Potential der HAdefizienten Tiere unter prä-diabetischen Bedingungen. Ein signifikant erniedrigter Grundenergiestatus der Has2-defizienten Adipozyten ging mit verminderten Basalwerten einher. Anschließend erfolgte die Hemmung der mitochondrialen Atmung durch den Komplex V-Inhibitor Oligomycin. Die Zugabe von FCCP, einem Entkoppler der Atmungskette, initiiert eine maximale OCR, wobei ein Has2-Knockout signifikant minimierte Werte bedingte. Ergänzend korrelierte eine verringerte HA-Synthese in Has2-Knockouts mit einer statistisch signifikanten Reduktion der nicht-mitochondrialen Atmungskapazität nach Zugabe der Kombination aus Rotenon/Antimycin A zur erneuten Inhibition der mitochondrialen Atmung. Indes waren keine Abweichungen in der ECAR bestimmbar (Daten nicht dargestellt).

Es ist Gegenstand zukünftiger Forschung, ob ein HA-Mangel ähnlich wie beim BAT das energetische BMAT-Profil moduliert und ggf. einen direkten Einfluss auf eine Verschiebung des Glukoseflusses in Richtung Glykolyse durch erhöhte Substratbereitstellung hat. Gleichermaßen sind weitere Untersuchungen notwendig, um einerseits die zugrundeliegenden Mechanismen des defizitären Energiestoffwechsels im cMAT und andererseits die Fähigkeit der Adipozyten zur Modulation des Mikromilieus im Hinblick auf die frühe Diabetesprogression aufzuklären.



Abbildung 21: Defizitäre Stoffwechselaktivität des konstitutiven Knochenmarkfettgewebes von *Has2*-defizienten Mäusen unter prä-diabetischen Bedingungen.

Metabolische Analyse des konstitutiven Knochenmarkfettgewebes (constitutive marrow adipose tissue, cMAT) aus Has2-Knockout (KO) Mäusen oder entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen mittels Seahorse XFe Analysators nach 9-wöchiger Fütterung einer diabetogenen Diät (DD). Messung der a, zellulären Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate, OCR) (pmol/min) μM nach Injektion 1,25 Oligomycin μM Carbonylcyanid-Pvon (1), 3 triflouromethoxyphenylhydrazon (FCCP) (2) und einer Mischung aus 10 µM Rotenon und 3 µM Antimycin (3). b, Basale Respiration (pmol/min), c, maximale Respiration (pmol/min) und d, nicht-mitochondriale Respiration (pmol/min) im cMAT. Zur Normalisierung wurden alle Versuchsdaten mit einem Faktor (((Gewebe (mg)/Knochen (mg))/Knochenlänge (cm)) x 100) normiert. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Zweifache ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; ungepaarter Student's t-Test; * $p \le 0,05$; n = 4 entspricht 8 biologischen n).

3.10 Beeinflussung der Laktathomöostase des Knochenmarksfettgewebes durch HAS2 im Modell der Diätinduzierten Adipositas und Glukoseintoleranz

Die Laktatdehydrogenase (LDH), ein wichtiges Oxidoreduktase-Enzym des anaeroben Stoffwechsels, katalysiert die bidirektionale Umwandlung von Laktat und NAD⁺ aus Pyruvat und NADH. Um Anhaltspunkte zu erhalten, ob die verminderte respiratorische Atmungsaktivität im cMAT von *Has2*-defizienten Tieren unter prä-diabetischen Bedingungen (vgl. Abbildung 21) mit einer Verschiebung des zellulären Stoffwechsels in Richtung anaerober Glykolyse einhergeht, wurde die LDH-Aktivität gemessen. Zu diesem Zweck wurde das cMAT von *Has2-Knockout*-Mäusen sowie WT-Kontrollen nach 9 Wochen DD-Fütterung isoliert, entsprechend aufbereitet und die Reduktion von NAD⁺ zu NADH durch LDH kolorimetrisch bei 450 nm spezifisch nachgewiesen.

Die genetische Deletion von *Has2* führte zu einer signifikant reduzierten LDH-Aktivität (mU/ml Laktat normalisiert auf Gewebe und WT-Kontrolle) im cMAT in Korrelation zur Kontrolle (b).

In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Alterationen des cMAT-Energiestoffwechsels sprechen die Ergebnisse insgesamt für eine regulatorische Rolle von HA im Rahmen des zellulären BMAd-Energiestatus.



Abbildung 22: *Has2*-Defizienz korreliert mit einer Reduktion der Laktatdehydrogenase-Aktivität im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe unter prä-diabetischen Bedingungen.

a, Schematische Darstellung der enzymatischen Oxidation von Laktat zu Pyruvat, katalysiert durch die Laktatdehydrogenase (LDH). **b**, Quantifizierung der enzymatischen LDH-Aktivität (mU/ml Laktat) mittels LDH-Assay im konstitutiven Knochenmarkfett (*constitutive marrow adipose tissue*, cMAT) von *Has2-Knockout* (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen (n = 6) nach 9-wöchiger Fütterung mit einer diabetogenen Diät (DD). Zur Normalisierung wurden alle experimentellen Daten mit einem Faktor (((Gewebe (mg)/Knochen (mg))/Knochenlänge (cm)) x 100) normiert. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test;* * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

3.11 Einfluss von HAS2 auf das Stammzell-/Immunzellreservoir im Knochenmark nach Induktion von Adipositas und Glukoseintoleranz

Um ein detailliertes Verständnis über die Rolle der HAS2 im Kontext der zellulären und funktionellen Heterogenität des Knochenmarks zu erhalten, wurden Analysen hämatopoetischer Stamm- und Immunzellen von prä-diabetischen *Has2-Knockout*-Mäusen sowie entsprechenden WT-Kontrollen durchgeführt. Eine Studie von Goncharova *et al.,* lieferte bereits Indizien für HA als entscheidenden Akteur im hämatopoetischen Mikromilieu. Eine pharmakologische Hemmung der HAS und der Synthese von HA durch 4-MU unterdrückte die Hämatopoese *in vitro* [215].

Angesichts der embryonalen Letalität einer genetischen Has2-Ablation (s. Kapitel 2.2.1.2) ist die zelluläre Funktion von HAS2-produzierter HA innerhalb des Stammzellund Immunzellreservoirs des Knochenmarks im Zusammenhang mit Prä-Diabetes in vivo noch wenig verstanden. Um HA-basierte Effekte zu untersuchen, wurde zunächst ein Knockout mittels Tamoxifen-induzierbarer Cre-Rekombinase induziert und sowohl Has2-Knockout-Mäuse als auch die entsprechenden WT-Kontrollen über 9 Wochen mit DD gefüttert. Nachfolgend wurde das Knochenmark isoliert, mit den in Tabelle 4 aufgeführten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch charakterisiert. In Analogie zu Analysen der C57BL/6J-Mäuse wurden das regulatorische und das konstitutive Knochenmark getrennt vermessen, um sowohl die Auswirkungen der HA auf die zelluläre Immunantwort als auch die Rolle der HA-reichen BMAds im hämatopoetisch Knochenmark zu identifizieren. aktiven Im Folgenden werden die durchflusszytometrischen Analysen sowohl der HSZ als auch der myeloiden/lymphoiden Immunzellen der jeweiligen Subtypen (rMAT und cMAT) dargestellt. Die entsprechenden Gating-Schemata sind im Appendix zu finden.

In Korrespondenz zu den zuvor erwähnten *in vitro* Studien konnten auch *in vivo* Genotypunterschiede präzisiert werden. Ein *Has2*-Mangel beeinträchtigte die Differenzierung der HSZ im cMAT der Tiere. Eine signifikant verringerte Anzahl undifferenzierter Lin⁻ HSZ im cMAT DD-gefütterter *Has2-Knockouts* (Abbildung 23 (I) (a)) war mit einer tendenziellen Reduktion von LSK⁺ Zellen (Lin⁻Sca-1⁺Kit⁺) (b) und einer signifikant geringeren MPP-Anzahl (Typ 2 (e) und Typ 3/4 (f)) assoziiert. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich hinsichtlich der differenzierteren Stadien: Ein deutlicher Trend zur Reduktion von CMP (g), GMP (h) und eine Signifikanz von MEP (j) konnte im cMAT bei *Has2*-Defizienz beobachtet werden.



HA scheint hingegen keine eindeutige Auswirkung auf die prozentuale Verteilung der HSZ unter prä-diabetischen Bedingungen im cMAT zu haben (vgl. Abbildung 23 (II)).

Abbildung 23: *Has2*-Defizienz beeinträchtigt das frühe Differenzierungsstadium hämatopoetischer Stammzellen im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe unter prädiabetischen Bedingungen.

Durchflusszytometrische Analyse von HSZ im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe (constitutive marrow adipose tissue, cMAT) von Has2-Knockout (KO)-Mäusen oder entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) (n = 5, 5). Liniendifferenzierende Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **a**, linien-negativen (Lin⁻) Zellen, **b**, LSK⁺ (Lin⁻Sca-1⁺Kit⁺) Zellen **c**, CD34⁻ Langzeit; *long term* (LT)-HSZ, **d**, CD34⁺ Kurzzeit; *short term* (ST)-HSZ, Multipotente Progenitorzellen (MPP) **e**, Typ 2 **f**, und Typ 3 & 4, **g**, myeloide Vorläuferzellen; *common myeloid progenitors* (CMP), **h**, Vorläufer für Granulozyten und Makrophagen; *granulocyte/macrophage progenitors* (MEP). Dargestellt ist sowohl die **I**) absolute als auch die **II**) prozentuale (%) Anzahl lebender Zellen (**a**, **b**), LSK⁺ Zellen (**c-f**) oder Sca1⁻ cKit⁺ myeloider Vorläuferzellen (**g-i**) (n = 6, 5). Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test;* * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01.

Die Analysen im rMAT ergaben keine Unterschiede zwischen den Genotypen bezüglich der absoluten oder relativen Zellzahlen aller untersuchten Populationen (vgl. Abbildung 24 (I & II)). Weder die undifferenzierten Lin⁻ Zellen (a) noch die nachfolgenden Differenzierungsstadien der LSK⁺ (b-f) und Sca-1⁻cKit⁺ myeloiden Vorläuferzellen (g-i) divergierten aufgrund des HA-Mangels.



Abbildung 24: Die hämatopoetische Differenzierung im regulatorischen Knochenmarkfettgewebe ist nicht HAS2-vermittelt.

Durchflusszytometrische Analyse von HSZ im regulatorischen Knochenmarkfettgewebe (regulative marrow adipose tissue, rMAT) von Has2-Knockout (KO)-Mäusen oder entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) (n = 6, 4). Liniendifferenzierende Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **a**, linien-negativen (Lin⁻) Zellen, **b**, LSK⁺ (Lin⁻Sca-1⁺Kit⁺) Zellen **c**, CD34⁻ Langzeit; *long term* (LT)-HSZ, **d**, CD34⁺ Kurzzeit; *short term* (ST)-HSZ, Multipotente Progenitorzellen (MPP) **e**, Typ 2 **f**, und Typ 3 & 4, **g**, myeloide Vorläuferzellen; *common myeloid progenitors* (CMP), **h**, Vorläufer für Granulozyten und Makrophagen; *granulocyte/macrophage progenitors* (MEP). Dargestellt ist

sowohl die I) absolute als auch die II) prozentuale (%) Anzahl lebender Zellen (a, b), LSK⁺ Zellen (c-f) oder Sca1⁻ cKit⁺ myeloider Vorläuferzellen (g-i). Die Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test;* * p ≤ 0,05.

3.11.1 Analyse von Immunzellen in den Knochenfettsubtypen prädiabetischer *Has2-Knockout*-Mäuse

Von Interesse war neben Veränderungen der zellulären HSZ-Zusammensetzung auch, ob die genetische Ablation von Has2 die prä-Diabetes-induzierte Immunzellverschiebung im Knochenmark ähnlich wie bei C57BL/6J Mäusen beeinflusst (vgl. Abs. 3.1). Wie zuvor erläutert, führt die Fütterung von DD über 9 Wochen bei C57BL/6J-Mäusen zu einer erhöhten Anzahl myeloider Zellen, begleitet von Neutrophilie und Monozytose. Ersichtlich in Abbildung 25 ist, dass bei keiner der untersuchten Populationen basierend auf CD45⁺ Leukozyten (a, e), CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen (b, f), CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten (e, g) und CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten (d, h) signifikante Unterschiede im cMAT zwischen den WT-Tieren und den Tieren mit Has2-Defizienz verzeichnet werden konnten.



Abbildung 25: Die Immunzell-vermittelte Entzündungsantwort des konstitutiven Knochenmarkfettgewebes unter prä-diabetischen Bedingungen wird nicht durch HAS2 reguliert.

Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen im konstitutiven Knochenmark (constitutive marrow adipose tissue, cMAT) von Has2-Knockout (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) = 7). Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **a**, CD45⁺ Leukozyten, (n CD45+CD11b+Ly6G+ Neutrophilen, C, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten h. und d, CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten verwendet. e, CD45⁺ Leukozyten, f, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophile, **g**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten und **h**, CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten, dargestellt als Anzahl positiver Zellen, normiert auf CD45⁺ Leukozyten. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test; * $p \le 0,05$.

Darüber hinaus konnte kein HAS2-Effekt auf die Immunantwort im hämatopoetisch aktiven rMAT verifiziert werden. Die relative Anzahl der CD45⁺Leukozyten zur Gesamtzellzahl in den *Knockout*-Mäusen war im Vergleich zu den WT-Kontrollen signifikant, jedoch nur minimal reduziert (s. Abbildung 26 (e)). Es zeigte sich lediglich eine Tendenz zur lymphoiden Zelllinie, zumal der Anteil der CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten an den CD45⁺Leukozyten im rMAT nach *Has2*-Ablation erhöht war.



Abbildung 26: Die Immunzell-vermittelte Entzündungsantwort des regulatorischen Knochenmarkfettgewebes unter prä-diabetischen Bedingungen wird nur geringfügig durch HAS2 reguliert.

Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen im regulatorischen Knochenmark (regulative marrow adipose tissue, rMAT) von Has2-Knockout (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) (n = 8, 5). Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung CD45⁺ Leukozyten, von а, b, CD45+CD11b+Ly6G+ Neutrophilen, CD45+CD11b+Ly6C+ Monozyten C, und d, $CD45^+CD11b^-Ly6G^-$ Lymphozyten (n = 6, 5). verwendet. e, $CD45^+$ Leukozyten, f, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophile, g, Monozyten und h, CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten, dargestellt als Anzahl positiver Zellen, normiert auf CD45⁺ Leukozyten. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test; * p ≤ 0,05.

Sowohl die Differenzierung hämatopoetischer Zellen aus HSZ als auch die Immunzellvermittelte Inflammationsreaktion eines adipösen/prä-diabetischen Phänotyps im Knochenmark werden offenbar durch HA beeinflusst. Unklar bleibt, inwieweit HA als Regulativ innerhalb der heterogenen Marknische in der Lage ist, die zugrundeliegenden Mechanismen eines systemischen Entzündungsgeschehens im Kontext metabolischer Nischendysfunktionen zu modulieren.

3.12 BMAT-Sekretionsprofil in *Has2*-defizienten Mäusen im Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz

Neben Stamm- und Immunzellen geben pro- und anti-inflammatorische Zytokine und Chemokine Hinweise auf das Entzündungsgeschehen. Daher wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine und Chemokine in den verschiedenen BMAT-Subtypen - rMAT und cMAT - mit Hilfe eines Multiplex-Immunoassays bestimmt (vgl. Abs. 2.2.9). Es ist bekannt, dass HA verschiedene Zytokine reguliert [215]. Beispielsweise korreliert die HA-Supplementierung in Langzeit-Knochenmarkzellen mit einer erhöhten Produktion von z.B. MIP-1a, MCP-1, CXCL16, SDF-1/CXCL12 und CCL5/RANTES. Darüber hinaus sind BMAds selbst in der Lage, zahlreiche Zytokine wie IL-6, IL-8, TNF-α, CXCL1, CXCL2, CXCL12 und MCP-1 zu produzieren [86]. Die Frage eines direkten Einflusses von HA auf das Sekretionsprofil der Adipozyten im Knochenmark sollte im Folgenden aufgegriffen werden.

Aus Abbildung 27 ist zu entnehmen, dass insbesondere im rMAT *Has2*-defizienter Mäuse nach 9-wöchiger DD-Gabe eine signifikante Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12 (p70) und MIP-1β in Korrelation zu den WT-Kontrollen detektiert wurde. Ein signifikanter Anstieg einer weiteren Untergruppe von IL-12, IL-12 (p40), konnte ebenfalls im rMAT bei Has2-Defizienz nachgewiesen werden. Alle verbleibenden Zytokine und Chemokine zeigten dahingegen keine Effekte.





Die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen (pg/ml) wurden mittels Multiplex-Immunoassays im regulatorischen Knochenmarkfett (*regulative marrow adipose tissue*, rMAT) von *Has2-Knockout* (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) bestimmt. Zur Normalisierung wurden alle experimentellen Daten mit einem Faktor (((Gewebe (mg)/Knochen (mg))/Knochenlänge (cm)) x 100) normiert. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sonja Hartwig und Dr. Stefan Lehr (beide Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Deutschland) erhoben. MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) (n = 5, 6), MIP-1 β (macrophage inflammatory protein-1 β) (n = 4, 5), , TNF- α (Tumor-Nekrose-

Faktor- α) (n = 5, 6), INF γ (Interferon- γ) (n = 4, 3), IL-6 (Interleukin-6) (n = 5), IL-17A (Interleukin-17A) (n = 5, 6), IL-12 (p70) (Interleukin-12 (p70)) (n = 4, 6), IL-12 (p40) (Interleukin-12 (p40)) (n = 5, 6), IL-5 (Interleukin-5) (n = 5), IL-3 (Interleukin-3) (n = 5, 6), IL-1 β (Interleukin-1 β) (n = 5, 6), IL-1 α (Interleukin-1 α) (n = 5, 6), IL-4 (Interleukin-4) (n = 4, 5), Eotaxin (n = 5, 7), G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) (n = 4, 6), GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) (n = 4, 3), CCL5 (C-Chemokin-Ligand 5/Rantes) (n = 5, 6). Die Daten sind als Mittelwerte ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test;* * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01. N.d. = nicht detektierbar.

Parallel zu den vorangegangenen Analysen im rMAT wurde auch das Sekretionsprofil im cMAT untersucht (s. Abbildung 28). Das Zytokin/Chemokin-Profil im prä-diabetischen Zustand wurde durch die *Has2*-Defizienz jedoch nur geringfügig beeinflusst.



Abbildung 28: cMAT-Sekretionsprofil in *Has2*-defizienten Mäusen im Modell der Diätinduzierten Adipositas und Glukoseintoleranz.

Die Zytokin- und Chemokinkonzentration (pg/ml) wurde mittels Multiplex-Immunoassays im konstitutiven Knochenmarkfett (*constitutive marrow adipose tissue*, cMAT) von *Has2-Knockout* (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) bestimmt. Zur Normalisierung wurden alle experimentellen Daten mit einem Faktor (((Gewebe (mg)/Knochen (mg))/Knochenlänge (cm)) x 100) normiert. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sonja Hartwig und Dr. Stefan Lehr (beide Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Deutschland) erhoben. MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein*-1 α) (n = 5, 6), MIP-1 β (*macrophage inflammatory protein*-1 β) (n = 5, 7), TNF- α (Tumor-Nekrose-

Faktor- α) (n = 5, 7), INF γ (Interferon- γ) (n = 4, 6), IL-10 (Interleukin-10) (n = 4, 10), IL-6 (Interleukin-6) (n = 4, 7), IL-17A (Interleukin-17A) (n= 4, 7), IL-12 (p70) (Interleukin-12 (p70)) (n = 4, 7), IL-12 (p40) (Interleukin-12 (p40)) (n = 4, 7), IL-5 (Interleukin-5) (n = 4, 5), IL-3 (Interleukin-3) (n = 4, 7), IL-1 β (Interleukin-1 β) (n = 4, 6), IL-1 α (Interleukin-1 α) (n = 4, 8), IL-4 (Interleukin-4) (n = 4, 7), IL-2 (Interleukin-2) (n = 4, 7), IL-9 (Interleukin-9) (n = 4), G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) (n = 4, 7), GM-CSF(Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) (n = 4, 7), CXCL1 (Chemokin (C-X-C motif)-Ligand 1/KC) (n = 5, 6), CCL5 (C-Chemokin-Ligand 5/Rantes) (n = 5, 6). Die Daten sind als Mittelwerte ± SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test.

3.13 Auswirkung der HAS2 auf die zirkulierenden Immunzellen im Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz

Im progredienten Krankheitsverlauf von Adipositas und Diabetes werden Veränderungen der Immunzellfunktionen beobachtet [216]. Eine periphere Leukozytose indiziert bekanntlich das Fortschreiten einer systemischen Stoffwechselstörung [115]. Im Allgemeinen dient das Blutsystem als Basis für das Verständnis zahlreicher zellulärer Komponenten in Verbindung mit ihrer Physiologie und Pathogenese [128]. Inwieweit die Diät-induzierten Inflammationsreaktion ebenfalls durch HA reguliert wird, sollte anhand von durchflusszytometrischen Analysen der zirkulierenden myeloiden sowie lymphoiden Immunzellen von prä-diabetischen *Has2-Knockout*-Mäusen und entsprechenden WT-Kontrollen untersucht werden. Das entsprechende *Gating*-Schema ist im Appendix zu finden.

Im vorliegenden Experiment konnte nach 9-wöchiger Fütterung kein signifikanter Einfluss von HAS2-synthetisierter HA auf die Immunzellpopulationen im Blut aufgezeigt werden (s. Abbildung 29). Dargestellt sind hier nur die relativen Zellzahlen, normiert auf CD45⁺ Leukozyten. Alleinig eine Tendenz ist in den erhobenen Daten ersichtlich. Speziell die Monozyten-Subtypen waren tendenziell reguliert (e, f), wobei insbesondere CD45⁺CD115⁺Ly6C^{+high} Monozyten (f) vermehrt im Blut der *Has2*-defizienten Tiere zirkulierten. Sonstige Effekte blieben aus (a, b, c).



Abbildung 29: HAS2 hat einen marginalen Einfluss auf die periphere Immunzellantwort in der Zirkulation prä-diabetischer Mäuse.

Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen in der Zirkulation von *Has2-Knockout* (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) (n = 9). Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **a**, CD45⁺ Leukozyten, **b**, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁻ Lymphozyten, **c**, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen, **d**, CD45⁺CD11b⁺CD115⁺ Monozyten sowie der Monozyten-Subtypen **e**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{+low} und **f**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{+high} verwendet. Dargestellt ist die Anzahl der positiven Zellen, normiert auf CD45⁺ Leukozyten. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test;* * p ≤ 0,05.

3.14 Auswirkung der HAS2 auf die periphere Immunantwort der Milz im Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz

Zur weiteren Spezifizierung der systemischen Entzündungsreaktion wurde die extramedulläre Hämatopoese mittels durchflusszytometrischer Analysen der Milz untersucht (s. Abs. 2.2.11.3). Da im Blut keine signifikanten Unterschiede in den Immunzellen nachweisbar waren (vgl. Abbildung 29), sollte anhand der Milz als größtes sekundäres lymphatisches Organ [217] validiert werden, ob HAS2-abgeleitete HA Veränderungen in der peripheren Immunantwort während der chronischen Diabetesprogression induziert. Das entsprechende *Gating*-Schema ist im Appendix zu finden.

Dazu wurde die Milz von Has2-Knockout-Mäusen und entsprechenden WT-Kontrollen 9 nach Wochen diabetogener Fütterung entnommen, präpariert und durchflusszytometrisch charakterisiert. Das Milzgewicht in mg differierte nicht zwischen den Genotypen (vgl. Abbildung 30 (a)). Analog zu den Befunden im Blut konnten auch in der Milz keine signifikanten Effekte der einzelnen Immunzellsubtypen im Vergleich von Has2-Knockouts und WT festgestellt werden. Weder pro mg Milzgewebe (b-e) noch prozentual (f-i). Auch die Subpopulationen der lymphoiden Zellen (B- und T-Lymphozyten) blieben gegenüber der Kontrolle unverändert. Lediglich beim Anteil der B-Lymphozyten (in % der Lymphozyten) zeigte sich ein Trend zur Erhöhung (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 30: HAS2 hat keinen Einfluss auf die extramedulläre Hämatopoese in der Milz prä-diabetischer Mäuse.

Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen in der Milz von *Has2-Knockout* (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) (n = 4, 7). **a**, Milzgewicht (mg). Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **b**, CD45⁺ Leukozyten, **c**, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen, **d**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten und **e**, CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten verwendet. **f**, CD45⁺ Leukozyten, **g**, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophile, **h**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten und **i**, CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten, dargestellt als Anzahl positiver Zellen, normiert auf CD45⁺ Leukozyten. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test*.

Die Ergebnisse unterstützen somit die Hypothese, dass HA eine Schlüsselfunktion bei der Hämatopoese im Knochenmark besitzt, obgleich die periphere Inflammationsreaktion in Blut und Milz nach Diät-induzierter Adipositas und fehlreguliertem Glukosestoffwechsel nicht HA-vermittelt zu sein scheint.

3.15 Auswirkungen eines *Has2*-Mangels auf Knochenparameter bei Diät-induzierter Adipositas und Glukoseintoleranz

Im Knochenmark besteht ein Konkurrenzgleichgewicht zwischen der MSZ-Differenzierung in Adipozyten und Osteoblasten [56]. Wie in Abschnitt 1.3.2 dargelegt, unterliegt die molekulare Regulation der Zelldifferenzierung einem Zusammenspiel komplexer Signalwege und Transkriptionsregulatoren.

Hyperglykämie beeinflusst maßgeblich die Adipogenität der MSZ, resultierend in der Begünstigung des Knochenverlusts [218]. Das Ausmaß der HA-Einwirkung auf die Osteoblastogenese innerhalb der Knochenmarknische ist daher Gegenstand der nachstehenden Analysen. Lange Röhrenknochen (Femur und Tibia) von 9-wöchig DDgefütterten Has2-Knockout-Mäusen und WT-Kontrollen wurden mittels µCT gescannt und die Alteration der Knochenmasse charakterisiert (vgl. Abs. 2.6). Dabei zeigten Has2defiziente Mäuse einen ausgeprägten trabekulären Knochenverlust (vgl. Abbildung 31). Besonders im Femur der Tiere konnte ein veränderter Knochenphänotyp nachgewiesen werden. Eine signifikante Abnahme der Knochenmineraldichte (KMD) (b) konnte mit Reduktion verschiedener trabekulärer Knochenparameter einer (c) wie Knochenvolumen pro (KV/GV), Gesamtvolumen Trabekelanzahl (Tb.N) und Trabekelseparation (Tb.Sep) in Verbindung gebracht werden. Tendenziell konnte ein ähnlicher Phänotyp in der Tibia beobachtet werden. Signifikanzen zeigten sich jedoch lediglich im Hinblick auf die trabekuläre Separation des Knochens (d). Die kortikale Knochenmasse schien sowohl im Femur als auch in der Tibia beider Genotypen nicht zu variieren und werden im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt.



Abbildung 31: *Has2*-Defizienz fördert einen trabekulären Knochenverlust in den langen Röhrenknochen prä-diabetischer Mäuse.

a, Repräsentative Bilder für die μ CT-3D-Rekonstruktion des trabekulären Kompartiments von Femur sowie Tibia. Maßstab: 6 mm. **b**, Quantifizierung der Knochenmineraldichte (KMD) (g/cm3) im Femur von *Has2-Knockout* (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) (n = 3). Trabekuläre Knochenparameter wurden als Knochenvolumen pro Gesamtvolumen (KV/GV) (%), Trabekelanzahl (Tb.N) (1/mm) und Trabekelseparation (Tb.Sep) (mm) in Femur **c**, sowie Tibia **d**, verifiziert. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test;* * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01. Die Messungen erfolgten in Kooperation mit Frau Jessica Steinbart und Herrn Dr. Anton Windfelder des Instituts für diagnostische und interventionelle Radiologie und pädiatrische Radiologie, Gießen, Deutschland.

3.16 Einfluss der Diät-induzierten Adipositas auf das Körpergewicht sowie die Glukosetoleranz bei *Has1-*Defizienz *in vivo*

Vorarbeiten des Instituts legen nahe, dass sowohl HAS2 als auch HAS1 im Rahmen des Adipositas-vermittelten Fettzell-*Remodellings* von Relevanz sind. C57BL/6J-Mäuse zeigten eine maßgeblich erhöhte Expression der *Has1* und *Has2* mRNA in WAT und BAT nach Verabreichung der DD (Daten noch nicht veröffentlicht). Auf dieser Grundlage erscheint die Untersuchung der mechanistischen Funktion von HAS1 auch im BMAT relevant und vielversprechend.

Nach 7 Wochen DD-Fütterung konnte ein signifikanter Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen den Genotypen festgestellt werden. *Has1-Knockout-*Mäuse zeichneten sich durch eine signifikant geringere Gewichtszunahme aus (s. Abbildung 32 (a)). Unter Verwendung einer Standard Chow-Diät konnte auch für die *Has1-*defiziente Mauslinie erfolgreich bestätigt werden, dass die Gabe von DD einen adipösen Phänotyp erzeugt. Nachfolgend bildet der Genotypen-Vergleich DD-gefütterter Tiere die Basis sämtlicher Experimente.

Charakteristisch für den Zustand des Prä-Diabetes ist ein gestörter Glukosestoffwechsel sowie eine verminderte Insulinsensibilität. Mit Hilfe von intraperitonealen Glukosetoleranztests nach 3, 6 und 9 Wochen sollte zusätzlich der Effekt der DD auf den Glukosestoffwechsel und die systemische Glukosetoleranz validiert werden (c, d, e). Zu keinem der gewählten Zeitpunkte konnte ein Unterschied im Glukosestatus zwischen *Has1-Knockout* und WT-Kontrollen nachgewiesen werden. Ebenso konnte keine Auswirkung auf die Insulinsekretion im Plasma der jeweiligen Genotypen ausgemacht werden (b). Somit scheint der ubiquitäre *Has1-Knockout* negativ mit dem Körpergewicht der Mäuse assoziiert zu sein, während ein Unterschied in der Glukosetoleranz zwischen den Genotypen ausblieb.





13 Wochen alte *Has1*-Knockout (KO)-Mäuse sowie Wildtyp (WT)-Kontrollen wurden mit einer diabetogenen Diät (DD) über einen Zeitraum von 9 Wochen gefüttert. Die Fütterung der *Has1*-KOs anhand einer Chow-Diät diente als zusätzliche Kontrolle. **a**, Körpergewicht in Gramm (g) (n = *Has1*-WT 15, *Has1*-KO 16, *Has1*-KO Chow 1). **b**, Plasmainsulinspiegel (ng/ml) nach 9 Wochen DD im Vergleich der Genotypen (n = 8, 9). Intraperitonealer Glukosetoleranztest (mg/dl) nach **c**, 3 Wochen (n = *Has1*-WT 11, *Has1*-KO 8, *Has1*-KO Chow 1), **d**, 6 Wochen (n = *Has1*-WT 6, *Has1*-KO 11, *Has1*-KO Chow 1) und **e**, 9 Wochen (n = *Has1*-WT 15, *Has1*-KO 16, *Has1*-KO Chow 1). Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Zweifache ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; ungepaarter *Student's t-Test;* * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01.

3.17 Einfluss von HAS1 auf die Adipogenese im Knochenmark in vitro

Im Weiteren sollte geklärt werden, ob die adipogene Differenzierung *in vitro* im Rahmen eines genetischen *Has1*-Defizits einer Veränderung unterliegt. Zu diesem Zweck wurden Prä-Adipozyten aus stromal-vaskulären Zellen der Tibia von *Has1-Knockout*-Mäusen und entsprechenden WT-Kontrollen isoliert, nach dem beschriebenen Standardprotokoll differenziert und zu verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich der Lipidakkumulation mittels Öl Rot-Färbung untersucht (s. Abs. 2.7).

In der Tat zeigten *Has1*-defiziente Mäuse weder nach Induktion der Adipogenese noch während der 10-tägigen Adipozytendifferenzierung relevante Modifikationen (vgl. Abbildung 33).



Abbildung 33: Adipogene Differenzierung der stromal-vaskulären Knochenmarkfraktion in primäre Prä-Adipozyten ist nicht HAS1-vermittelt.

Quantifizierung von Prä-Adipozyten des Knochenmarks mittels Öl Rot-Intensität (Absorption bei 492 nm) im Verlauf von 10 Differenzierungstagen (dx) (n= 3) von 13 Wochen *Has1-Knockout* (KO)-Mäusen sowie entsprechender Wildtyp (WT)-Kontrollen. Zweifache ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest.

3.18 Einfluss von HAS1 auf den Energiestoffwechsel des Knochenmarkfettgewebes im Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz

Um die Bedeutung von HAS1 auch im Kontext des prä-diabetischen cMAT-Energiestoffwechselprogramms zu evaluieren, wurden sowohl *Has1-Knockout*-Mäuse als auch die entsprechenden WT-Kontrollen über einen Zeitraum von 9 Wochen mit DD gefüttert und ein Stoffwechselprofil beider Genotypen mittels Mito-Stress-Test am XF24 Extracellular Flux Analysator erstellt. Wie in Kapitel 2.4 erörtert, basiert die Erzeugung unterschiedlicher Stoffwechselzustände in den Zellen auf der Zugabe verschiedener chemischer Verbindungen und der anschließenden Bewertung der respiratorischen Funktionsfähigkeit. Mit Hilfe des Tests können sowohl Aussagen über die OCR als auch über die ECAR getroffen werden. Im Anschluss an die 9-wöchige Fütterungsperiode wurde das cMAT isoliert und für weitere Analysen aufbereitet.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei *Has2*-Defizienz (vgl. Abbildung 21) konnten nur marginal HAS1-vermittelten Effekte im Kontext der Stoffwechselaktivität validiert werden (Abbildung 34 (a)). Weder die OCR-Parameter der basalen (b) noch der nichtmitochondrialen (d) Atmungsaktivität zeigten eine signifikante Veränderung des respiratorischen Potentials im Vergleich der Genotypen unter prä-diabetischen Bedingungen. Einzig eine Tendenz einer höheren maximalen OCR war erkennbar (c). Hinzukommend wurden keine ECAR-Auswirkungen beobachtet (Daten nicht dargestellt).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass HAS2, nicht aber HAS1, einen signifikanten Einfluss auf die dynamische Physiologie und Funktion der BMAds hat.



Abbildung 34: Moderate Wirkung von HAS1 auf die Stoffwechselaktivität des konstitutiven Knochenmarkfettgewebes unter prä-diabetischen Bedingungen.

Metabolische Analyse des konstitutiven Knochenmarkfettgewebes (constitutive marrow adipose tissue, cMAT) aus Has1-Knockout (KO)-Mäusen oder entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen mittels Seahorse XFe Analysators nach 9-wöchiger Fütterung einer diabetogenen Diät (DD). Messung der a, zellulären Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate, OCR) (pmol/min) Oligomycin nach Injektion von 1.25 μM (1), 3 μM Carbonylcyanid-Ptriflouromethoxyphenylhydrazon (FCCP) (2) und einer Mischung aus 10 µM Rotenon und 3 µM Antimycin (3). b, Basale Respiration (pmol/min), c, maximale Respiration (pmol/min) und d, nicht-mitochondriale Respiration (pmol/min) im cMAT. Zur Normalisierung wurden alle experimentellen Daten mit einem Faktor (((Gewebe (mg)/Knochen (mg))/Knochenlänge (cm)) x 100) normiert. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Zweifache ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; ungepaarter Student's t-Test; * $p \le 0.05$; n = 3 entspricht 6 biologischen n).

3.19 Einfluss von HAS1 auf das Stammzell-/Immunzellreservoir im Knochenmark nach Induktion von Adipositas und Glukoseintoleranz

In Analogie zu den bisherigen Experimenten an C57BL/6J- sowie *Has2*-defizienten Tieren soll im weiteren Verlauf die Rolle der HAS1 in der hämatopoetischen Knochenmarknische erforscht werden. Hierzu wurden hämatopoetische Stamm- und Immunzellen von prä-diabetischen *Has1-Knockout*-Mäusen sowie entsprechenden WT-Kontrollen durchflusszytometrisch charakterisiert.

Mäuse beider Genotypen wurden über einen Zeitraum von 9 Wochen mit DD gefüttert, anschließend das Knochenmark isoliert und mit den in Tabelle 4 aufgeführten Antikörpern gefärbt. Entsprechend der Analyse der zuvor verwendeten Mauslinien wurde das regulatorische und das konstitutive Knochenmark separiert, um sowohl die Auswirkungen der HAS1-synthetisierten HA auf die zelluläre Immunantwort als auch die Rolle der HA-reichen BMAds im hämatopoetisch aktiven Knochenmark zu identifizieren. Nachfolgend werden die durchflusszytometrischen Analysen sowohl der HSZ als auch der myeloiden/lymphoiden Immunzellen der jeweiligen Subtypen (rMAT und cMAT) dargestellt. Bezogen auf das rMAT wurden nur die Messungen der myeloiden/lymphoiden Immunzellen angefertigt. Die entsprechenden Gating-Schemata sind im Appendix zu finden.

Allerdings konnten hierbei keine signifikanten Divergenzen in allen HSZ-Populationen im cMAT beider Genotypen beobachtet werden (vgl. Abbildung 35 (I & II)). Weder die frühe Differenzierungsphase der Lin⁻ HSZ (a) noch die späteren Differenzierungsstadien der LSK⁺ (b-f) und Sca-1⁺cKit⁺ myeloiden Vorläuferzellen (g-i) differierten zwischen den Genotypen.

Daraus lässt schließen, dass die hämatopoetische Differenzierung im cMAT nicht durch HAS1-abgeleitete HA reguliert wird.



Abbildung 35: Die hämatopoetische Differenzierung im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe ist nicht HAS1-vermittelt.

Durchflusszytometrische Analyse von HSZ im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe (*constitutive marrow adipose tissue*, cMAT) von *Has1-Knockout* (KO)-Mäusen oder entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) (n = 4, 7). Liniendifferenzierende Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **a**, liniennegativen (Lin⁻) Zellen, **b**, LSK⁺ (Lin⁻Sca-1⁺Kit⁺) Zellen **c**, CD34⁻ Langzeit; *long term* (LT)-HSZ, **d**, CD34⁺ Kurzzeit; *short term* (ST)-HSZ, Multipotente Progenitorzellen (MPP) **e**, Typ 2 **f**, und Typ 3 & 4, **g**, myeloide Vorläuferzellen; *common myeloid progenitors* (CMP), **h**, Vorläufer für Granulozyten und Makrophagen; *granulocyte/macrophage progenitors* (MEP). Dargestellt ist sowohl die **I**) absolute als auch die **II**) prozentuale (%) Anzahl lebender Zellen (**a**, **b**), LSK⁺ Zellen (**c-f**) oder Sca1⁻ cKit⁺ myeloider Vorläuferzellen (**g-i**). Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test.*

3.19.1 Analyse von Immunzellen in den Fettsubtypen prä-diabetischer Has1-Knockout-Mäuse

Weiterhin wurde eruiert, inwieweit die genetische Deletion von *Has1* die Diabetesinduzierte Immunzellverschiebung im Knochenmark moduliert (vgl. Abs. 1.3.4). Keine der analysierten Populationen – basierend auf CD45⁺ Leukozyten (a, e), CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen (b, f), CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten (c g) und CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten (d h) – im cMAT zeigte signifikante Unterschiede zwischen WT und *Has1*-defizienten Tieren (s. Abbildung 36).



Abbildung 36: Die Immunzell-vermittelte Entzündungsantwort des konstitutiven Knochenmarkfettgewebes unter prä-diabetischen Bedingungen wird nicht durch HAS1 reguliert.

Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen im konstitutiven Knochenmark (*constitutive marrow adipose tissue*, cMAT) von *Has1-Knockout* (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) (n = 8, 4). Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **a**, CD45⁺ Leukozyten, **b**, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen, **c**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten und **d**, CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten verwendet. **e**, CD45⁺ Leukozyten, **f**, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophile, **g**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten und **h**, CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten, dargestellt als Anzahl positiver Zellen, normiert auf CD45⁺ Leukozyten (n = 8, 3). Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test.*
Ferner zeigte sich kein Effekt im Genotypenvergleich unter prä-diabetischen Bedingungen hinsichtlich der Immunzell-vermittelten Entzündungsantwort im rMAT (vgl. Abbildung 37 (a-h)).





Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen im regulatorischen Knochenmark (regulative marrow adipose tissue, rMAT) von Has1-Knockout (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) (n = 7, 7). Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung CD45⁺ Leukozyten, von а, CD45+CD11b+Ly6G+ Neutrophilen, C, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten b, und d, CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten verwendet. e, CD45⁺ Leukozyten, f, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophile (n = 7, 6), **g**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten und **h**, CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten, dargestellt als Anzahl positiver Zellen, normiert auf CD45⁺ Leukozyten. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test.

3.20 Auswirkung der HAS1 auf die zirkulierenden Immunzellen im Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz

Das zelluläre Immunsystem ist maßgeblich an der Krankheitsentstehung von Adipositas und T2DM beteiligt. In welchem Ausmaß die pathologische Entzündungsreaktion, die durch eine diätetisch induzierte Stoffwechselentgleisung hervorgerufen wird, ebenfalls durch HAS1-induzierte HA reguliert ist, sollte anhand von durchflusszytometrischen Analysen der zirkulierenden Immunzellen von diabetogenen *Has1-Knockout*-Mäusen und entsprechenden WT-Kontrollen untersucht werden.

Dargestellt sind hier die relativen Zahlen, normiert auf die Gesamtzellzahl bzw. CD45+ Leukozyten. Ein signifikanter Einfluss von HAS1 auf die Immunzellpopulation im Blut konnte nach 9 Wochen Fütterung in den CD45⁺ Leukozyten (% Lebendzellen) festgestellt werden, gekennzeichnet durch eine signifikante Reduktion der CD45⁺ Leukozyten bei Has1-Mangel (Abbildung 38 (a)). Weitere Effekte in den analysierten Immunzelltypen blieben jedoch aus (b-e). Auch Abweichungen in den Absolutwerten der Zellpopulationen – basierend auf CD45⁺ Leukozyten, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen, CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten sowie den Monozyten-Subtypen - konnten nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das entsprechende Gating-Schema ist im Appendix zu finden.



Abbildung 38: HAS1 hat einen marginalen Einfluss auf die periphere Immunzellantwort in der Zirkulation prä-diabetischer Mäuse.

Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen in der Zirkulation von *Has1-Knockout* (KO)-Mäusen und entsprechenden Wildtyp (WT)-Kontrollen nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) (n = 6, 9). Oberflächenmarker wurden zur Quantifizierung von **a**, CD45⁺ Leukozyten, **b**, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen, **c**, CD45⁺CD11b⁺CD115⁺ Monozyten sowie die Monozyten-Subtypen **d**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{+low} und **e**, CD45⁺CD11b⁺Ly6C^{+high} nach 9-wöchiger Fütterung mit diabetogener Diät (DD) verwendet. Dargestellt ist die Anzahl der positiven Zellen, normiert auf CD45⁺ Leukozyten. Die Daten sind als Mittelwert ± SD angegeben. Ungepaarter *Student's t-Test;* * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung einer spezifischen HA-reichen EZM im BMAT und die Identifizierung möglicher funktioneller Anpassungsreaktionen im Kontext des BMAT-Substratstoffwechsels und der Hämatopoese in der prä-diabetischen Phase. Das beschriebene Mausmodell zur Induktion von Adipositas und Glukoseintoleranz bzw. IR wurde in C57BL/6J und verschiedenen *Has*-defizienten Mäusen eingesetzt. Einerseits zur Charakterisierung des Fettdepots als integralem Bestandteil der Knochenmarknische, andererseits zur systematischen Untersuchung des HA-Systems im Knochenmarkstroma im progredienten Verlauf des Prä-Diabetes. Die Thematik des Einflusses der HA auf die Adipozyten im Knochenmark unter prädiabetischen Bedingungen wird sukzessive auf der Grundlage der erzielten Ergebnisse diskutiert.

In eigenen Vorarbeiten wurde ein Modell der Adipositas sowie Glukoseintoleranz bzw. IR validiert. Hierzu wurde männlichen C57BL/6J-Mäusen eine zucker- und fettreiche Diät, DD, verabreicht. Konsistent mit der Literatur entwickelten die Tiere nach mehrwöchiger DD-Fütterung neben einem adipösen Phänotyp eine Glukoseintoleranz korrelierend mit einer IR [202]. Diese Daten werden in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt.

In der Tat ist ein geeignetes Tiermodell von großer Tragweite, um die metabolische Grundlagenforschung mit der klinischen Situation zu verbinden. In diätetisch Mäusen konnten bereits zuvor humantypische prä-diabetische Pathologien wie eine gestörte Insulinsensitivität, Hyperlipidämie und eine geringgradige chronische Inflammation nachgewiesen werden [202]. Für die Untersuchung der frühdiabetischen Stoffwechsellage stellt das verwendete Mausmodell somit eine adäquate Methode dar [203] und bildet die Grundlage für die in der Folge durchgeführten Versuche.

4.1 Dysregulation des Knochenmarkstromas in prä-diabetischen C57BL/6J-Mäusen

Die Integration des Immunsystems im Hinblick auf metabolische Störungen wurde bereits eingangs unter Punkt 1.3.4 dargestellt. Die Frage, inwieweit die Fettgewebe-SVF des Knochenmarks einer Veränderung durch den chronischen Inflammationsreiz des Prä-Diabetes unterworfen ist, sollte im Folgenden adressiert werden.

Dazu wurden Stamm- und Immunzellen des Knochenmarks von C57BL/6J-Mäusen durchflusszytometrisch charakterisiert. Nach Induktion des pathogenen Phänotyps durch 9-wöchige Fütterung der DD erfolgte die subtypspezifische Analyse (vgl. Abs. 2.2.11.2).

Entgegen den Erwartungen schien die Stammzelldifferenzierung im hämatopoetisch aktiven rMAT nur marginal prä-diabetisch moduliert zu sein. Lediglich eine relative Zunahme von CD34⁻ LT-HSZ konnte im rMAT prä-diabetischer Tiere verzeichnet werden – kennzeichnend für eine langfristige Repopulationsaktivität des Gewebes [219]. Aufgrund der bekannten pro-myeloischen Immunzellverschiebung bei Anomalien des metabolischen Spektrums wurde jedoch weiterhin eine funktionelle Regulation reiferer Vorstufen wie der CMP vermutet (s. Abbildung 8). Dass die relative CMP-Anzahl im DD-rMAT tendenziell erhöht ist, konnte hier unterstützend nachgewiesen werden. Dies könnte ebenfalls den signifikanten Anstieg differenzierter Immunzellen wie CD45⁺ Leukozyten, CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺ Neutrophilen und CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten erklären (vgl. Abbildung 11).

In Summe konnte eine diätetisch induzierte Hyperzellularisierung des Knochenmarks in Form von Neutrophilie und Monozytose beobachtet werden. Es bleibt zu untersuchen, ob dieses Phänomen parallel die Lymphopoese beeinträchtigt. Obgleich die Anzahl der CD45⁺CD11b⁻Ly6G⁻ Lymphozyten fütterungsbedingt anstieg, blieb der prozentuale Anteil dieser an den Gesamtleukozyten unverändert, zumal die Effekte auf die myeloiden Zellen gravierender ausfielen. Die bisherige Auffassung einer zellulären Dysbalance zugunsten der myeloiden Zellreihe im Rahmen der sich ausbildenen Glukoseintoleranz und Adipositas konnte durch die hier generierten Daten grundsätzlich bestätigt werden. Um das Ausmaß der chronischen Inflammation im Detail definieren zu können, würde sich die Verwendung zusätzlicher durchflusszytometrischer Marker zur Untersuchung lymphoider Stamm- und Progenitorzellen anbieten. Ungeachtet der Tatsache, dass die molekularen Mechanismen, die die Plastizität der Adipozyten im Knochenmark regulieren, noch nicht gänzlich entschlüsselt sind, gilt die immunzellvermittelte Inflammation im Fettgewebe als elementarer Treiber [115]. In einem nächsten Schritt wurde daher untersucht, inwiefern die adipozytäre Transformation des prä-diabetischen Knochenmarks die Funktionalität der Hämatopoese beeinflusst. Wie in Kapitel 1.3.5.1 thematisiert, wird postuliert, dass eine überproportionale Markadipogenese mit einem hypozellulären hämatopoetischen Milieu und verschiedenen Nischendysfunktionen einhergeht [49]. In Analogie zum rMAT wurden sowohl Stamm- als auch Immunzellen im fettreichen cMAT von DD-gefütterten C57BL/6J-Mäusen und ihren Kontrollen charakterisiert. Bemerkenswerterweise zeigten sich dabei wesentliche Unterschiede zwischen den Behandlungen. Die adipozytäre SVF schien primär das frühe Differenzierungsstadium der HSZ zu modulieren. Sowohl die Anzahl der Lin⁻ als auch der LSK⁺ Zellen korrelierte negativ mit dem pathogenen Phänotyp der Mäuse. Das beschriebene Phänomen wurde bereits früher beobachtet. In einer experimentellen Studie von Naverias et al., 2009 wurde das adipozytenreiche Knochenmark mit einer geringeren HSZ-Anzahl in Verbindung gebracht. Ausschlaggebend war hier primär die funktionell reduzierte Anzahl der ST-HSZ. Begründet lag dies einerseits in einer vermehrten BMAd-vermittelten Sekretion von Inhibitoren der Hämatopoese in vitro. Andererseits konnte durch mechanistische Zellzyklusanalysen im murinen Knochenmark der Schwanzwirbelkörper eine Reduktion der Vorläuferkompartimente beobachtet werden [99].

Im prä-diabetischen cMAT stieg der relative CMP-Anteil signifikant an – konträr zur beobachteten Abnahme der Hämatopoese (vgl. Abbildung 10). Infolgedessen sollte validiert werden, inwieweit die Prä-Diabetesinduktion ein pro-myeloides Differenzierungsschicksal im cMAT moduliert. Tatsächlich ergaben die Auswertungen einen signifikanten Anstieg von CD45⁺CD11b⁺Ly6C⁺ Monozyten nach Fütterung der DD (vgl. Abbildung 12). Weitere Studien sind notwendig, um zu klären, welcher Monozyten-Subtyp im cMAT dominiert.

Die ausgeprägte Sekretionsfähigkeit der BMAds wurde bereits in Kapitel 1.3.3.4 resümiert. Die erhöhte Immunzellanzahl könnte in diesem Fall auf die hohe endokrine Aktivität des Fettdepots zurückzuführen sein. Dabei ist zu beachten, dass ein spezifisches BMAT-Zytokin-Profil bisher nicht definiert ist. Durchaus denkbar ist, dass entzündungsfördernde Zytokine auch im stromalen cMAT eine Schlüsselrolle einnehmen. Um diese These zu prüfen, wurde der sekretorische Charakter des cMAT-Überstands bestimmt (vgl. Abs. 2.2.9). Nachweislich ergab sich ein signifikanter

Anstieg von MIP-1 β im konditionierten Überstand prä-diabetischer Mäuse. Das proinflammatorische MIP-1 β gehört zur Unterfamilie der CC-Chemokine, die hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen sezerniert werden und eng mit der Entwicklung vieler inflammatorischer Erkrankungen assoziiert sind [220]. Es scheint somit plausibel, dass der aufgeführte Mediator ähnlich wie im WAT einen pathologischen Status des Markfetts begünstigt. Dabei korrespondiert eine erhöhte Produktion chemotaktischer Zytokine mit der Rekrutierung multipler Entzündungszellen [22]. In diesem Zusammenhang wurde schon im Kapitel 1.3.4 auf Monozyten und Monozyten-differenzierte Makrophagen als Hauptakteure im Entzündungsgeschehen hingewiesen. Zur Verifizierung einer möglichen Gewebeinfiltration könnte z.B. eine histologische Makrophagenfärbung im BMAT angestrebt werden.

In der Summe scheint nicht nur die physiologische, sondern auch die funktionelle Heterogenität des Knochenmarks von C57BL/6J-Tieren im Rahmen des Prä-Diabetes einer Veränderung zu unterliegen. Grundsätzlich suggeriert eine erhöhte Markadipogenese infolge der DD einen direkten Einfluss der Adipozyten auf die hämatopoetische Potenz. Die generierten Daten weisen grundsätzlich auf BMAds als kritische Knochenmarkregulatoren hin. Bisher wurde nicht weiter untersucht, in welcher Weise die hämatopoetische Aktivität direkt oder indirekt durch die ausgeprägte BMAT-Plastizität im stromalen Milieu reguliert wird. Ein fortführender Ansatz besteht hier primär in der Ko-Kultivierung von BMAds und hämatopoetischen Zellen *in vitro*, um einen Einfluss der BMAds z.B. auf die Sekretion inflammatorischer Zytokine durch Immunzellen validieren zu können.

4.2 Charakterisierung der HA im Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen

Diverse Studien legen nahe, dass HA im weißen [169] und braunen [28] Fettgewebe funktionelle Eigenschaften bei der Regulation des Stoffwechsels besitzt. Um Anhaltspunkte für das Vorkommen einer HA-reichen EZM im BMAT zu gewinnen, wurden verschiedene Analysen in C57BL/6J-Mäusen durchgeführt. Dies ist insbesondere relevant, da derzeit keine Studie die Präsenz sowie die Rolle des HA-Systems im BMAT adressiert hat.

Mittels histologischer Färbungen konnte HA erfolgreich im stromalen Knochenmark von prä-diabetischen C57BL/6J-Mäusen lokalisiert werden (s. Abbildung 15). Um die *Has*-Genexpression speziell im adipozytenreichen cMAT zu bestätigen und einen möglichen Einfluss des prä-diabetischen Stadiums auf das HA-System zu untersuchen, wurde die mRNA-Expressionsverteilung der *Has* mittels Primereffizienz-Assay basal und nach 9-wöchiger DD-Fütterung *in vivo* analysiert. Die einleitend zitierten Publikationen zeigen, dass die HA-Synthese nicht nur während der Differenzierung von 3T3-L1-Zellen in Prä-Adipozyten *in vitro* hochreguliert wird [195, 196, 210], sondern, dass *Has2* an der Regulation der Adipogenese gravierend beteiligt ist. So wurde bereits ein Anstieg der *Has2*-mRNA während der mitotischen klonalen Expansion von 3T3-L1-Zellen beschrieben [195], gleichzeitig wirkte eine Abnahme der *Has2* anti-adipogen [198].

In diesem Sinne bekräftigten erste Vorarbeiten *in vitro* HAS2 als Hauptisoform in primären Prä-Adipozyten von C57BL/6J-Mäusen. Gleichermaßen konnte *in vivo* eine hohe Expression der *Has2*-mRNA im cMAT unter Basalbedingungen detektiert werden, wogegen die *Has3*-mRNA im späten Stadium der Diät-induzierten Adipositas primär detektiert wurde (vgl. Abbildung 15). Diese Erkenntnisse decken sich partiell mit den Resultaten im WAT und BAT des Instituts, die zeigten, dass HAS2 die dominante Isoform ist, während *Has1* ebenfalls in beiden Geweben nachweisbar war und prä-diabetisch reguliert wurde (Daten unveröffentlicht). Die *in vivo* Daten ergänzend, konnte *in vitro* eine inhibierte Adipozytendifferenzierung der stromalen Knochenmarkzellen nach einem *Knockout* von *Has2* einen pro-adipogenen Effekt der HA sichtbar machen (vgl. Abbildung 20). Der *Knockout* von *Has1* im Rahmen der Differenzierung *in vitro* zeigte hingegen keinen Effekt (vgl. Abbildung 33).

Ferner konnte in Maus- und Humanstudien der Stellenwert von CD44 in der Stoffwechselregulation aufgezeigt werden. So ist eine erhöhte HA-Rezeptorexpression

mit morphologischen und pathologischen Anpassungsreaktionen des WAT assoziiert – gekennzeichnet durch Hypertrophie, Inflammation und systemische IR des stromalen Gefäßkompartiments [221, 222]. Darüber hinaus unterdrückte eine CD44-Deletion die Entwicklung einer Adipositas vermittelten IR [221, 222] sowie eine Entzündung im Fettgewebe [214]. Interessanterweise fanden u.a. die Autoren um Liu *et al.* 2015, dass CD44 spezifisch auf Fettgewebsmakrophagen exprimiert wird, was suggeriert, dass der Hauptort der CD44-Expression im Adipozytenstroma liegt [223]. In diesem Kontext belegten Kodama *et al.*, 2015 die Theorie: Die Neutralisierung von CD44 in residenten Makrophagen wurde mit einer reduzierten Fettgewebsentzündung und einer verbesserten Insulinsensitivität in Verbindung gebracht [222].

Zur systematischen Charakterisierung des BMAT-HA-Systems *in vivo* wurden nachfolgend CD44-Genexpressionsanalysen herangezogen. Morphologisch ähneln reife cMAds den Adipozyten des peripheren WAT [48, 130] (vgl. Abbildung 1), wodurch eine vergleichbare Physiologie und Funktion der BMAT-EZM vermutet werden kann. Abweichend von der Erwartung einer pathologischen Transformation analog zum WAT, die zu einer Überexpression von CD44 führt, zeigte sich im cMAT nach 9 Wochen Fütterung eine signifikante Herunterregulation von *Cd44* (vgl. Abbildung 16). Diese Befunde stimmen mit vorläufigen *in vitro* Arbeiten überein, die eine inverse Korrelation zwischen CD44 und der adipogenen Differenzierung des Knochenmarkstromas aufwiesen. Während also erhöhte Mengen CD44 im WAT mit IR und Inflammation des Fettgewebes korrelieren, gehen Diät-induzierte Adipositas und Glukoseintoleranz bzw. IR mit einer verminderten CD44-Expression im BMAT einher.

Zur Evaluation einer möglichen Interaktion zwischen HA und CD44 während der Adipogenese wurde die Knochenmark-SVF aus C57BL/6J-Mäusen isoliert und die HA-Bindungsfunktion von CD44 24 h vor der adipogenen Differenzierungsinitiierung mit einem spezifischen Antikörper neutralisiert (vgl. Abs. 2.7.3). Die Blockade der HA-Bindungsdomäne hatte eine signifikante Beeinträchtigung der Differenzierung der primären Prä-Adipozyten nach 6 Tagen zur Folge (vgl. Abbildung 17).

Es lässt sich also schlussfolgern, dass HA nicht nur im BMAT existent ist, sondern dass die HA-reiche EZM der BMAds auch eine funktionelle Rolle bei progressivem Prä-Diabetes erfüllt. Während die Rolle des HA-Systems im WAT intensiv erforscht wurde, ist über die adaptiven Fähigkeiten des BMAT in diesem Kontext eher wenig bekannt. Insgesamt kann hier jedoch von einer Beteiligung von HA und ihrem Rezeptor CD44 an der Regulation der Adipogenese im prä-diabetischen Knochenmark ausgegangen werden.

4.3 Metabolischer Phänotyp von Has-defizienten Mäusen

In Anbetracht dessen, dass HA als kritischer Faktor der Differenzierung primärer Prä-Adipozyten *in vitro* fungiert, stellte sich die Frage, inwieweit sich ein genetischer Defekt der HA-Synthese *in vivo* auswirkt. Ein direkter HA-Effekt auf die Funktionalität des weißen und braunen Fettgewebes wurde bereits postuliert, wodurch eine ähnliche Modulation im BMAT angenommen wird.

Zur Charakterisierung eines metabolischen Phänotyps, der auf einem Beitrag des HA-Systems beruht, wurden verschiedene *Has*-defiziente Tiere herangezogen. Das etablierte Prä-Diabetes-Modell fand erneut Verwendung, wobei alle Tiere zur Induktion eines pathogenen Phänotyps über 9 Wochen hochkalorische DD erhielten (vgl. Abbildung 4).

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen begünstigte HAS1 im Gegensatz zu HAS2 eine Körpergewichtszunahme der Tiere. Ein Grund dafür könnte die kompensatorische Qualität von HAS2 sein. Dies entspräche der Literatur bezüglich eines anderen Zelltyps, den Fibroblasten. Basierend auf einer im Jahr 2014 publizierten experimentellen Arbeit an Mäusen resultierte eine Deletion der *Has1*- und 3 in einem *Has2*-mRNA-erhöhenden Kompensationsmechanismus [224].

Ein gestörter Glukosestoffwechsel und eine verminderte Insulinempfindlichkeit prägen den prä-diabetischen Zustand [12, 13] (vgl. Abs. 1.1). Weder *Has1-Knockouts* (vgl. Abbildung 32) noch *Has2-Knockouts* (vgl. Abbildung 18) wiesen Unterschiede hinsichtlich des Glukosestatus auf. Dies deckt sich mit bereits publizierten Arbeiten von Grandoch *et al.,* die zeigten, dass die Hemmung einer HAS allein nicht ausreicht, um den systemischen Stoffwechsel zu verändern. Positive metabolische Effekte konnten dagegen bei einem Doppel-*Knockout* der HAS2/HAS3 festgestellt werden [28].

Hier bestätigte allerdings die parallele Fütterung einer kalorienarmen Chow-Diät beider verwendeter Mauslinien die Effektivität des diätetischen Modells. In diesem Sinne ist anzunehmen, dass die Fütterung der DD sowohl einen adipösen als auch einen prädiabetischen Phänotyp aller Genotypen induzierte. In Konsens mit der Literatur scheint die HAS2-vermittelte HA-Synthese isoliert betrachtet keinen direkten Einfluss auf den systemischen Metabolismus zu haben.

Nichtsdestotrotz bildet HA einen zentralen Bestandteil des zellulären Knochenmarkmikromileus. Unterstützend zeigte eine nähere Betrachtung der Tibiae von *Has2*-defizienten Tieren sowie den entsprechenden WT-Kontrollen eine erhebliche

makroskopische Divergenz. Ein *Has2*-Mangel ist mit einem reduzierten Gehalt an adipozytenreichem cMAT assoziiert und korreliert positiv mit dem Körpergewicht der Tiere (vgl. Abbildung 19). Diese Erkenntnisse *in vivo* stehen im Einklang mit den zuvor verifizierten pro-adipogenen Eigenschaften der *Has2 in vitro*. Konsekutiv wird der funktionelle Aspekt von HA und ihrer modifizierten Synthese im Kontext der Heterogenität der Knochenmarknische erörtert und diskutiert.

4.4 Auswirkungen der HA auf den Energiestoffwechsel im Knochenmark

Gemäß Abschnitt 1.2 reguliert Fettgewebe als wichtiges metabolisches Organ die systemische Energiehomöostase. Eine direkte Assoziation zwischen Stoffwechselerkrankungen (z.B. T2DM) und der Funktion des Fettgewebes ist durch eine Vielzahl von Daten belegt. Ein dynamischer Umbauprozess der Adipozyten, der mit vielfältigen physiologischen und pathologischen Gewebeveränderungen einhergeht (vgl. Abs. 1.4), wird durch einen alternierenden Ernährungszustand, z. B. einem Kalorienüberschuss bei Adipositas, stimuliert. Während die zuvor beschriebenen Fettphänotypen des WAT und des BAT bereits intensiv erforscht wurden, ist über die Energieverwertung im BMAT im Kontext einer metabolischen Imbalance wenig bekannt. Abseits dessen konnte für BMAds eine adaptive Plastizität unter physiologischen und pathologischen Bedingungen dokumentiert werden, sodass auch hier eine ausgeprägte Stoffwechselaktivität des Gewebes prognostiziert wird (vgl. Abs. 1.3.3).

In der Folge wurde ein metabolisches Profil des cMAT erstellt. Um mögliche Auswirkungen von Veränderungen im systemischen Energiemetabolismus auf das Fettgewebe zu überprüfen, wurde das cMAT von 9 Wochen DD- oder Chow- gefütterten C57BL/6J-Mäusen mittels XF24 Extracellular Flux Analysators analysiert. Die Fütterung bewirkte jedoch keinerlei signifikante Unterschieden zwischen den Behandlungsgruppen (s. Abbildung 14). An dieser Stelle sollte angemerkt werden, dass die Datengenerierung im Rahmen der Methodenetablierung stattgefunden hat. Der sichtbare Trend einer reduzierten cMAT-Respiration unter prä-diabetischen Bedingungen würde wahrscheinlich durch eine Erhöhung der Probenzahl verdeutlicht. Wäre dies der Fall, so würden die Ergebnisse zunächst nicht mit dem in Kapitel 1.3.5.2 skizzierten Energieprofil der Adipozytenvorläuferzellen im Knochenmark übereinstimmen. Eine präferierte OxPhos adipogener Zellen [101], ein Phänomen, welches auch für 3T3-L1-Zellen beschrieben wurde [149], konnte u.a. von Tencerova und Mitarbeitern belegt werden.

Zudem ist unklar, welchem Substratmetabolismus das adipozytenreiche cMAT unterliegt. Basierend auf den Charakteristika brauner Adipozyten konnten in jüngster Zeit neue Erkenntnisse gewonnen werden. Wie bereits unter 1.2 angebracht, ist das Schlüsselprotein UCP1 ausschlaggebend für den BAT-spezifischen Prozess der zitterfreien Thermogenese [29], bei dem Energie in Form von Wärme aus FS erzeugt wird. Die Fähigkeit der BMAds zur UCP1-stimulierten Thermogenese blieb lange Zeit undefiniert, bis in einer Studie von Craft *et al.* erstmals die *Ucp1*-Expression im BMAT systematisch ausgeschlossen werden konnte [145]. Hinzu kommt die Tatsache, dass insbesondere im cMAT eine verminderte lipolytische Aktivität beschrieben wurde [82], wodurch eine thermogene Wirkungsweise ähnlich dem BAT ausgeschlossen werden kann. Bislang sind keine Studien bekannt, die eine charakteristische Energieverwertung im BMAT im diabetischen Stoffwechselkontext identifiziert haben.

Ob die HA wie im WAT und BAT auch im cMAT unter dem Einfluss des Glukosestoffwechsels steht, sollte nachfolgend untersucht werden. Dazu wurde sowohl in *Has1*- als auch in *Has2*-defizienten Tieren mittels DD ein prä-diabetischer Phänotyp induziert. Im Anschluss an eine 9-wöchige Fütterungsperiode wurde das cMAT der *Has-Knockouts* sowie der WT-Kontrollen für Analysen der metabolischen Aktivität verwendet.

Auf den Energiestoffwechsel des Gewebes schien die Has1-Defizienz allerdings nur moderaten Einfluss einen zu haben. Lediglich nach Zugabe des Atmungskettenentkopplers FCCP – ein Surrogatparameter für die maximale Respirationsrate – wurde ein tendenzieller Anstieg der OCR beobachtet. Demgegenüber ließen sich bei Analysen des Has2-Knockouts im Vergleich der Genotypen eindeutige Differenzen feststellen: Neben einer reduzierten Basalatmung vor Zugabe jeglicher Stressoren, ging ein Has2-Mangel mit einer signifikant geringeren maximalen Atmung nach FCCP-Gabe und einer nicht-mitochondrialen Atmung nach Injektion von Komplex I/III-Inhibitoren einher.

Vorstellbar erscheint hier ein metabolischer *shift* in Richtung Glykolyse. Eine defizitäre HA-Synthese durch die genetische Deletion von *Has2* könnte besonders unter den vorherrschenden diabetogenen Stressbedingungen zu einer erhöhten glykolytischen Substratbereitstellung führen. Dieser Mechanismus ist zumindest im BAT nach HA-Hemmung beschrieben [28]. Die maximierte Glykolyse bedingt hier einerseits einen Anstieg von Pyruvat, welches nachgeschaltet als Substrat des Citratzyklus die mitochondriale Atmung und die *de novo* Lipogenese stimuliert. Andererseits korreliert der Laktatspiegel positiv mit einer erhöhten *Ucp1* mRNA im BAT [28].

Um einen derartigen Substrat-*switch* im cMAT zu identifizieren, wurde die LDH-Aktivität im cMAT von *Has2-Knockouts* und WT-Kontrollen nach mehrwöchiger Fütterung bestimmt. Anders als erwartet, resultierte ein *Has2*-Mangel in einer signifikant niedrigeren LDH-Enzymaktivität und damit niedrigeren Laktatkonzentration. Die Hypothese einer Verschiebung des HA-modulierten Substratflusses zugunsten der (anaeroben) Glykolyse blieb daher in dieser Arbeit aus. Faszinierenderweise veröffentlichten Cai *et al.*, 2023 Ergebnisse, die zeigten, dass Laktat die Fähigkeit besitzt, die OxPhos zu erhöhen und simultan die Glykolyse zu supprimieren. Konkret stimulierte eine erhöhte Menge an extrazellulärem Laktat die mitochondriale Elektronentransportkette. Die ATP-Syntheseaktivität und der Eintritt von Pyruvat in den Citratzyklus nahmen zu, während die Glykolyse zunehmend beeinträchtigt wurde [225]. Wieweit die Laktatakkumulation im HA-reichen BMAT als Regulator des metabolischen Stoffwechselprogramms fungiert, ist zu hinterfragen.

Das Wissen über adipoztyenspezifisches Laktat ist nach wie vor limitiert. In mehreren Publikationen wurde dennoch die Relevanz von Laktat im Fettgewebe aufgezeigt. Bereits vor Jahren wurde eine Kausalität von Laktatproduktion und Adipositas konstatiert [226]. So konnte – wie bereits aufgeführt – mit Hilfe eines zelltypspezifischen LDH-*Knockouts* primär WAT als Laktatquelle identifiziert werden [140]. Da Krycer *et al.,* im Jahr 2020 postulierten, dass die Laktatproduktion im Fettgewebe unabhängig vom Glukosestoffwechsel priorisiert wird, implizierte dies die Laktatproduktion als eine weitere metabolische Funktion des Fettgewebes [227]. Interessanterweise verbesserte eine Laktatsenkung die Inflammation sowie die Adipositas induzierte IR im WAT [140]. Ob BMAT ebenfalls eine Quelle für Laktat bildet, bleibt in weiteren Experimenten zu klären.

Vorstellbar ist, dass HA als positiver Regulator der Adipogenese auch für den metabolischen Energiebedarf des Fettdepots entscheidend ist. Die zuvor thematisierten Ergebnisse detektierten HAS2 als Hauptisoform im BMAT (vgl. Abbildung 15). Nicht nur *in vitro* beeinträchtigte ein genetischer *Knockout* von *Has2* die adipogene Differenzierung (vgl. Abbildung 20), auch *in vivo* wurde eine signifikante Reduktion der Adipozyten im Knochenmark erfasst (vgl. Abbildung 19). Möglicherweise erklärt das Vorhandensein eines kleineren Fettdepots die deutlich niedrigeren Laktatkonzentrationen im cMAT prä-diabetischer *Has2*-defizienter Tiere.

Die Forscher um Li und Kollegen entdeckten kürzlich einen Link zwischen LDH und HA bei chronischen Gelenkentzündungen. Die hochregulierte HA-Synthese durch HAS2 beruhte auf einer initialen LDH-Inhibition und einem nachgeschalteten 109 Regulationsmechanismus [228]. Ob dies mit den Prozessen im BMAT bei metabolischen Komplikationen wie dem Prä-Diabetes konsistent ist, bedarf weiterer Analysen.

Abschließend sollte angeführt werden, dass eine unzureichende Sauerstoffversorgung die adipogene Differenzierung beeinträchtigen kann. In Übereinstimmung damit verzeichnete das WAT adipöser C57BL/6J-Mäuse einen deutlich reduzierten Sauerstoffgehalt als das magerer Tiere [211, 212]. Eine lokale Gewebehypoxie wäre ebenfalls im BMAT plausibel, wurde aber in dieser Arbeit nicht weitergehend untersucht. Aufschlussreich wäre z.B. eine Genexpressionsanalyse spezifischer Hypoxie-Marker (z.B. Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α , HIF-1- α) im Knochenmark.

Insgesamt sprechen die Daten für eine relevante Funktion von BMAT als zentrales Stoffwechselorgan bei der Regulation des Energiehaushaltes. Welche Substrate und Faktoren im Detail beteiligt sind, bleibt fraglich. Demungeachtet lassen die vorliegenden Resultate auf einen wesentlichen Beitrag von HAS2 schließen. In welcher Weise HAS2 als Modulator im Stroma des Knochenmarks einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Stoffwechselaktivität des Fettdepots ausübt, muss zukünftig ebenfalls eruiert werden.

4.5 Einfluss von HA auf die Immunantwort im Knochenmark und in der Peripherie

Die Heterogenität des Knochenmarks in Physiologie und Funktion steht im Mittelpunkt vieler Forschungsbereiche. HSZ sind als Komponente der zellulären Nische in der Lage, HA zu exprimieren und zu synthetisieren [229]. Bereits in Kapitel 3.11 wurde auf eine funktionelle Studie von Goncharova und Kollegen hingewiesen, die bestätigte, dass eine mangelhafte HA-Synthese durch pharmakologische Inhibition mittels 4-MU die hämatopoetische Aktivität *in vitro* beeinträchtigt. Interessanterweise wurde beobachtet, dass die Hemmung der HA-Synthese deutlich mit der hämatopoetischen Unterstützungsfunktion der MSZ im Knochenmark korreliert. So zeigten isolierte Knochenmarkzellen aus HAS1/2/3-*Knockout*-Mäusen im Gegensatz zu HAS1/3-*Knockout-* und WT-Mäusen eine marginale Hämatopoese. Da HAS2 in den HAS1/2/3-*Knockouts* nur in den MSZ inaktiviert wurde, war es möglich, nicht nur die Relevanz von HAS2, sondern auch die der MSZ im hämatopoetischen Mikromileu zu verdeutlichen [215].

In der Folge wurde die Hämatopoese im Knochenmark prä-diabetischer *Has2*-defizienter Tiere und respektiver WT-Kontrollen untersucht und es zeigte sich, dass HAS2 diese *in* *vivo* zu regulieren vermag. Ein konditionaler *Knockout* der *Has2* beeinträchtigte vor allem frühe Differenzierungsstadien im fettreichen cMAT: Lin⁻ und LSK⁺ Zellen sowie MPP 3 und 4 waren signifikant in ihrer Anzahl reduziert (vgl. Abbildung 23). Keine Variation in der HSZ-Zusammensetzung ergaben dagegen die Analysen im hämatopoetisch aktiven rMAT (vgl. Abbildung 24). Aufgrund der Tatsache, dass ein Effekt lediglich im fettreichen cMAT und nicht im hämatopoetischen rMAT der Tiere beobachtet werden konnte, geben die erhobenen Daten erste Hinweise auf einen wesentlichen Beitrag der HA-reichen Adipozyten im Rahmen der Hämatopoese. Angesichts der bekannten pro-adipogenen Eigenschaften der HA könnte hier eine übermäßige BMAd-Akkumulation im Knochenmark prä-diabetischer WT-Tiere vermutet werden – womöglich fungierend als lokale Energiequelle der HSZ.

Anschließend war von Interesse, ob die Ergebnisse der HA-vermittelten Beeinträchtigungen der HSZ-Differenzierung auch auf reife Immunzellen übertragbar sind. Ein Charakteristikum der chronischen Inflammation bei T2DM ist eine Dysbalance zugunsten der Myelopoese. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit erfolgreich im rMAT und cMAT prä-diabetischer C57BL/6J-Mäuse präzisiert werden (vgl. Abs. 4.1). *Has1-Knockout*-Mäuse zeigten hingegen keine signifikanten Divergenzen in allen analysierten Zelltypen, einschließlich der HSZ und der differenzierten Immunzellen (vgl. Abs. 3.19).

Überraschenderweise blieben auch alle untersuchten reifen Immunzelltypen im cMAT bei *Has2*-Defizienz unverändert (vgl. Abbildung 25). Im rMAT initiierte ein *Has2*-Defizit neben einer minimalen Abnahme der CD45⁺Leukozyten lediglich eine tendenzielle Verschiebung der Immunzellen in Richtung der Lymphozyten (vgl. Abbildung 26). Bei der weiteren Analyse der B- und T-Lymphozyten konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden.

HA vermag als Bestandteil der lokalen Marknische die Produktion verschiedener Zytokine/Chemokine zu regulieren [215]. Aus diesem Grund wurden nächstfolgend subtypspezifische Analysen des BMAT-Sekretionsprofils im Vergleich der *Has2*-Genotypen vorgenommen. Generell wurde den sekretorischen Eigenschaften von BMAT eine wichtige Bedeutung zugeschrieben (vgl. Abs. 1.3.3.4). Bemerkenswerterweise fehlte ein Effekt auf die cMAT-Sekretionsaktivität bei *Has2*-Defizienz vollständig (vgl. Abbildung 28). Ob HA als Bestandteil der cMAT-SVF oder selektiv die Adipozyten verantwortlich sind, kann nicht beurteilt werden.

Mögliche Informationen lieferte allerdings das rMAT-Sekretionsprofil. Da hier primär proinflammatorische Zytokine reguliert wurden, erlauben diese Daten Rückschlüsse auf die systemische Entzündungswirkung von *Has2* (vgl. Abbildung 27). Eine Ablation der *Has2* scheint mit einem reduzierten pro-inflammatorischen rMAT-Milieu einherzugehen, gekennzeichnet durch eine verminderte Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie MIP-1β und der aktiven Form von IL-12 – IL-12 (p70).

In Analogie zu früheren Veröffentlichungen ist davon auszugehen, dass HA als wichtiger Regulator der Inflammationsparameter im Knochenmarkmilieu beteiligt ist und darüber Einfluss auf die Hämatopoese nimmt. Dies verifizierten bereits damals Matrosova et al., deren experimentelle Studie auf der Gabe von 5-Fluoruracil (5-FU) zur Reduktion von HA im Knochenmark basierte. Eine anschließende Supplementierung von exogenem HA erhöhte nicht nur die Anzahl der Immunzellen in der Zirkulation, sondern auch die Expression pro-hämatopoetischer Zytokine (IL-1 und IL-6) im Knochenmark [230]. Aus Abbildung 27 ist eine Hochregulierung einer Untereinheit von IL-12 – IL-12 (p40) – im rMAT bei Has2-Defizienz zu entnehmen, welche u.a. auf B-Zellen exprimiert wird und mit einer lymphoiden Verschiebung in Verbindung gebracht werden könnte [231]. Hinweise auf einen möglichen Mechanismus im Knochenmark könnte ebenfalls eine Genexpressionsanalyse des HA-Rezeptors CD44 liefern. CD44 ist im zellulären Knochenmarkstroma hoch exprimiert [232]. Kontextbezogen wird suggeriert, dass CD44 und sein Ligand HA die Aktivierung sowie Rekrutierung von T-Lymphozyten stimuliert [187, 233]. Inwiefern eine Wechselwirkung von CD44 und Has2 einen regulatorischen Beitrag zur Hämatopoese in den Subtypen des Knochenmarkfetts leistet, bleibt zu untersuchen.

Des Weiteren wurden neben dem Knochenmark auch Blut und die Milz näher beleuchtet, um eine systematische Analyse des HA-Systems im progredienten Verlauf des Prä-Diabetes zu gewährleisten. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob der beobachtete HAS2-Phänotyp neben den lokalen Knochenmarkveränderungen auch das systemische Entzündungsgeschehen bei der Entwicklung und Progression des Prä-Diabetes beeinflusst. Faktisch zeigte ein *Has2*-Mangel in einer ersten Ergebnisübersicht keine Beeinträchtigung in der Peripherie: Weder zirkulierende Immunzellen (vgl. Abbildung 29) noch die extramedulläre Hämatopoese der Milz (vgl. Abbildung 30) schienen durch HA beeinflusst zu sein. Eine genauere Analyse der Monozyten-Subtypen in der Zirkulation ergab tendenziell eine relative Zunahme der phagozytierenden, proteolytischen und proinflammatorischen Ly6C^{+high} Monozyten. Gemeinsam mit der Tatsache, dass die Immunzellen in der Milz nicht reguliert waren, kann davon ausgegangen werden, dass HAS2-synthetisierte HA nur einen geringfügigen Einfluss auf die systemische Immunzellantwort prä-diabetischer Tiere unter diesen chronischen, niedriggradig inflammatorischen Bedingungen hat.

Im Blut der prä-diabetischen *Has1-Knockout*-Mäuse konnte abweichend davon eine signifikante Reduktion der CD45⁺ Leukozyten im Verhältnis zur Gesamtzellzahl beobachtet werden (vgl. Abbildung 38). Die Milz der Tiere wurde hier nicht untersucht, könnte aber in Zukunft aufschlussreiche Informationen liefern.

Die Regulationsmechanismen der Hämatopoese *per se* und die damit eng verknüpfte Frage nach der Funktion des HA-Systems im zellulären Knochenmark werfen auch heutzutage noch etliche Fragen auf. Fest steht, dass die Effizienz der heterogenen Knochenmarknische durch zahlreiche Faktoren determiniert wird, u.a. von einer Vielzahl verschiedenartiger Pathologien – in Korrelation mit der Zellkomposition und dem Vorhandensein von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen und Chemokinen. Weiterhin ist davon auszugehen, dass HA als Nischenregulator zelltypübergreifend dazu beitragen könnte, den Bedarf der Hämatopoese bei metabolischen Störungen zu modulieren. Ebenso konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass HAS2 insbesondere im fettreichen cMAT einen entscheidenden Beitrag zur HSZ-Differenzierung leistet, wobei der genaue Mechanismus in Zukunft weiterer Aufklärung bedarf.

4.6 HA als wichtiger Faktor der Osteogenese

Wie unter 1.3.2 beschrieben, definiert die Adipogenese eine linienspezifische Differenzierung der multipotenten MSZ. reguliert durch eine komplexe TF-Signalkaskade. Nachweislich begünstigt ein adipöser/diabetischer Phänotyp die proadipogene Verschiebung der MSZ auf Kosten der Osteoblastenlinie. Gleichzeitig spielt die HA-reiche EZM eine zentrale Rolle bei der Regulierung von Zellwachstum- und Differenzierung, wobei HA in dieser Arbeit als kritischer Adipogenese-Modulator bestätigt wurde (vgl. Abs. 4.2). Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob das bestehende Kongruenzgleichgewicht der MSZ-Differenzierung zwischen Adipozyten und Osteoblasten im prä-diabetischen Knochenmark durch HA modifiziert wird.

Publiziert ist, dass Gene, die mit der Differenzierung von Osteoblasten in Verbindung stehen (z.B. Osx, Osteocalcin) in humanen MSZ durch Kultivierung mit HA hochreguliert werden [234] (vgl. Abbildung 2). *In vitro* vermitteln sowohl *Has2* als auch *Has3* die HA-Synthese in Osteoblasten [235]. Die Mechanismen, über die HA zur Osteogenese beiträgt, sind jedoch, insbesondere *in vivo*, nach wie vor komplex. In diesem Jahr untersuchten Pendyala *et al.* erstmals, inwieweit der Verlust von HA die kortikale

Knochenqualität von Mäusen *in vivo* beeinflusst. Der *Knockout* von *Has1* und *Has3* verursachte divergente Phänotypen: *Has1* beeinflusste hauptsächlich die Morphologie und Mineralisierung des kortikalen Knochens, *Has3* die Matrixqualität sowie die Knochenmechanik [236].

Zur Validierung des Knochenphänotyps in prä-diabetischen *Has2*-defizienten Mäusen wurde ein hochauflösendes µCT-System nach 9-wöchiger Fütterung mit DD eingesetzt. Festgestellt werden konnte, dass ein Mangel an *Has2* einen ausgeprägten trabekulären Knochenverlust in den langen Röhrenknochen verursachte (vgl. Abbildung 31). Entgegen den Beobachtungen von Pendyala *et al.,* 2023 schien die kortikale Knochenmasse in Femur und Tibia bei beiden Genotypen nicht zu variieren, wobei dies womöglich modellspezifisch bedingt ist (Daten nicht gezeigt). Zur detaillierten Aufklärung des HA-Systems auf zellulärer Ebene wäre zukünftig ein zelltypspezifischer *Has2-Knockout*, primär in mesenchymalen Zellen, hilfreich. Alternativ könnten *in vitro*-Studien unter Verwendung von *small interfering* (si)-RNA zur spezifischen Inhibition der einzelnen HAS in isolierten MSZ von Interesse sein.

Zusammengenommen inkludiert der in dieser Arbeit identifizierte HAS2-Phänotyp im Knochen ein breites Feld möglicher Ursachen. Einerseits könnte die antiosteoklastogene Wirkung von HA über den *Toll-like receptor 4* (TLR4)- Signalweg eine Erklärung sein, wobei ein direkter Einfluss der HA-Synthese auf den Knochenumsatz nahe liegt [237]. Andererseits wurde die funktionelle Wichtigkeit der CD44-HA-Interaktion im Knochenmetabolismus beschrieben. HA ist in der Lage, die Expression von RANKL in MSZ durch Bindung an den CD44-Rezeptor zu stimulieren – RANKL ist hauptverantwortlich für Osteoklastenbildung und -aktivität [238]. Abschließend wäre ein chondrozytenähnlicher Mechanismus erdenklich. In Kapitel 1.3.2 wurde bereits die BMP-Signalkaskade skizziert. Dieser liegt ein Wirkmechanismus zugrunde, der u.a. von Luo *et al.*, 2014 identifiziert wurde. Beschrieben wurde, dass insbesondere *Has2* in Abhängigkeit von CD44 die BMP7-Signalübertragung in Chondrozyten induziert [239]. Nachgeschaltet aktiviert die Signaltransduktion die intrazellulären Smad-Proteine, speziell Smad1 [240].

Zu klären bleibt nach wie vor der diabetogene Einfluss auf die Stromazellen des Knochenmarks. Folgestudien sind vonnöten, um beispielsweise die Hypothese von Wang *et al.*, 2014 zu überprüfen. Prognostiziert wurde in diesem Kontext eine Umleitung sich teilender osteoblastischer Vorläufer auf einen metabolisch belasteten adipogenen Pfad verbunden mit einer Aktivierung der HA-Synthese, Rekrutierung von Entzündungszellen und Verlust von trabekulärer Spongiosa [100].



E: Exon, Citratzyklus, Neutrophil, Monozyt, Makrophage, B-Zelle, T-Zelle, Osteoklast, Erythrozyt

Abbildung 39: Graphische Zusammenfassung.

HAS2 moduliert vielzählige Veränderungen des stromalen Knochenmarkmikromilieus unter prädiabetischen Bedingungen. Ein globaler *Knockout* bestätigt *Has2* als Regulator der Adipogenese und Osteogenese. Als Nischenmodulator beeinflusst HA das frühe Differenzierungsstadium hämatopoetischer Zellen im fettreichen cMAT. Hinzukommend beeinflusst HAS2 die metabolische Aktivität des cMAT – einhergehend mit einer reduzierten Respiration- sowie LDH-Aktivität bei *Has2*-Defizienz. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

4.7 Ausblick und Limitierung

Die vorliegende Arbeit bildet die Grundlage für künftige Studien, zumal die exakten Mechanismen der multiplen stromalen Knochenmarksveränderungen im Rahmen des Prä-Diabetes nicht vollständig aufgeklärt sind. Grundsätzlich bestätigten sich frühere Hypothesen, dass HA als kritischer Akteur in der Marknische sowohl eine pro-adipogene als auch eine pro-osteogene Funktion besitzt.

Als Limitation der Studie kann vorrangig die Verwendung eines globalen HA-*Knockouts* angesehen werden. Bei der Bewertung der Ergebnisse sind zelltypspezifische Aussagen nicht möglich, auch wenn *in vitro* Versuche durchaus die Relevanz der BMAd *Has2* suggerieren. Eine vielversprechende Alternative liegt in der kürzlich publizierten BMAT-*Knockout* Mauslinie der Gruppe um Ormond MacDougald [67]. Die Kombination des BMAd-spezifischen Cre-Mausmodells mit einer genetischen *Has2*-Deletion wäre für die weitere Präzisierung des BMAT-HA-Systems im Knochenmark von Nutzen.

Im hier genutzten Mausmodell wurde gezeigt, dass der pathogene Phänotyp insbesondere frühe hämatopoetische Differenzierungsstadien moduliert. Daher wäre es wichtig, die molekularen Mechanismen diesbezüglich zu verfolgen. Zum einen bietet sich die Isolierung von Immunzellen *in vitro* aus *Has2*-defizienten Tieren und entsprechenden Kontrollen an. Der Einsatz von siRNA zur Erzeugung eines spezifischen *Has2-Knockouts* in den verschiedenen Immunzelltypen könnte weitere Erkenntnisse hervorbringen. Zum anderen würde die Ko-Kultivierung von BMAds und verschiedenen Zellen hämatopoetischen Ursprungs Aufschluss darüber geben, inwieweit eine direkte Zell-Zell-Interaktion oder eine indirekte Beeinflussung vorliegt. Nicht nur die Differenzierung, sondern auch die Funktionalität hämatopoetischer und mesenchymaler Zellen scheint eng miteinander verknüpft zu sein, wobei HAS2 als dominante Form im Knochenmark wesentlich dazu beiträgt. Welche Mechanismen im Detail beteiligt sind und inwieweit metabolische Komplikationen die Physiologie und Funktion des HAreichen Knochenmarkstromas beeinträchtigen, bleibt zu klären.

Künftig wird es notwendig sein, die einzelnen Zelltypen der BMAT-SVF isoliert zu betrachten. Zielführend wäre z.B. eine umfassende Analyse der beteiligten Zellen mittels Durchflusszytometrie. Von Interesse wäre auch die Erstellung eines charakteristischen BMAT-Genprofils mittels Sequenzierung, z.B. *Single Nuclei Sequencing.*

Bis dato bleibt unklar, ob neben der systemischen Inflammation auch ein akuter Entzündungsreiz die Immunantwort des Knochenmarks beeinflusst und inwieweit HA als Bestandteil der Nische daran beteiligt ist. Mit Blick auf mögliche translationale Experimente wäre obligat, die Wirkung des HA-Systems auf die Knochenmarknische im akuten Inflammationsmodell zu erforschen. Gerade der beschriebene HAS2-Phänotyp im Knochenmark könnte in Bezug auf eine *emergency*-Hämatopoese, beispielsweise nach akutem Myokardinfarkt vielversprechend und relevant sein. In einer aktuellen Studie von Zhang *et al.,* wurde die Rolle der BMAds bzw. des Fettsäurestoffwechsels im Knochenmark im Rahmen der *emergency*-Hämatopoese durch die Beobachtung einer geringeren Markadipositas nach Myokardinfarkt bereits belegt [241].

Abschließend ist anzumerken, dass geschlechts- und regionsspezifische Analysen in dieser Arbeit keinen Platz fanden. Die Relevanz des Geschlechts und damit der Sexualhormone wurde eingangs skizziert (vgl. Abs. 1.3.3.1). Die Tatsache, dass sich Adipozyten im Knochenmark nicht nur in den langen Röhrenknochen wie Tibia und Femur unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Konditionen anreichern, sondern auch in diversen anderen Knochen, z.B. den Wirbeln, dem Sternum, deutet potenziell auf eine differenzierte lokoregionale Antwort des Knochenmarks hin – zumindest nach akutem Stimulus wie im Modell des Myokardinfarkts.

5. Zusammenfassung

Knochenmarkfettgewebe *(bone marrow adiposse tissue,* BMAT) ist ein Bestandteil des Knochenmarkmikromilieus. Dieses adaptive und sekretorische Fettdepot, bestehend aus reguliertem hämatopoetischem BMAT *(regulative marrow adipose tissue,* rMAT) und konstitutivem BMAT *(constitutive marrow adipose tissue,* cMAT), akkumuliert unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen wie Adipositas und Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM). Es wird angenommen, dass die Markadipozyten als zentrales metabolisches Organ zum Energiestoffwechsel und – aufgrund ihrer engen anatomischen Beziehung im Knochenmark – auch zur Hämatopoese beitragen.

Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA) stellt ein vielversprechendes *Target* für neue therapeutische Zielstrukturen dar. HA, Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, wird von drei HA-Synthasen (HAS-1, -2, -3) aus aktivierten Zuckervorstufen synthetisiert, wodurch eine direkte Wechselwirkung mit der Glukosehomöostase postuliert wird. Störungen des metabolischen Spektrums, z.B. Adipositas und T2DM, resultieren in einer erhöhten Synthese sowie massiven Ablagerung von HA in verschiedenen Geweben. HA bzw. ihre modifizierte Synthese wirkt u.a. direkt auf die Funktionen des weißen und braunen Fettgewebes. Obgleich bislang keine Studien bekannt sind, die das Vorhandensein und die Funktionalität einer HA-reichen Matrix im BMAT charakterisieren, lässt die hohe adaptive Plastizität der Adipozyten ein ausgeprägtes *Remodelling* im progredienten Verlauf des T2DM erwarten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Relevanz des HA-Systems im BMAT in einem etablierten Mausmodell für Adipositas und Prä-Diabetes zu untersuchen und die damit einhergehenden Veränderungen des BMAT-Substratstoffwechsels und der Hämatopoese zu analysieren.

Zur systematischen Untersuchung der funktionellen Rolle von HA in der prädiabetischen Phase wurde ein Modell der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz bzw. Insulinresistenz (IR) verwendet. Männliche C57BL/6J und *Has*defiziente Mäuse erhielten über 9 Wochen eine diabetogene (DD) oder eine entsprechende Chow-Diät.

HAS2 wurde als dominierendes Isoenzym im BMAT identifiziert, welches nachweislich die Adipogenese und die Osteogenese fördert. Als kritischer Akteur in der Knochenmarknische moduliert *Has2* zudem die Hämatopoese. Eine genetische Defizienz der *Has2* resultierte in weniger BMAT und beeinträchtigte insbesondere die frühen Differenzierungsstadien hämatopoetischer Zellen, einhergehend mit einer

geringeren Progenitoranzahl im fettreichen cMAT. Die Adipositas bedingte systemische Inflammationsantwort in der Peripherie schien durch *Has2* unter Basalbedingungen nur marginal beeinflusst zu werden. Darüber hinaus modulierte *Has2* die Stoffwechselaktivität von cMAT unter prä-diabetischen Bedingungen. *Has2-Knockouts* charakterisierte eine reduzierte Respirations- und LDH-Aktivität nach Fütterung der DD, wodurch ein entscheidender Beitrag der HA im stoffwechselaktiven BMAT vermutet werden kann.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass HAS2 als wichtiges Isoenzym einen entscheidenden Einfluss auf die Physiologie und Funktionalität der heterogenen Knochenmarknische und insbesondere auch des BMAT hat und somit eine potenziell interessante Zielstruktur für die Diabetes-Therapie darstellen könnte.

6. Summary

Bone marrow adipose tissue (BMAT) is part of the bone marrow (BM) cellular microenvironment. This adaptive and secretory fat depot, consisting of regulative haematopoietic BMAT (rMAT) and constitutive BMAT (cMAT), accumulates under various physiological and pathological conditions such as obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM). Bone marrow adipocytes (BMAds), as a central metabolic organ, are thought to contribute to energy metabolism and – due to their close anatomical relationship in the BM niche – also to haematopoiesis.

Hyaluronic acid (HA) is a promising target for novel therapeutics. HA, the major component of the extracellular matrix, is synthesised by three HA synthases (HAS-1, -2, -3) from activated sugar precursors, which is postulated to be directly linked to glucose homeostasis. Metabolic disorders, including obesity and T2DM, result in increased synthesis and massive deposition of HA in various tissues. HA or its modified synthesis directly affects white and brown adipose tissue functions. However, the presence and functionality of an HA-rich matrix in BMAT remains to be elucidated as the high adaptive plasticity of adipocytes suggests a pronounced remodelling in the context of early T2DM.

The aim of the present study was to analyse the BMAT-HA matrix in a murine model of pre-diabetes and the associated changes in BMAT substrate metabolism and haematopoiesis.

Therefore, a model of diet-induced obesity and glucose intolerance or insulin resistance (IR) was used to systematically analyse the functional role of HA in the pre-diabetic phase. Male C57BL/6J and *Has*-deficient mice were fed a diabetogenic (DD) or a corresponding chow diet for 9 weeks.

HAS2 has been identified as the dominant isoenzyme in BMAT, which has been shown to promote adipogenesis and osteogenesis. As a critical regulator in the bone marrow niche, HAS2 also modulates haematopoiesis. Genetic deficiency of *Has2* resulted in reduced BMAT and particularly impaired the early differentiation stages of haematopoietic cells, associated with lower progenitor numbers in the adipocyte-rich cMAT. The diet-induced systemic inflammatory response in the periphery appeared to be only marginally affected by *Has2* under basal conditions. Furthermore, *Has2* modulated cMAT metabolic activity under pre-diabetic conditions. Indeed, *Has2-knockouts* exhibited reduced respiratory and LDH activity after DD feeding, suggesting a crucial contribution of HA in metabolically active BMAT.

In conclusion, the present work demonstrates that HAS2, as an important isoenzyme, has a decisive influence on the physiology and functionality of the heterogeneous bone marrow niche and in particular also of BMAT and could therefore represent a potentially interesting target structure for diabetes therapy.

7. Appendix

Abbildung 40: Gating-Schema HSZ

Abbildung 41: Gating-Schema Immunzellen.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Adipozytensubtypen modifiziert nach Austin <i>et al.,</i> 2023 [50]	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der transkriptionellen MSZ- Differenzierung.	8
Abbildung 3: Chemische Struktur der Hyaluronsäure modifiziert nach Noble <i>et al.,</i> 2011 [169]	22
Abbildung 4: Experimentelles Schema	32
Abbildung 5:Schematische Darstellung der Knochenmarkseparation	33
Abbildung 6: Differenzierungsprotokoll von Prä-Adipozyten aus der stromalen Knochenmarkfraktion	48
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Neutralisierung der HA- Bindungsdomäne von CD44 <i>in vitro</i>	50
Abbildung 8: Schematische Darstellung der HSZ-Differenzierung	52
Abbildung 9: Moderater Einfluss der diabetogenen Diät auf die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen im regulatorischen Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen.	54
Abbildung 10: Dysregulierte hämatopoetische Differenzierung als Folge der diabetogenen Diät im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe von C57BL/6J-Mäusen	56
Abbildung 11: Gesteigerte Immunzell-vermittelte Entzündungsantwort im regulatorischen Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen nach Fütterung einer diabetogenen Diät	58
Abbildung 12: Anstieg der Monozyten im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe von C57BL/6J-Mäusen nach Fütterung der diabetogenen Diät	59
Abbildung 13: cMAT-Sekretionsprofil von C57BL/6J-Mäusen im Modell der Diät- induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz	61
Abbildung 14: Keine Effekte der Diät-induzierten Adipositas und Glukoseintoleranz auf die Stoffwechselaktivität des konstitutiven Knochenmarkfettgewebes von C57BL/6J-Mäusen	63
Abbildung 15: Charakterisierung der Hyaluronsäure (HA)-Matrix im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe von C57BL/6J-Mäusen	65
Abbildung 16: Expression des HA-Hauptrezeptors CD44 im konstitutiven Knochenmarkfettgewebe von C57BL/6J-Mäusen nach Fütterung der diabetogenen Diät	66
Abbildung 17: CD44-Rezeptorblockierung beeinträchtigt die adipogene Differenzierung der stromal-vaskulären Knochenmarkfraktion in primäre Prä-Adipozyten.	67
Abbildung 18: Einfluss der diabetogenen Fütterung auf das Körpergewicht sowie die Glukosetoleranz bei <i>Has2</i> -Defizienz <i>in vivo</i>	69

0
1
3
4
6
7
9
0
2
4
6
8
0
2
3
4
6

Abbildung 36: Die Immunzell-vermittelte Entzündungsantwort des konstitutiven Knochenmarkfettgewebes unter prä-diabetischen Bedingungen wird nicht durch HAS1 reguliert.	97
Abbildung 37: Die Immunzell-vermittelte Entzündungsantwort des regulatorischen Knochenmarkfettgewebes unter prä-diabetischen Bedingungen wird nicht durch HAS1 reguliert	98
Abbildung 38: HAS1 hat einen marginalen Einfluss auf die periphere Immunzellantwort in der Zirkulation prä-diabetischer Mäuse	99
Abbildung 39: Graphische Zusammenfassung	.115
Abbildung 40: <i>Gating</i> -Schema HSZ	.122
Abbildung 41: <i>Gating</i> -Schema Immunzellen	.122

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Futterzusammensetzung von Chow und DD	31
Tabelle 2: Verwendete kommerzielle Lösungen und Substanzen zur Generierung von Plasma und Knochenmarkfett-Überstand	34
Tabelle 3: Verwendete nicht kommerzielle Puffer zur Generierung von Knochenmarkfett-Überstand.	34
Tabelle 4: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse von Blut, Knochenmark und Milz	36
Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie	37
Tabelle 6: Verwendete Primer-Sequenzen in der quantitativen <i>Real-time</i> PCR	40
Tabelle 7: Verwendete kommerzielle Puffer und Substanzen der metabolischen Analyse am Seahorse XFe Analysator	41
Tabelle 8: Zusammensetzung nicht-kommerzielle Puffer der metabolischen Analyse am Seahorse XFe Analysator	41
Tabelle 9: Verwendete kommerzielle Puffer, Lösungen und Substanzen für histologische Färbungen	43
Tabelle 10: Zusammensetzung nicht-kommerzieller Puffer und Lösungen für histologische Färbungen	43
Tabelle 11: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie.	44
Tabelle 12: Verwendete kommerzielle Puffer, Lösungen und Substanzen in der Zellkultur.	46
Tabelle 13: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	47
Tabelle 14: Verwendete Antikörper zur Neutralisierung von CD44 in vitro	47

10. Referenzen

- 1. Organization, W.H. and H.H.P. Kluge, *WHO European regional obesity report* 2022. 2022, [Copenhagen]: [World Health Organization]. 206.
- 2. Flegal, K.M., et al., Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and metaanalysis. JAMA, 2013. **309**(1): p. 71-82.
- 3. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
- 4. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
- 5. Isomaa, B., et al., *Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome.* Diabetes Care, 2001. **24**(4): p. 683-9.
- 6. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy.* Lancet, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
- 7. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic.* Nature, 2001. **414**(6865): p. 782-7.
- 8. Berbudi, A., et al., *Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System.* Curr Diabetes Rev, 2020. **16**(5): p. 442-449.
- 9. Galicia-Garcia, U., et al., *Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
- 10. Cosentino, F., et al., 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. Eur Heart J, 2020. **41**(2): p. 255-323.
- 11. Cerf, M.E., *Beta cell dysfunction and insulin resistance.* Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 37.
- 12. American Diabetes, A., *2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020.* Diabetes Care, 2020. **43**(Suppl 1): p. S14-S31.
- 13. Tabak, A.G., et al., *Prediabetes: a high-risk state for diabetes development.* Lancet, 2012. **379**(9833): p. 2279-90.
- 14. Hong, K.N., et al., *How Low to Go With Glucose, Cholesterol, and Blood Pressure in Primary Prevention of CVD.* J Am Coll Cardiol, 2017. **70**(17): p. 2171-2185.
- 15. Barrett, T.J., et al., *Diabetes-mediated myelopoiesis and the relationship to cardiovascular risk.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2017. **1402**(1): p. 31-42.
- 16. Cavender, M.A., et al., Impact of Diabetes Mellitus on Hospitalization for Heart Failure, Cardiovascular Events, and Death: Outcomes at 4 Years From the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. Circulation, 2015. **132**(10): p. 923-31.
- 17. MacDonald, M.R., et al., *Impact of diabetes on outcomes in patients with low and preserved ejection fraction heart failure: an analysis of the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) programme.* Eur Heart J, 2008. **29**(11): p. 1377-85.
- 18. Galic, S., J.S. Oakhill, and G.R. Steinberg, *Adipose tissue as an endocrine organ.* Mol Cell Endocrinol, 2010. **316**(2): p. 129-39.
- 19. Rosen, C.J. and M.C. Horowitz, *Nutrient regulation of bone marrow adipose tissue: skeletal implications of weight loss.* Nature Reviews Endocrinology, 2023.
- 20. Tran, T.T. and C.R. Kahn, *Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease.* Nat Rev Endocrinol, 2010. **6**(4): p. 195-213.
- 21. Kwok, K.H., K.S. Lam, and A. Xu, *Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications.* Exp Mol Med, 2016. **48**(3): p. e215.

- Bluher, M., Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013.
 27(2): p. 163-177.
- 23. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *What we talk about when we talk about fat.* Cell, 2014. **156**(1-2): p. 20-44.
- 24. Reyes-Farias, M., et al., *White adipose tissue dysfunction in obesity and aging.* Biochemical Pharmacology, 2021. **192**.
- 25. 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.
- 26. Wong, R.H. and H.S. Sul, *Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective.* Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(6): p. 684-91.
- 27. Scherer, P.E., *Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ.* Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1537-45.
- 28. Grandoch, M., et al., *4-Methylumbelliferone improves the thermogenic capacity of brown adipose tissue.* Nat Metab, 2019. **1**(5): p. 546-559.
- 29. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance.* Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 277-359.
- 30. Cero, C., et al., *beta3-Adrenergic receptors regulate human brown/beige adipocyte lipolysis and thermogenesis.* JCI Insight, 2021. **6**(11).
- 31. Becher, T., et al., *Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health.* Nat Med, 2021. **27**(1): p. 58-65.
- 32. van Marken Lichtenbelt, W.D., et al., *Cold-activated brown adipose tissue in healthy men.* N Engl J Med, 2009. **360**(15): p. 1500-8.
- 33. Krings, A., et al., *Bone marrow fat has brown adipose tissue characteristics, which are attenuated with aging and diabetes.* Bone, 2012. **50**(2): p. 546-52.
- 34. 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.
- 35. Berbee, J.F., et al., *Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development.* Nat Commun, 2015. **6**: p. 6356.
- 36. Sanchez-Gurmaches, J. and D.A. Guertin, *Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 340-51.
- 37. Hanssen, M.J., et al., *Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus.* Nat Med, 2015. **21**(8): p. 863-5.
- 38. Cypess, A.M., et al., *Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist.* Cell Metab, 2015. **21**(1): p. 33-8.
- 39. Scheller, E.L., et al., *Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat.* Trends Endocrinol Metab, 2016. **27**(6): p. 392-403.
- 40. Li, Z. and O.A. MacDougald, *Preclinical models for investigating how bone marrow adipocytes influence bone and hematopoietic cellularity.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2021. **35**(4): p. 101547.
- 41. Suchacki, K.J., W.P. Cawthorn, and C.J. Rosen, *Bone marrow adipose tissue: formation, function and regulation.* Curr Opin Pharmacol, 2016. **28**: p. 50-6.
- 42. Moreno-Jimenez, I., et al., *Human and mouse bones physiologically integrate in a humanized mouse model while maintaining species-specific ultrastructure.* Science Advances, 2020. **6**(44).
- 43. Ambrosi, T.H., et al., *Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration.* Cell Stem Cell, 2017. **20**(6): p. 771-784 e6.
- 44. Veldhuis-Vlug, A.G. and C.J. Rosen, *Clinical implications of bone marrow adiposity*. J Intern Med, 2018. **283**(2): p. 121-139.
- 45. Craft, C.S., et al., *Molecular differences between subtypes of bone marrow adipocytes.* Curr Mol Biol Rep, 2018. **4**(1): p. 16-23.

- 46. Roche, B., et al., *Structure and quantification of microvascularisation within mouse long bones: what and how should we measure?* Bone, 2012. **50**(1): p. 390-9.
- Hardouin, P., T. Rharass, and S. Lucas, *Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue?* Front Endocrinol (Lausanne), 2016. 7: p. 85.
- 48. Scheller, E.L. and C.J. Rosen, *What's the matter with MAT? Marrow adipose tissue, metabolism, and skeletal health.* Ann N Y Acad Sci, 2014. **1311**(1): p. 14-30.
- Turner, R.T., S.A. Martin, and U.T. Iwaniec, *Metabolic Coupling Between Bone Marrow Adipose Tissue and Hematopoiesis*. Curr Osteoporos Rep, 2018. 16(2): p. 95-104.
- 50. Suchacki, K.J. and W.P. Cawthorn, *Molecular Interaction of Bone Marrow Adipose Tissue with Energy Metabolism.* Curr Mol Biol Rep, 2018. **4**(2): p. 41-49.
- 51. Sebo, Z.L., et al., *Bone Marrow Adiposity: Basic and Clinical Implications.* Endocr Rev, 2019. **40**(5): p. 1187-1206.
- 52. Berry, R., et al., Adipose Tissue Residing Progenitors (Adipocyte Lineage Progenitors and Adipose Derived Stem Cells (ADSC). Curr Mol Biol Rep, 2015. **1**(3): p. 101-109.
- 53. Mizoguchi, T., et al., *Osterix marks distinct waves of primitive and definitive stromal progenitors during bone marrow development.* Dev Cell, 2014. **29**(3): p. 340-9.
- 54. Seale, P., et al., *PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch.* Nature, 2008. **454**(7207): p. 961-U27.
- 55. Lecka-Czernik, B., *Marrow fat metabolism is linked to the systemic energy metabolism*. Bone, 2012. **50**(2): p. 534-9.
- 56. Muruganandan, S., A.A. Roman, and C.J. Sinal, *Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2009. **66**(2): p. 236-253.
- 57. Song, L.G., et al., *Loss of Wnt/β-Catenin Signaling Causes Cell Fate Shift of Preosteoblasts From Osteoblasts to Adipocytes.* Journal of Bone and Mineral Research, 2012. **27**(11): p. 2344-2358.
- 58. Krishnan, V., H.U. Bryant, and O.A. Macdougald, *Regulation of bone mass by Wnt signaling*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1202-9.
- 59. Guo, W., et al., *The effects of myostatin on adipogenic differentiation of human* bone marrow-derived mesenchymal stem cells are mediated through crosscommunication between Smad3 and Wnt/beta-catenin signaling pathways. J Biol Chem, 2008. **283**(14): p. 9136-45.
- 60. Ambrosi, T.H. and T.J. Schulz, *The emerging role of bone marrow adipose tissue in bone health and dysfunction.* J Mol Med (Berl), 2017. **95**(12): p. 1291-1301.
- Siersbaek, R., R. Nielsen, and S. Mandrup, *Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis.* Trends Endocrinol Metab, 2012. 23(2): p. 56-64.
- 62. Rosen, E.D., et al., *C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway.* Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 22-6.
- 63. Tanaka, T., et al., *Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene.* EMBO J, 1997. **16**(24): p. 7432-43.
- 64. Tang, Q.Q. and M.D. Lane, *Adipogenesis: from stem cell to adipocyte.* Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 715-36.
- 65. Zou, W., et al., *Ablation of Fat Cells in Adult Mice Induces Massive Bone Gain.* Cell Metab, 2020. **32**(5): p. 801-813 e6.
- 66. Horowitz, M.C., et al., *Bone marrow adipocytes.* Adipocyte, 2017. **6**(3): p. 193-204.

- 67. Li, Z., et al., *Constitutive bone marrow adipocytes suppress local bone formation.* JCI Insight, 2022. **7**(21).
- Rosen, E.D., et al., *Transcriptional regulation of adipogenesis.* Genes Dev, 2000.
 14(11): p. 1293-307.
- 69. Darlington, G.J., S.E. Ross, and O.A. MacDougald, *The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation.* J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30057-60.
- 70. Yue, R., et al., *Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow.* Cell Stem Cell, 2016. **18**(6): p. 782-796.
- 71. Tencerova, M. and M. Kassem, *The Bone Marrow-Derived Stromal Cells: Commitment and Regulation of Adipogenesis.* Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 127.
- 72. Laharrague, P. and L. Casteilla, *Bone Marrow Adipose Tissue*, in *Adipose Tissue* and *Adipokines in Health and Disease*, G. Fantuzzi and T. Mazzone, Editors. 2007, Humana Press: Totowa, NJ. p. 159–180.
- 73. Kricun, M.E., *Red-yellow marrow conversion: its effect on the location of some solitary bone lesions.* Skeletal Radiol, 1985. **14**(1): p. 10-9.
- 74. Fazeli, P.K., et al., *Marrow fat and bone--new perspectives.* J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(3): p. 935-45.
- 75. Griffith, J.F., et al., *Bone marrow fat content in the elderly: a reversal of sex difference seen in younger subjects.* J Magn Reson Imaging, 2012. **36**(1): p. 225-30.
- 76. Syed, F.A., et al., *Effects of chronic estrogen treatment on modulating agerelated bone loss in female mice.* J Bone Miner Res, 2010. **25**(11): p. 2438-46.
- 77. Ali, D., et al., *High-fat diet-induced obesity augments the deleterious effects of estrogen deficiency on bone: Evidence from ovariectomized mice.* Aging Cell, 2022. **21**(12): p. e13726.
- 78. Lundbom, J., et al., (1)H-MRS of femoral red and yellow bone marrow fat composition and water content in healthy young men and women at 3 T. MAGMA, 2019. **32**(5): p. 591-597.
- 79. Scheller, E.L., et al., *Bone marrow adipocytes resist lipolysis and remodeling in response to beta-adrenergic stimulation.* Bone, 2019. **118**: p. 32-41.
- 80. Tran, M.A., T.L. Dang, and M. Berlan, *Effects of catecholamines on free fatty acid release from bone marrow adipose tissue.* J Lipid Res, 1981. **22**(8): p. 1271-6.
- 81. Tran, M.A., et al., *Interplay of alpha-2 and beta adrenoceptors in the control of free fatty acid release from bone marrow adipose tissue.* J Pharmacol Exp Ther, 1984. **230**(1): p. 228-31.
- 82. Scheller, E.L., et al., *Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues.* Nature Communications, 2015. **6**(1).
- 83. Cawthorn, W.P., et al., *Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction.* Cell Metab, 2014. **20**(2): p. 368-375.
- 84. Bredella, M.A., et al., *Increased bone marrow fat in anorexia nervosa.* J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(6): p. 2129-36.
- 85. Li, Z., et al., *Lipolysis of bone marrow adipocytes is required to fuel bone and the marrow niche during energy deficits.* Elife, 2022. **11**.
- 86. Sulston, R.J. and W.P. Cawthorn, *Bone marrow adipose tissue as an endocrine organ: close to the bone?* Horm Mol Biol Clin Investig, 2016. **28**(1): p. 21-38.
- 87. Suchacki, K.J., et al., *Bone marrow adipose tissue is a unique adipose subtype with distinct roles in glucose homeostasis.* Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 3097.

- Tencerova, M., et al., *High-Fat Diet-Induced Obesity Promotes Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue and Impairs Skeletal Stem Cell Functions in Mice.* J Bone Miner Res, 2018. **33**(6): p. 1154-1165.
- 89. Kang, L., et al., *Hyaluronan accumulates with high-fat feeding and contributes to insulin resistance.* Diabetes, 2013. **62**(6): p. 1888-96.
- 90. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Inflammatory mechanisms in obesity.* Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 415-45.
- 91. Sulston, R.J., et al., *Increased Circulating Adiponectin in Response to Thiazolidinediones: Investigating the Role of Bone Marrow Adipose Tissue.* Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 128.
- Rasouli, N., et al., Increased plasma adiponectin in response to pioglitazone does not result from increased gene expression. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006.
 290(1): p. E42-E46.
- 93. Cawthorn, W.P., et al., *Expansion of Bone Marrow Adipose Tissue During Caloric Restriction Is Associated With Increased Circulating Glucocorticoids and Not With Hypoleptinemia.* Endocrinology, 2016. **157**(2): p. 508-21.
- 94. Newton, A.L., et al., *The relationships among total body fat, bone mineral content and bone marrow adipose tissue in early-pubertal girls.* Bonekey Rep, 2013. **2**: p. 315.
- 95. Ermetici, F., et al., *Bone marrow fat contributes to insulin sensitivity and adiponectin secretion in premenopausal women.* Endocrine, 2018. **59**(2): p. 410-418.
- 96. Gasparrini, M., et al., *Differential expression of cytokines in subcutaneous and marrow fat of aging C57BL/6J mice.* Exp Gerontol, 2009. **44**(9): p. 613-8.
- 97. Liu, L.F., et al., *Characterization of age-related gene expression profiling in bone marrow and epididymal adipocytes.* BMC Genomics, 2011. **12**: p. 212.
- 98. Fan, Y., et al., *Parathyroid Hormone Directs Bone Marrow Mesenchymal Cell Fate.* Cell Metab, 2017. **25**(3): p. 661-672.
- 99. Naveiras, O., et al., *Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment.* Nature, 2009. **460**(7252): p. 259-63.
- 100. 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.* Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(16): p. 11410-11420.
- 101. Tencerova, M., et al., *Metabolic programming determines the lineagedifferentiation fate of murine bone marrow stromal progenitor cells.* Bone Res, 2019. **7**: p. 35.
- 102. Gunaratnam, K., et al., *Mechanisms of palmitate-induced lipotoxicity in human osteoblasts.* Endocrinology, 2014. **155**(1): p. 108-16.
- 103. Martin, P.J., et al., *Adipogenic RNAs are transferred in osteoblasts via bone marrow adipocytes-derived extracellular vesicles (EVs)*. BMC Cell Biol, 2015. **16**: p. 10.
- 104. Takeshita, S., et al., *Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL*. J Biol Chem, 2014. **289**(24): p. 16699-710.
- 105. Hu, Y., et al., *RANKL* from bone marrow adipose lineage cells promotes osteoclast formation and bone loss. EMBO Rep, 2021. **22**(7): p. e52481.
- 106. Devlin, M.J., et al., *Early-onset type 2 diabetes impairs skeletal acquisition in the male TALLYHO/JngJ mouse.* Endocrinology, 2014. **155**(10): p. 3806-16.
- 107. Kim, T.Y. and A.L. Schafer, *Diabetes and Bone Marrow Adiposity.* Curr Osteoporos Rep, 2016. **14**(6): p. 337-344.
- 108. Walji, T.A., et al., *Marrow Adipose Tissue Expansion Coincides with Insulin Resistance in MAGP1-Deficient Mice.* Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 87.

- 109. Irwin, R., et al., *Normal bone density obtained in the absence of insulin receptor expression in bone.* Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5760-7.
- 110. Qiang, G., et al., *Lipodystrophy and severe metabolic dysfunction in mice with adipose tissue-specific insulin receptor ablation.* Mol Metab, 2016. **5**(7): p. 480-490.
- 111. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
- 112. Barrett, T.J., et al., *Diabetes-mediated myelopoiesis and the relationship to cardiovascular risk.* Ann N Y Acad Sci, 2017. **1402**(1): p. 31-42.
- 113. Spinetti, G., et al., *Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway.* Circ Res, 2013. **112**(3): p. 510-22.
- 114. Adler, B.J., et al., *High fat diet rapidly suppresses B lymphopoiesis by disrupting the supportive capacity of the bone marrow niche.* PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90639.
- 115. Nagareddy, P.R., et al., *Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity.* Cell Metab, 2014. **19**(5): p. 821-35.
- 116. Swirski, F.K., et al., *Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata.* J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 195-205.
- 117. Castoldi, A., et al., *The Macrophage Switch in Obesity Development*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 637.
- 118. Fink, L.N., et al., *Pro-inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans.* Obesity (Silver Spring), 2014. **22**(3): p. 747-57.
- 119. Griffin, C., et al., *TLR4, TRIF, and MyD88 are essential for myelopoiesis and CD11c(+) adipose tissue macrophage production in obese mice.* J Biol Chem, 2018. **293**(23): p. 8775-8786.
- 120. Lontchi-Yimagou, E., et al., *Diabetes Mellitus and Inflammation.* Current Diabetes Reports, 2013. **13**(3): p. 435-444.
- Boden, G., *Obesity and free fatty acids.* Endocrinol Metab Clin North Am, 2008.
 37(3): p. 635-46, viii-ix.
- 122. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
- Cornish, J., T. Wang, and J.M. Lin, *Role of Marrow Adipocytes in Regulation of Energy Metabolism and Bone Homeostasis*. Curr Osteoporos Rep, 2018. **16**(2): p. 116-122.
- 124. Kennedy, D.E. and K.L. Knight, *Inhibition of B Lymphopoiesis by Adipocytes and IL-1-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells.* J Immunol, 2015. **195**(6): p. 2666-74.
- 125. Zhao, E., et al., *Bone marrow and the control of immunity*. Cell Mol Immunol, 2012. **9**(1): p. 11-9.
- 126. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells.* Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
- 127. Zhao, X., et al., *Interactions of Hematopoietic Stem Cells with Bone Marrow Niche*. Methods Mol Biol, 2021. **2346**: p. 21-34.
- 128. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology.* Cell, 2008. **132**(4): p. 631-644.
- 129. Poller, W.C., M. Nahrendorf, and F.K. Swirski, *Hematopoiesis and Cardiovascular Disease.* Circulation Research, 2020. **126**(8): p. 1061-1085.
- 130. Austin, M.J., et al., *Turning the spotlight on bone marrow adipocytes in haematological malignancy and non-malignant conditions.* British Journal of Haematology, 2023. **201**(4): p. 605-619.

- 131. Tavassoli, M. and A. Friedenstein, *Hemopoietic stromal microenvironment.* Am J Hematol, 1983. **15**(2): p. 195-203.
- 132. Lichtman, M.A., *The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review.* Exp Hematol, 1981. **9**(4): p. 391-410.
- 133. Allen, T.D., T.M. Dexter, and P.J. Simmons, *Marrow biology and stem cells.* Immunol Ser, 1990. **49**: p. 1-38.
- 134. Li, Z., et al., *Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues.* Bone, 2018. **110**: p. 134-140.
- 135. Belaid-Choucair, Z., et al., *Human bone marrow adipocytes block granulopoiesis through neuropilin-1-induced granulocyte colony-stimulating factor inhibition.* Stem Cells, 2008. **26**(6): p. 1556-64.
- 136. Mattiucci, D., et al., *Bone marrow adipocytes support hematopoietic stem cell survival.* J Cell Physiol, 2018. **233**(2): p. 1500-1511.
- 137. Ding, L., et al., *Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells.* Nature, 2012. **481**(7382): p. 457-U65.
- 138. Zhou, B.O., et al., *Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF.* Nat Cell Biol, 2017. **19**(8): p. 891-903.
- 139. Tabe, Y., M. Konopleva, and M. Andreeff, *Fatty Acid Metabolism, Bone Marrow Adipocytes, and AML.* Front Oncol, 2020. **10**: p. 155.
- 140. Feng, T., et al., *Adipocyte-derived lactate is a signalling metabolite that potentiates adipose macrophage inflammation via targeting PHD2.* Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 5208.
- 141. Gimble, J.M., et al., *Playing with bone and fat.* J Cell Biochem, 2006. **98**(2): p. 251-66.
- 142. Cartwright, M.J., T. Tchkonia, and J.L. Kirkland, *Aging in adipocytes: potential impact of inherent, depot-specific mechanisms.* Exp Gerontol, 2007. **42**(6): p. 463-71.
- 143. Kirkland, J.L., et al., *Adipogenesis and aging: does aging make fat go MAD?* Exp Gerontol, 2002. **37**(6): p. 757-67.
- 144. Yeung, D.K., et al., Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: a proton MR spectroscopy study. J Magn Reson Imaging, 2005. **22**(2): p. 279-85.
- 145. Craft, C.S., et al., *Bone marrow adipose tissue does not express UCP1 during development or adrenergic-induced remodeling.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 17427.
- 146. Confavreux, C.B., R.L. Levine, and G. Karsenty, *A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms.* Mol Cell Endocrinol, 2009. **310**(1-2): p. 21-9.
- 147. van Gastel, N. and G. Carmeliet, *Metabolic regulation of skeletal cell fate and function in physiology and disease.* Nat Metab, 2021. **3**(1): p. 11-20.
- 148. Rendina-Ruedy, E. and C.J. Rosen, *Lipids in the Bone Marrow: An Evolving Perspective*. Cell Metab, 2020. **31**(2): p. 219-231.
- 149. Guntur, A.R., et al., Osteoblast-like MC3T3-E1 Cells Prefer Glycolysis for ATP Production but Adipocyte-like 3T3-L1 Cells Prefer Oxidative Phosphorylation. J Bone Miner Res, 2018. **33**(6): p. 1052-1065.
- 150. Tencerova, M., et al., *Obesity-Associated Hypermetabolism and Accelerated Senescence of Bone Marrow Stromal Stem Cells Suggest a Potential Mechanism for Bone Fragility.* Cell Rep, 2019. **27**(7): p. 2050-2062 e6.
- 151. Ning, K., et al., *Update on the effects of energy metabolism in bone marrow mesenchymal stem cells differentiation.* Mol Metab, 2022. **58**: p. 101450.
- 152. 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.
- 153. Theocharis, A.D., et al., *Extracellular matrix structure.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2016. **97**: p. 4-27.
- 154. 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.
- 155. Khan, T., et al., *Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(6): p. 1575-91.
- 156. Catalan, V., et al., *Role of extracellular matrix remodelling in adipose tissue pathophysiology: relevance in the development of obesity.* Histol Histopathol, 2012. **27**(12): p. 1515-28.
- 157. Mariman, E.C.M. and P. Wang, *Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010. **67**(8): p. 1277-1292.
- Maquoi, E., et al., Modulation of adipose tissue expression of murine matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors with obesity. Diabetes, 2002. 51(4): p. 1093-101.
- 159. 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.
- Siasos, G., et al., Inflammatory Mechanisms in Atherosclerosis: The Impact of Matrix Metalloproteinases. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2012. 12(10): p. 1132-1148.
- 161. Lin, D., T.H. Chun, and L. Kang, *Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance.* Biochemical Pharmacology, 2016. **119**: p. 8-16.
- 162. Williams, A.S., L. Kang, and D.H. Wasserman, *The extracellular matrix and insulin resistance.* Trends Endocrinol Metab, 2015. **26**(7): p. 357-66.
- 163. Zhu, Y., C. Crewe, and P.E. Scherer, *Hyaluronan in adipose tissue: Beyond dermal filler and therapeutic carrier.* Sci Transl Med, 2016. **8**(323): p. 323ps4.
- 164. Grandoch, M., P.L. Bollyky, and J.W. Fischer, *Hyaluronan: A Master Switch Between Vascular Homeostasis and Inflammation.* Circ Res, 2018. **122**(10): p. 1341-1343.
- 165. Necas, J., et al., *Hyaluronic acid (hyaluronan): a review.* Veterinarni Medicina, 2008. **53**(8): p. 397-411.
- Itano, N. and K. Kimata, *Mammalian hyaluronan synthases*. IUBMB Life, 2002.
 54(4): p. 195-9.
- 167. Hascall, V.C., et al., *The dynamic metabolism of hyaluronan regulates the cytosolic concentration of UDP-GlcNAc.* Matrix Biol, 2014. **35**: p. 14-7.
- 168. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases.* J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
- 169. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases.* Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 221-64.
- 170. Reiprich, S., et al., Adhesive Properties of the Hyaluronan Pericellular Coat in Hyaluronan Synthases Overexpressing Mesenchymal Stem Cells. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(11).
- 171. Tammi, R.H., et al., *Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis.* FEBS J, 2011. **278**(9): p. 1419-28.
- 172. 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.
- 173. 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.
- 174. Termeer, C., J.P. Sleeman, and J.C. Simon, *Hyaluronan--magic glue for the regulation of the immune response?* Trends Immunol, 2003. **24**(3): p. 112-4.

- 175. Bourguignon, V. and B. Flamion, *Respective roles of hyaluronidases 1 and 2 in endogenous hyaluronan turnover.* FASEB J, 2016. **30**(6): p. 2108-14.
- 176. Spataro, S., et al., *CEMIP (HYBID, KIAA1199): structure, function and expression in health and disease.* FEBS J, 2023. **290**(16): p. 3946-3962.
- 177. Nagaoka, A., et al., *Regulation of Hyaluronan (HA) Metabolism Mediated by HYBID (Hyaluronan-binding Protein Involved in HA Depolymerization, KIAA1199) and HA Synthases in Growth Factor-stimulated Fibroblasts.* J Biol Chem, 2015. **290**(52): p. 30910-23.
- 178. Soltes, L., et al., *Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan*. Biomacromolecules, 2006. **7**(3): p. 659-68.
- 179. Jiang, D., J. Liang, P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases.* Physiol Rev, 2011. **91**(1): 221-64.
- 180. Zhang, G., et al., *CD44 clustering is involved in monocyte differentiation*. Acta Biochim Biophys Sin, 2014. **46**:540-547.
- 181. Sherman, L., et al., *Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression.* Curr Opin in Cell Biol, 1994. **6**(5): 726-33.
- 182. Orian-Rousseau, V., et al., *CD44 Acts as a Signaling Platform Controlling Tumor Progression and Metastasis.* Front Immunol, 2015. **6**:154.
- 183. Kodama, K., et al., *Expression-based genome-wide association study links the receptor CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes.* PNAS, 2012.**109**(18):7049-54.
- 184. 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**:867-875.
- 185. Levesque, M.C. and B.F. Haynes, *In vitro culture of human peripheral blood monocytes induces hyaluronan binding and up-regulates monocyte variant CD44 isoform expression.* J Immunol, 1996. **156**(4): p. 1557-65.
- 186. Ruffell, B., et al., *Differential use of chondroitin sulfate to regulate hyaluronan binding by receptor CD44 in Inflammatory and Interleukin 4-activated Macrophages.* J Biol Chem, 2011. **286**(22): p. 19179-90.
- 187. DeGrendele, H.C., et al., *CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation.* J Immunol, 1997. **159**(6): p. 2549-53.
- 188. Lee-Sayer, S.S.M., et al., *CD44-mediated hyaluronan binding marks proliferating hematopoietic progenitor cells and promotes bone marrow engraftment.* PLoS One, 2018. **13**(4): p. e0196011.
- 189. Khaldoyanidi, S., A. Denzel, and M. Zoller, *Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells.* J Leukoc Biol, 1996. **60**(5): p. 579-92.
- 190. Vogeley, C., et al., *The regulatory effect of hyaluronan on human mesenchymal stem cells' fate modulates their interaction with cancer cells in vitro.* Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 21229.
- 191. Qu, C., et al., *Extensive CD44-dependent hyaluronan coats on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced by hyaluronan synthases HAS1, HAS2 and HAS3.* Int J Biochem Cell Biol, 2014. **48**: p. 45-54.
- 192. Musale, V., D.H. Wasserman, and L. Kang, *Extracellular matrix remodelling in obesity and metabolic disorders*. Life Metab, 2023. **2**(4).
- 193. Crewe, C., Y.A. An, and P.E. Scherer, *The ominous triad of adipose tissue dysfunction: inflammation, fibrosis, and impaired angiogenesis.* J Clin Invest, 2017. **127**(1): p. 74-82.
- 194. Gorski, D.J., et al., *Cardiac fibroblast activation and hyaluronan synthesis in response to hyperglycemia and diet-induced insulin resistance.* Scientific Reports, 2019. **9**(1).

- 195. 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.
- 196. 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.
- 197. Chen, P.Y., L.L. Huang, and H.J. Hsieh, *Hyaluronan preserves the proliferation and differentiation potentials of long-term cultured murine adipose-derived stromal cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **360**(1): p. 1-6.
- 198. 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.
- 199. Zhu, Y., et al., *Hyaluronan in adipogenesis, adipose tissue physiology and systemic metabolism.* Matrix Biol, 2019. **78-79**: p. 284-291.
- 200. 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.
- 201. Moretto, P., et al., *Regulation of hyaluronan synthesis in vascular diseases and diabetes.* J Diabetes Res, 2015. **2015**: p. 167283.
- 202. Avtanski, D., et al., *Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity.* Animal Model Exp Med, 2019. **2**(4): p. 252-258.
- 203. Speakman, J.R., *Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity*. International Journal of Obesity, 2019. **43**(8): p. 1491-1492.
- 204. Kobayashi, N., et al., *Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization.* Cancer Res, 2010. **70**(18): p. 7073-83.
- 205. 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.
- 206. Seibler, J., et al., *Rapid generation of inducible mouse mutants.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(4): p. e12.
- 207. Divakaruni, A.S., et al., *Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data.* Methods Enzymol, 2014. **547**: p. 309-54.
- Ramirez, A.K., et al., Integrating Extracellular Flux Measurements and Genome-Scale Modeling Reveals Differences between Brown and White Adipocytes. Cell Rep, 2017. 21(11): p. 3040-3048.
- 209. Bohm, A., et al., *Increased mitochondrial respiration of adipocytes from metabolically unhealthy obese compared to healthy obese individuals.* Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 12407.
- 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.
- 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.
- 212. Ye, J., *Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance.* Int J Obes (Lond), 2009. **33**(1): p. 54-66.
- 213. Wang, A., et al., *Hyaluronan matrices in pathobiological processes.* FEBS J, 2011. **278**(9): p. 1412-8.
- 214. 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.

- 215. Goncharova, V., et al., *Hyaluronan expressed by the hematopoietic microenvironment is required for bone marrow hematopoiesis.* J Biol Chem, 2012. **287**(30): p. 25419-33.
- 216. Benova, A. and M. Tencerova, *Obesity-Induced Changes in Bone Marrow Homeostasis.* Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 294.
- 217. Bronte, V. and M.J. Pittet, *The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity.* Immunity, 2013. **39**(5): p. 806-818.
- 218. Chuang, C.C., et al., *Hyperglycemia enhances adipogenic induction of lipid accumulation: involvement of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2, phosphoinositide 3-kinase/Akt, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling.* Endocrinology, 2007. **148**(9): p. 4267-75.
- Osawa, M., et al., Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. Science, 1996. 273(5272): p. 242-5.
- 220. Ota, T., *Chemokine systems link obesity to insulin resistance*. Diabetes Metab J, 2013. **37**(3): p. 165-72.
- 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.
- 222. 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.
- 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.
- 224. Wang, Y., et al., *Hyaluronan synthase 2 protects skin fibroblasts against apoptosis induced by environmental stress.* J Biol Chem, 2014. **289**(46): p. 32253-32265.
- 225. Cai, X., et al., Lactate activates the mitochondrial electron transport chain independently of its metabolism. Molecular cell, 2023. **83**(21): p. 3904-3920.e7.
- 226. DiGirolamo, M., F.D. Newby, and J. Lovejoy, *Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications.* FASEB J, 1992. **6**(7): p. 2405-12.
- 227. Krycer, J.R., et al., *Lactate production is a prioritized feature of adipocyte metabolism.* J Biol Chem, 2020. **295**(1): p. 83-98.
- 228. Li, H.M., et al., *Inhibition of glycolysis by targeting lactate dehydrogenase A facilitates hyaluronan synthase 2 synthesis in synovial fibroblasts of temporomandibular joint osteoarthritis.* Bone, 2020. **141**: p. 115584.
- 229. Khaldoyanidi, S.K., et al., *Hyaluronan in the Healthy and Malignant Hematopoietic Microenvironment.* Hyaluronan Signaling and Turnover, 2014. **123**: p. 149-189.
- 230. Matrosova, V.Y., et al., *Hyaluronic acid facilitates the recovery of hematopoiesis following 5-fluorouracil administration.* Stem Cells, 2004. **22**(4): p. 544-55.
- 231. Murphy, T.L., et al., *Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5258-67.
- Schraufstatter, I., et al., Hyaluronan stimulates mobilization of mature hematopoietic cells but not hematopoietic progenitors. J Stem Cells, 2009. 4(4): p. 191-202.
- DeGrendele, H.C., P. Estess, and M.H. Siegelman, *Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site.* Science, 1997. 278(5338): p. 672-5.

- Mathews, S., et al., *Glycosaminoglycans enhance osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells.* J Tissue Eng Regen Med, 2014. 8(2): p. 143-52.
- Adams, J.R., G. Sander, and S. Byers, *Expression of hyaluronan synthases and hyaluronidases in the MG63 osteoblast cell line.* Matrix Biol, 2006. 25(1): p. 40-6.
- 236. Pendyala, M., et al., Loss of hyaluronan synthases impacts bone morphology, quality, and mechanical properties. Bone, 2023. **172**.
- 237. Chang, E.J., et al., *Hyaluronan inhibits osteoclast differentiation via Toll-like receptor 4.* J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 1): p. 166-76.
- 238. Cao, J.J., et al., *Hyaluronan increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through CD44*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(1): p. 30-40.
- 239. Luo, N., et al., *CD44 and hyaluronan promote the bone morphogenetic protein 7 signaling response in murine chondrocytes.* Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(6): p. 1547-58.
- 240. Peterson, R.S., et al., *CD44 modulates Smad1 activation in the BMP-7 signaling pathway.* J Cell Biol, 2004. **166**(7): p. 1081-91.
- 241. Zhang, S., et al., *Bone marrow adipocytes fuel emergency hematopoiesis after myocardial infarction.* Nature Cardiovascular Research, 2023. **2**(12): p. 1277–1290.

11. Konferenzbeiträge

Vorträge:

<u>Katja Wegener</u>, Laura-Marie Lahu, Oliver Steinhoff, Tim Georg Seher, Stefan Lehr, Sonja Hartwig, Uli Flögel, Maria Grandoch

Investigating the HA-rich matrix in bone marrow adipose tissue during type 2 diabetes mellitus

14th International Conference of the International Society for Hyaluronan Science (ISHAS), Portland Oregon, USA, 2023

<u>Katja Wegener</u>, Laura-Marie Lahu, Oliver Steinhoff, Tim Georg Seher, Stefan Lehr, Sonja Hartwig, Uli Flögel, Maria Grandoch

Investigating the HA-rich matrix in bone marrow adipose tissue during type 2 diabetes mellitus

Diabetes Kongress, DDG, Berlin, 2023

<u>Katja Wegener</u>, Laura-Marie Lahu, Oliver Steinhoff, Tim Georg Seher, Stefan Lehr, Sonja Hartwig, Uli Flögel, Maria Grandoch

Regulation of Hyaluronan in Bone Marrow Adipose Tissue

7th International Meeting of Bone Marrow Adiposity, Athens, Greece, 2022

Poster:

Katja Wegener, Laura-Marie Lahu, Oliver Steinhoff, Uli Flögel, Maria Grandoch

Hyaluronan matrix in bone marrow adipose tissue: implications for the development and progression of insulin resistance

7th German Pharm-Tox Summit of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT), virtuell, 2022

Katja Wegener, Laura-Marie Lahu, Uli Flögel, Maria Grandoch

Hyaluronan matrix in bone marrow adipose tissue: implications for the development and progression of insulin resistance

1st BMAS Summer School, virtuell, 2021

12. Lebenslauf

Person	
Name	Katja Heller geb. Wegener
Geburtsdatum	30.11.1995
Geburtsort	Aachen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Promotion	
09/2020-03/2024	Institut für Translationale Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
	Doktormutter: Prof. Dr. med. Maria Grandoch
	Titel: Untersuchung der Hyaluronsäure-reichen Matrix im
	Fettgewebe des Knochenmarks während der Entwicklung und
	Progression von Typ 2 Diabetes Mellitus
Studium	
10/2018-08/2020	Master of Science, Molekulare Biomedizin
10/2015-00/2018	Bachelor of Science, Biologie
10/2013-03/2010	Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Schule	
08/2005- 07/2014	Kaiser-Karls-Gymnasium, Aachen
09/2001 -08/2005	KGS Birkstraße, Aachen

13. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Maria Grandoch für die Überlassung des Projektes und die intensive Betreuung während meiner Promotion. Nebst zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen möchte ich ihr an dieser Stelle danken, dass sie abseits des Laboralltags stets versucht hat, die Freude an der Wissenschaft zu vermitteln. Vielen Dank auch für das stets offene Ohr für Anliegen aller Art und natürlich nicht nur für die Möglichkeit, sondern auch für die lehr- und erlebnisreiche Zeit im Rahmen der Kongressteilnahmen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller danke ich für die Übernahme des Koreferats sowie und die herausfordernden Kegelduelle im Rahmen des *Retreats*.

Besonders dankbar bin ich für die Möglichkeit, als Stipendiatin Teil der *Research Training Group* 2576 "vivid" sein zu dürfen. Ebenso möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern für die unkomplizierte und meist zielführende Zusammenarbeit herzlich bedanken.

Selbstverständlich gilt ein großes Dankeschön allen Mitarbeitern des Instituts für Translationale Pharmakologie der Universität Düsseldorf für die großartige Zusammenarbeit. Kerstin Freidel, Peggy Mara-Mann und Annika Zimmermann waren immer bereit, viele kleine und die eine oder andere große experimentelle Hürde mit mir zu überwinden. Erwähnenswert sind auch die vielen gemeinsamen Stunden im Büro, hoffentlich mit 10-11Uhr Kaffee plus Keksen und vielen Gesprächen mit Annika. Meinen (ehemaligen) Mitdoktorand/innen Shakila Mir, Viola Niemann, Rachel Nega und Maren Döring sowie Arne Beran danke ich für die stets helfenden Hände, die harmonische Arbeitsatmosphäre, den einen oder anderen "Manifestationsmoment" und die vielen lustigen Stunden abseits der Arbeit. Bedanken möchte ich mich bei Marco Piroth nicht nur für das Korrekturlesen meiner Arbeit, sondern auch für seine Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht.

Zu guter Letzt möchte ich auch meinem persönlichen Umfeld ein großes Dankeschön aussprechen. Neben meinen Freunden und meiner Familie ist dies natürlich in erster Linie mein Mann Mats Heller, dem ich auch an dieser Stelle für seine bedingungslose und unermüdliche Unterstützung, seinen Rat und auch seine Geduld danken möchte.

14. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig 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 16.01.2024

Katja Heller