

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

Charakterisierung der Hyaluronsäure- Matrix während der Differenzierung von Knochenmarkdipozyten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Laura-Marie Lahu

2025

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Timm Filler

Für Gjyshi

Zusammenfassung

Im menschlichen Organismus kommen verschiedene Fettgewebstypen vor, wobei das weiße und braune Fettgewebe die geläufigsten Gruppen sind. Ein neues und bislang wenig erforschtes Fettgewebsdepot ist das im Knochen lokalisierte Knochenmarkfettgewebe (*bone marrow adipose tissue*, BMAT), welches einen signifikanten Anteil des menschlichen Knochenmarks als Ort der Hämatopoese ausmacht. BMAT fungiert nicht nur als Energiespeicher, sondern auch als eigenständiges dynamisches Gewebe mit sekretorischen Eigenschaften, welches eine Reihe bioaktiver Mediatoren einschließlich spezifischer Adipokine und Zytokine freisetzt. Neben lokalen Effekten auf Knochenmetabolismus, Hämatopoese und Entzündungsantwort rückt das vielseitige Gewebe zunehmend in den Fokus des Forschungsinteresses, da es möglicherweise auch systemische Effekte auf die Energiehomöostase ausübt. So ist beschrieben, dass BMAT als pathologische Reaktion auf metabolische Prozesse wie Typ 2 Diabetes mellitus aber auch Anorexia nervosa seine Größe und Zusammensetzung maßgeblich verändern und anpassen kann. Die genauen Mechanismen sind bislang unbekannt. Im Kontext der vielfältigen BMAT-Funktionen könnte das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA) eine Rolle spielen, welches eine Vielzahl an Funktionen in Zell-Zell Kontakten einnimmt. In diversen Studien wird HA als funktional relevantes Molekül in der extrazellulären Matrix sowohl im braunen als auch im weißen Fettgewebe bei der Regulation des Stoffwechsels und inflammatorischer Kaskaden beschrieben. Zurzeit ist unbekannt, ob eine HA-Matrix auch im BMAT vorliegt. Die genauen Funktionen und Mechanismen von HA im BMAT sind daher Gegenstand intensiver Forschung. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung eines *in vitro*-Modells zur Differenzierung und Kultivierung isolierter muriner Knochenmarkadipozyten (*bone marrow adipocytes*, BMAds), um die Präsenz und Funktion einer HA-Matrix in diesen Zellen zu untersuchen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Präadipozyten im frühen Differenzierungsprozess HA sekretierten. Für die Expressionsanalyse relevanter HA-Synthasen wurde eine quantitative Polymerasekettenreaktion im Verlauf der Differenzierung von BMAds durchgeführt. Die Daten zeigten, dass das Gen *Has2* als die dominante Isoform der HA-Synthasen in BMAds exprimiert wurde. Die Genexpression der murinen HA-Rezeptoren *Cd44* (*cluster of differentiation 44*) und *Hmhr* (*Hyaluronan-mediated motility receptor gene*) wurde während der adipogenen Differenzierung herunterreguliert. Zudem wurde der Einfluss einer HA-Inhibition durch das Pharmakon 4-Methylumbelliferon (4-MU) auf die Differenzierung von BMAds analysiert. Die Hemmung der HA-Synthese mittels 4-MU führte zu einer verringerten Bildung von BMAds.

Zusammenfassend belegt die vorliegende Forschungsarbeit das Vorhandensein einer HA-reichen Matrix in BMAds, deren Modulation während der Zellreifung und -differenzierung neue therapeutische Zielstrukturen im Knochenmarkfettgewebe aufzeigt.

Summary

In the human organism, various types of adipose tissue exist, with white and brown adipose tissue being the most common groups. A new and previously under-researched adipose tissue depot is bone marrow adipose tissue (BMAT), which constitutes a significant portion of the human bone marrow as the site of hematopoiesis. BMAT functions not only as an energy storage but also as an independent dynamic tissue with secretory properties, releasing a range of bio-active mediators including specific adipokines and cytokines. Besides its local effects on bone metabolism, hematopoiesis, and inflammatory responses, this versatile tissue is increasingly gaining research interest due to its potential systemic effects on energy homeostasis. It has been described that BMAT can significantly change and adapt its size and composition as a pathological response to metabolic processes such as type 2 diabetes mellitus and anorexia nervosa. The exact mechanisms are still unknown. In the context of the diverse functions of BMAT, the glycosaminoglycan hyaluronic acid (HA) might play a role, as it is involved in glucose metabolism and performs various functions in cell-cell interactions. Numerous studies describe HA as a functionally relevant molecule in the extracellular matrix of both brown and white adipose tissue, regulating metabolism and inflammatory cascades. It is currently unknown whether an HA matrix also exists in BMAT. Therefore, the precise functions and mechanisms of HA in BMAT are the subject of intensive research.

The present study aimed to establish an *in vitro* model for the differentiation and cultivation of isolated murine bone marrow adipocytes (BMAds) to investigate the presence and function of an HA matrix in these cells. It was demonstrated that preadipocytes secreted HA in the early differentiation process. For the expression analysis of relevant HA synthases (HAS), quantitative polymerase chain reaction was performed during the differentiation of BMAds. The results show that *Has2* is expressed as the dominant isoform of HA synthases in BMAT. The gene expression of the murine HA receptors *Cd44* (cluster of differentiation 44) and *Hmnr* (hyaluronan-mediated motility receptor gene) was downregulated during adipogenic differentiation. Additionally, the impact of HA inhibition by the drug 4-Methylumbelliferone (4-MU) on the differentiation of BMAds was analyzed. Inhibition of HA synthesis using 4-MU resulted in reduced formation of bone marrow adipocytes.

In summary, this research highlights the presence of an HA-rich matrix in BMAds and its modulation during cell maturation and differentiation, thereby revealing new therapeutic targets in bone marrow adipose tissue.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	<i>adipogenic cocktail</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
BAT	braunes Fettgewebe von <i>brown adipose tissue</i>
BMAbs	Knochenmarkadipozyten von <i>bone marrow adipocytes</i>
BMAT	Knochenmarkfettgewebe von <i>bone marrow adipose tissue</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
CD44/ <i>Cd44</i>	<i>Cluster of differentiation 44</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
cm	Centimeter
CHCl ₃	Summenformel Chloroform
Da/kDa	Dalton/Kilodalton, Maßeinheit für die Molekülmasse
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DM0,1,2	Differenzierungsmedium 0, 1, 2
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DPP4	Dipeptidyl-Peptidase 4
dx	Differenzierungstag x
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
et al.	und Andere
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fab4	Fettsäurebindungsprotein aP2
FCS	fetales Kälberserum
GlcA	Glukuronsäure von <i>glucuronic acid</i>
GlcNac	N-Acetylglukosamin
H ₂ O	Summenformel Wasser
HA	Hyaluronsäure von <i>hyaluronic acid</i>
HABP	HA-bindungsspezifisches Protein
HAS	Hyaluronsäure-Synthase von <i>hyaluronic acid synthase</i>

<i>Hmnr</i>	murines Gen für RHAMM, <i>Hyaluronan-mediated motility receptor gene</i>
HMW-HA	Hochmolekulare HA von <i>high molecular weight HA</i>
HYAL	Hyaluronidase
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthine
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL-6/IL-8	Interleukin-6/Interleukin-8
L	Liter
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LepR	Leptin-Rezeptor
LYVE1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i> , HA-Rezeptor
mL	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSZ	Mesenchymale Stammzelle
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NaOH	Natriumhydroxid
ORO	Ölrot-O Färbung von <i>oil red O staining</i>
Osx1	Transkriptionsfaktor Osterix
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>phosphate-buffered saline solution</i>
PCR/qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion von <i>polymerase chain reaction</i>
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor κB</i>
RHAMM	<i>Receptor for hyaluronan-mediated motility</i> , HA-Rezeptor
rpm	<i>rounds per minute</i>
SD	Standardabweichung von <i>standard deviation</i>

siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
TE	Trypsin-EDTA-Lösung
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
T2D	Diabetes mellitus Typ 2
UCP-1	<i>uncoupling protein 1</i>
UDP	Uridinphosphat
UGT	UDP-Glukuronosyltransferase
vgl.	vergleiche
WAT	weißes Fettgewebe von <i>white adipose tissue</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Substanzen in der Zellkultur	20
Tabelle 2:	Arzneistoffe in der Zellkultur	21
Tabelle 3:	Verwendete Geräte gesamt.....	21
Tabelle 4:	Verwendete Primersequenzen zur <i>messenger ribonucleic acid</i> (mRNA)- Genexpressionsanalyse	30
Tabelle 5:	Protokoll zur Ausführung einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR)	30

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Knochenmarkzusammensetzung im Laufe eines Menschenlebens, modifiziert nach Veldhuis-Vlug <i>et al.</i> , 2018, <i>Journal of Internal Medicine</i> (Lizenznummer: 5776031348359) [25]	5
Abb. 2: Schematische Übersicht der Adipozytentypen, modifiziert nach Sebo <i>et al.</i> , 2019, <i>Endocrine Reviews</i> (Lizenznummer: 5776031378484) [26]	6
Abb. 3: Molekülaufbau der Hyaluronsäure, modifiziert nach Marinho <i>et al.</i> , 2021 [59].....	12
Abb. 4: Chemische Struktur von 4-Methylumbelliferon, modifiziert nach Vitale <i>et al.</i> , 2021 [80].....	14
Abb. 5: Differenzierungsprotokoll der murinen tibialen Präadipozyten	24
Abb. 6: Differenzierungsprotokoll von OP9-Zellen.....	25
Abb. 7: Differenzierungsprotokoll vorbehandelter muriner Präadipozyten	32
Abb. 8: ORO-Färbung nach sechs Differenzierungstagen und mRNA-Expression von <i>Adipoq</i> in OP9-Zellen nach Differenzierungsinduktion.....	34
Abb. 9: HA-Sekretion und HA-assoziierte Gene während der Differenzierung von OP9-Zellen.....	36
Abb. 10: Differenzierung von Präadipozyten aus der Tibia von männlichen C57BL/6J Tiere im Zeitraum von zehn Tagen.....	38
Abb. 11: Ct-Werte und mRNA-Expression der HA-Synthasen <i>Has2</i> und <i>Has3</i> aus tibialen Präadipozyten von männlichen C57BL/6J-Tieren nach Differenzierungsinduktion	40
Abb. 12: mRNA-Expression der HA-Rezeptoren <i>Cd44</i> und <i>Hmhr</i> aus tibialen Präadipozyten von männlichen C57BL/6J-Tieren nach Differenzierungsinduktion	41
Abb. 13: HA-Sekretion im Reifungsprozess von Präadipozyten von männlichen C57BL/6J Mäusen	43
Abb. 14: Präadipozyten aus der Tibia von weiblichen C57BL/6J Tieren im Differenzierungsprozess im Zeitraum von 10 Tagen	44
Abb. 15: mRNA-Expression HA relevanter Gene in Präadipozyten aus der Tibia von weiblichen C57BL/6J Tieren im Differenzierungsprozess im Zeitraum von 10 Tagen.....	46

Abb. 16: Geschlechtsspezifischer Vergleich der HA-Sekretion in Präadipozyten
aus dem tibialen Knochenmarkstroma von männlichen und weiblichen
C57BL/6J Versuchstiere48

Abb. 17: Einfluss einer HA-Inhibition auf die Differenzierung von BMAds.....50

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Fettgewebsdepots	1
1.1.1 Weißes Fettgewebe	1
1.1.2 Braunes Fettgewebe	2
1.1.3 Beiges Fettgewebe	3
1.2 Knochenmarkfettgewebe	4
1.2.1 Vorkommen von Knochenmarkfettgewebe	4
1.2.2 Morphologie des Knochenmarkfetts	6
1.2.3 Einteilung Knochenmarkadipozyten	7
1.2.4 Adipogenese von Knochenmarkadipozyten	7
1.2.5 Sekretorische Eigenschaften von BMAT	8
1.2.6 Klinische Relevanz von BMAT	10
1.3 Extrazelluläre Matrix	11
1.4 Hyaluronsäure	11
1.4.1 Aufbau und Synthese der HA	12
1.4.2 HA-Rezeptoren	13
1.4.3 Therapeutische Implikation der HA-Inhibition	14
1.5 Vorkommen und Funktion der HA in Fettgeweben	15
1.6 Ziele	17
2. Material und Methoden	18

2.1	Organentnahme	18
2.2	Verwendete Tiere	18
2.3	Zellkultur	19
2.4	Isolation von Präadipozyten aus dem Knochenmarkfettgewebe	22
2.4.1	Präparation	22
2.4.2	Isolation von Knochenmarkadipozyten	22
2.4.3	Zellzahlbestimmung	23
2.4.4	Differenzierung zu Knochenmarkadipozyten	24
2.5	OP9-Zellen	24
2.5.1	Aussaat	24
2.5.2	Differenzierung zu Adipozyten	25
2.6	Öl- Rot-O-Färbung	26
2.6.1	Messung im Plattenlesegerät	26
2.6.2	Aufnahmen ORO-Färbung	27
2.7	Molekularbiologische Analysen	27
2.7.1	HA-Überstandsmessung mittels HA-Bindeprotein Sandwich ELISA-ähnlichem Assay	27
2.7.2	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time Polymerasekettenreaktion	28
2.8	Behandlungen von Präadipozyten mit 4-MU, <i>High molecular weight</i> -HA und Hyaluronidase	31
2.9	Statistische Analysen	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	Differenzierungsvorgang von OP9-Zellen	34
3.1.1	ORO-Färbung und genetischer Differenzierungsmarker	34
3.1.2	Veränderungen im HA-System während der Differenzierung von OP9-Zellen	35

3.2	Differenzierung von Präadipozyten aus männlichen C57BL/6J-Tieren	37
3.2.1	ORO-Färbung von Präadipozyten	37
3.3	Charakterisierung der HA-Matrix während der Differenzierung von Präadipozyten	39
3.3.1	Genexpressionsanalysen der HA-Gene	39
3.3.2	Veränderungen der HA-Sekretion im Reifungsprozess der BMAds	42
3.4	Differenzierungsvorgang von primären Zellen aus weiblichen C57BL/6J	44
3.4.1	ORO-Färbung und genetischer Differenzierungsmarker	44
3.4.2	mRNA-Expression HA-assoziiierter Gene während der Differenzierung	45
3.4.3	HA-Sekretion von Präadipozyten im Geschlechtervergleich	47
3.5	Einfluss einer HA-Inhibition auf die Differenzierung von Knochenmarkadipozyten	49
4.	Diskussion	51
4.1	Generierung eines Modells zur Differenzierung von Knochenmarkadipozyten	52
4.2	Charakterisierung der HA-Matrix in Knochenmarkadipozyten	56
4.2.1	Regulation der mRNA-Expression HA-assoziiierter Gene während der Adipogenese von Knochenmarkadipozyten	57
4.2.2	Geschlechtsspezifische Veränderungen der HA-Matrix während der Differenzierung von Knochenmarkadipozyten	59
4.3	Veränderungen der Adipogenese in Knochenmarkadipozyten nach HA-Inhibition	61
5.	Schlussfolgerung und Ausblick	63
6.	Literatur- und Quellenverzeichnis	65
7.	Anhang	71

1. Einleitung

1.1 Fettgewebsdepots

Fettgewebe ist für den menschlichen Körper weit mehr als nur ein Energiespeicher: Es fungiert auch als endokrin aktives Organ und spielt eine Rolle in der Regulation des Immunsystems. Für die Aufrechterhaltung der metabolischen Balance, greift der Körper hierbei auf unterschiedliche Fettreserven zurück, die eine Reihe von essenziellen Funktionen erfüllen.

1.1.1 Weißes Fettgewebe

Das weiße Fettgewebe (WAT, *white adipose tissue*) repräsentiert das primäre und umfangreichste Lipidspeicherdepot im menschlichen Organismus. Anatomisch sind die Hauptdepots des WAT vorrangig subkutan sowie viszeral, um die inneren Organe herum, positioniert [1]. Die funktionelle Rolle des WAT ist komplex und unerlässlich für die metabolische Homöostase des Körpers. WAT fungiert grundsätzlich als Hauptenergiespeicher des Körpers [1]. Die Adipozyten im WAT bestehen aus univakuolären Lipidtropfen, in denen Lipide gespeichert werden [2]. Überschüssige Kalorien werden in Form von Triacylglyceriden und anderen Lipiden gespeichert, welche bei Bedarf durch enzymatische Spaltung als freie Fettsäuren sowohl hormonell als auch durch das vegetative Nervensystem mobilisiert und für den metabolischen Verbrauch freigesetzt werden [1, 3]. Die Funktionen von WAT sind vielfältig. Durch seine Isoliereigenschaft trägt WAT zur Thermoregulation des Körpers bei, indem die Körperkerntemperatur konstant gehalten wird und der Wärmeverlust minimiert wird. Zudem dient es als Schutz vor mechanischem Stress und schützt die inneren Organe als eine Art Polster [1, 2]. Darüber hinaus agiert WAT auch als endokrines Organ, das eine Vielzahl von Hormonen und Zytokinen, bekannt als Adipokine, sezerniert. Diese Adipokine, zu denen auch Leptin zählt, sind wichtig in der Regulation des Energiehaushalts und des Appetits [4].

WAT nimmt eine zentrale Rolle im metabolischen Stoffwechsel ein, indem es den Glukosestoffwechsel und die Insulinsensitivität maßgeblich moduliert. Die Insulin-stimulierte Synthese von Triacylglyceriden aus freien Fettsäuren sowie die Glukoseaufnahme in die Zellen sind essenzielle Prozesse, die durch das Proteohormon Insulin gefördert werden [5].

Eine exzessive Akkumulation von WAT, verursacht durch chronische Überernährung, kann zu einer Dysregulation dieser metabolischen Funktionen führen. Im Zustand der Adipositas, charakterisiert durch eine übermäßige Ansammlung von Fettgewebe, kommt es zur Hypertrophie und Hyperplasie der Adipozyten. Adipositas wird durch den Body-Mass-Index (BMI) klassifiziert, der das Verhältnis von Körpergewicht zu Körperoberfläche quantifiziert, mit einem Schwellenwert von 25 kg/m² für Übergewicht und ab 30 kg/m² von Fettleibigkeit [6, 7]. Überschüssiges WAT kann zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine führen. Diese entzündlichen Prozesse im Fettgewebe fördern die Insulinresistenz, beispielsweise durch die Freisetzung hoher Konzentrationen an freien Fettsäuren, die zu Lipotoxizität führen und die Betazellen im Pankreas schädigen [8]. Insulinresistentes Gewebe zeigt eine verminderte Reaktion auf Insulin, was essenziell für die Glukoseaufnahme in die Zellen ist [8]. Die Konstellation aus Insulinresistenz, inflammatorischem Milieu und gestörtem Lipidmetabolismus erhöht das Risiko für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus (T2D), eine Erkrankung aus dem metabolischen Formenkreis [1, 3, 9]. Beim T2D führt eine verringerte Insulinempfindlichkeit in peripheren Geweben sowie eine gestörte Insulinsekretion der Betazellen des Pankreas zu chronisch erhöhten Blutzuckerspiegel [10]. Diese können mikro- und makroangiopathische Schädigungen an Organen wie den Augen, Nieren und dem Herz-Kreislauf-System nach sich ziehen [10].

1.1.2 Braunes Fettgewebe

Ein weiteres Fettdepot im menschlichen Organismus ist das braune Fettgewebe (BAT, *brown adipose tissue*). Lange wurde vermutet, dass BAT im Menschen nur beim Neugeborenen vorhanden sei. Allerdings besitzen auch Erwachsene BAT, welches vor allem supraklavikulär, mediastinal und paraspinal lokalisiert ist [3, 10]. Zum Ursprung von BAT ist bekannt, dass sich *myogenic factor 5 gene* (Myf5)-positive mesenchymale Vorläuferzellen im Gewebe zu Zellen differenzieren, die entweder zu Skelettmuskelzellen oder zu braunen Fettzellen werden [11]. Auf molekularer Ebene weisen die multilokulären Adipozyten im BAT eine hohe Mitochondriendichte auf und exprimieren UCP-1 (*uncoupling protein 1*): Das Protein ermöglicht die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, wodurch die Energie aus Nährstoffen direkt in Wärme umgewandelt wird, anstatt in ATP gespeichert zu werden [11, 12]. Die sogenannte Thermogenese

dient insbesondere Neugeborenen als Schutz vor Auskühlung [9]. Im adulten Zustand dagegen scheint die Aktivierung von BAT, den Energieverbrauch zu steigern und die Gewichtskontrolle zu verbessern [13].

Diverse Studien konnten nahelegen, dass eine inverse Korrelation zwischen BAT-Volumen und BMI besteht, sodass die Aktivierung von BAT einen innovativen Weg darstellen könnte, Stoffwechselerkrankungen zu reduzieren [14, 15]. Diese Fähigkeit macht BAT zu einem attraktiven Ziel für die Erforschung von Behandlungen metabolischer Erkrankungen. Forschungsgruppen nehmen an, dass die Stimulation von BAT einen therapeutischen Effekt in der Behandlung von Übergewicht und Insulinresistenz haben könnte [8, 12, 14].

1.1.3 Beiges Fettgewebe

Im menschlichen Körper existiert neben dem weißen und braunen Fettgewebe eine weitere Adipozytenpopulation, bekannt als beiges Fettgewebe. Dieses repräsentiert eine intermediäre Form des Fettgewebes, da es Merkmale sowohl des weißen als auch des braunen Fettgewebes aufweist. Mikroskopisch betrachtet, sind die beigen Adipozyten vereinzelt vor allem im inguinalen WAT lokalisiert [11]. Diese können bei Bewegung und beim Einsatz von PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) Agonisten hochreguliert werden [11]. Des Weiteren führt Kälteexposition im beigen Fettgewebe zu einer β_3 -adrenergen sympathischen Stimulation, sodass beige Adipozyten transient Eigenschaften ähnlich denen von BAT entwickeln: Die Aktivierung der Zellen führt zur Bildung multipler kleiner Lipidvakuolen im Zellinneren, was als *Browning* bezeichnet wird [16]. Die mitochondrienreichen Zellen entwickeln im Zuge des *Brownings* durch die Hochregulation von UCP-1 eine hohe thermogenetische Kapazität wie im BAT [16, 17]. Allerdings stammen beige Adipozyten nicht aus denselben Vorläuferzellen wie BAT. Es ist aktuell nicht klar, ob beiges Fettgewebe aus eigenen Vorläuferzellen oder sogar aus dem WAT selbst stammt [12, 16].

Die transitorischen Eigenschaften von beigem Fettgewebe führen auch zu großem Interesse in der Forschung: Die Forschungsgruppe um Min *et al.* konnten 2016 beispielsweise zeigen, dass die Aktivierung von beigen Adipozyten in einem murinen Modell zu einer Verbesserung der Glukosetoleranz und gesteigerten Energieverbrauch führte [18]. Neben Kälte und β_3 -adrenerger Stimulation erfolgt

die Aktivierung von beigem Fettgewebe durch eine Vielzahl an hormonellen und nicht-hormonellen Faktoren, welche aktuell noch erforscht werden [19].

1.2 Knochenmarkfettgewebe

1.2.1 Vorkommen von Knochenmarkfettgewebe

Das Knochenmarkfettgewebe ist ein erst kürzlich entdecktes Fettgewebe und wurde als eigenständiger Subtyp klassifiziert, welcher bislang allerdings kaum erforscht wurde.

Bone marrow adipose tissue (BMAT) befindet sich unter anderem in den langen Röhrenknochen innerhalb eines heterozellulären Knocheninnenraums. Dieser setzt sich hauptsächlich aus rotem blutbildendem und gelbem fettspeicherndem Knochenmark zusammen [20]. Unmittelbar nach der Geburt besteht das Knochenmark zunächst überwiegend aus hämatopoetischen Zellen, die postnatal physiologisch durch Adipozyten ersetzt werden [21]. In der Kindheit expandiert das gelbe Knochenmark zentrifugal ausgehend von der Diaphyse. Bis zum 25. Lebensjahr wird das hämatopoetische Gewebe in den distalen Röhrenknochen wie der Tibia, den vertebrealen Lendenwirbelkörpern und dem Femur, nahezu vollständig durch gelbes Knochenmarkfett ersetzt [22, 23]. Dieser Umbauprozess verläuft dabei von diaphysär nach metaphysär [24]. Abb. 1 demonstriert, wie das rote Knochenmark fast vollständig durch Knochenmarkfett bis zum 25. Lebensjahr ersetzt wird.

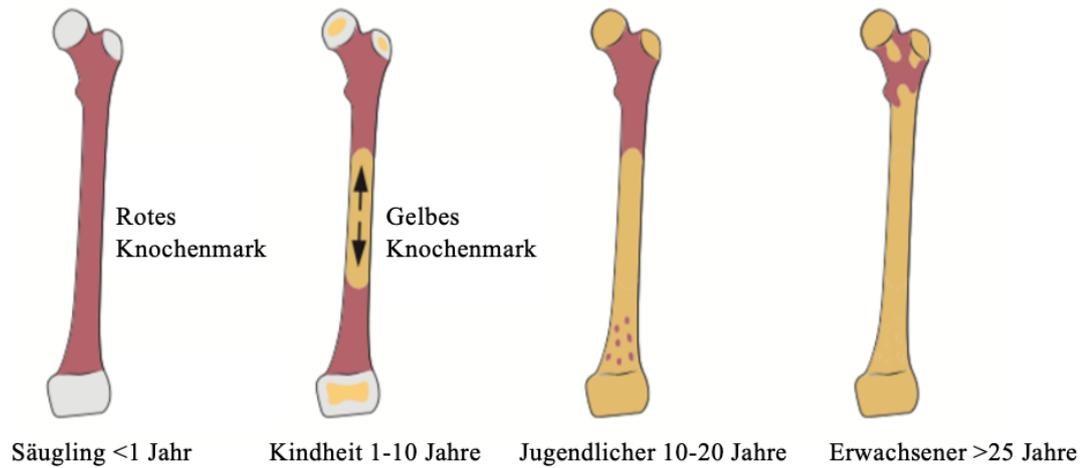


Abb. 1: Schematische Darstellung der Knochenmarkszusammensetzung im Laufe eines Menschenlebens, modifiziert nach Veldhuis-Vlug *et al.*, 2018, *Journal of Internal Medicine* (Lizenznummer: 5776031348359) [25]

Die Abb. bietet eine schematische Übersicht über die Veränderungen in der Zusammensetzung des Knochenmarks im Femur im Verlauf des menschlichen Lebens. Sie visualisiert die Entwicklung der verschiedenen Zelltypen und betont die Verschiebung zwischen rotem und gelbem fettreichem Knochenmark (Lizenznummer: 5776031348359).

1.2.2 Morphologie des Knochenmarkfetts

Das BMAT zeigt in Bezug auf seine Lokalisation, funktionellen Eigenschaften und morphologischen Merkmalen deutliche Differenzen zu den herkömmlichen extramedullären Fettdepots. Makroskopisch betrachtet, ist das BMAT zum einen das einzige Fett, das sich in unmittelbarer Nähe von knochenbildenden und hämatopoetischen Zellen befindet [21]. Zum anderen ist eine Expansion des BMATs durch seine Lage im Knochen selbst limitiert. Dementsprechend führt eine Zunahme von Knochenmarkfett zu einer Abnahme von Knochenvolumen und von blutbildendem Gewebe [22].

Mikroskopisch gesehen, befinden sich die Lipide wie im WAT aber im Gegensatz zum braunen Fettgewebe in einer unilokulären Vakuole, weshalb sie morphologisch den Adipozyten im WAT ähneln [26]. Braunes und aktiviertes beiges Fettgewebe enthält aufgrund seiner Funktion in der Thermogenese viele Mitochondrien und ähnelt hierbei phänotypisch dem BMAT. Dieses exprimiert allerdings nicht den BAT-Marker UCP-1 und besitzt somit nicht die Möglichkeit zur Entkopplung der Atmungskette [26]. Für einen morphologischen Vergleich der Adipozytengruppen zeigt Abb. 2 einen schematischen Überblick verschiedener Fettzellen im (a) weißem, (b) braunem, (c) beigem und (d) Knochenmarkfettgewebe.

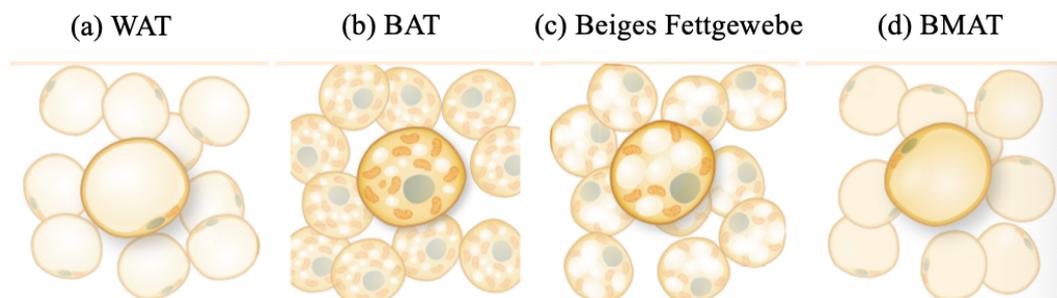


Abb. 2: Schematische Übersicht der Adipozytentypen, modifiziert nach Sebo et al., 2019, *Endocrine Reviews* (Lizenznummer: 5776031378484) [26]

Die Übersicht zeigt einen morphologischen Vergleich der Adipozyten in verschiedenen Fettgruppen ((a) weißes Fettgewebe (WAT), (b) braunes Fettgewebe (BAT), (c) beiges Fettgewebe, (d) Knochenmarkfettgewebe (BMAT)).

1.2.3 Einteilung Knochenmarkadipozyten

Die Adipozyten im Knochenmarkfett lassen sich in zwei weitere Subtypen einteilen, die sich ebenfalls in ihrer Morphologie, Lokalisation und Funktion unterscheiden:

In der aktuellen Forschung differenziert man zwischen dem konstitutiven gelben Fettgewebe (*constitutive bone marrow adipose tissue*, cBMAT) und dem regulativen roten Fettgewebe (*regulative bone marrow adipose tissue*, rBMAT) [21, 27]. Das cBMAT ist überwiegend homogen in den distalen Röhrenknochen wie dem Femur und der Tibia aber auch in den Hand- und Fußknochen lokalisiert, welches sich bereits früh im Leben entwickelt. Das konstitutive Fettgewebe weist größere Adipozyten (38-39 μm) auf, die zudem mehr ungesättigte Fette enthalten und kaum durch Osteozyten oder Hämatopoese reguliert werden [28-30]. Das rBMAT kommt im Gegensatz zum cBMAT eher in proximalen und zentralen Knochen wie dem Becken, dem Sternum, den Rippen und den lumbalen Wirbelknochen vor und weist vergleichsweise kleinere Adipozyten (31-35 μm) auf, welche schnell Lipide für die vielen sich in unmittelbarer Nähe befindenden hämatopoetisch aktiven Zellen mobilisieren können [30]. Die konstitutiven gelben Adipozyten exprimieren im Vergleich zu den regulativen Subtypen und sogar weißen Fettzellen höhere Level der Transkriptionsfaktoren der Gruppe der *CCAAT/enhancer binding proteins* wie *C/EBP α* und *C/EBP β* , die wichtig für die terminale Adipogenese und Differenzierungsinduktion sind [30]. Es bedarf allerdings weiterer Forschung, ob rBMAT und cBMAT aus derselben Vorläuferlinie stammen, ob sie sich in unterschiedlichen Reifestadien befinden oder ob sie lediglich aufgrund ihrer Lokalisation unterschiedliche Funktionen einnehmen [28, 30].

1.2.4 Adipogenese von Knochenmarkadipozyten

Das Knochenmark insgesamt setzt sich grundsätzlich aus einem heterozellulären Innenraum zusammen, welcher unter anderem aus Stammzellen der hämatopoetischen Linie sowie mesenchymaler stromaler Stammzellen (MSZ) besteht [31]. Lange war nicht klar, aus welcher Ursprungszelle Knochenmarkadipozyten entstehen und welche Mechanismen die Differenzierung regulieren. Ein hämatopoetischer Stammzellursprung konnte indes widerlegt werden [26]. Es wird vermutet, dass aus einer MSZ entweder osteochondrogene Vorläuferzellen oder

Präadipozyten, Vorläuferzellen von Adipozyten, entstehen [22]. Zahlreiche Signalwege definieren hierbei, welche Progenitoren sich entwickeln und welche sich dann zu Knochenmarkadipozyten (*bone marrow adipocytes*, BMAds) weiter differenzieren können [22, 24]. Zu diesen Signalwegen zählt die frühe Expression adipogener Transkriptionsfaktoren wie PPAR_γ in MSZ-Vorläufern, die eine Differenzierung zu Adipozyten begünstigen und die Osteoblastogenese hemmen [31]. PPAR_γ interagiert mit Proteinen wie C/EBP α und bestärkt die gegenseitige Expression, welches, wie bereits erwähnt, entscheidend in der Adipogenese ist [30, 32]. Die Induktion der Adipogenese ist allerdings sehr komplex: Eine Studie von Yue *et al.* von 2016 zeigte unter Anderem, dass der Leptin/Leptinrezeptor (LepR)-Signalweg maßgeblich an der Adipogenese von MSZ beteiligt ist und die Osteogenese unterdrückt [33]. Die Regulation von MSZ auf metabolisch-molekularer Ebene war zudem lange unklar. Jüngste Forschungsergebnisse verdeutlichen jedoch die zentrale Bedeutung der oxidativen Phosphorylierung für die Energieversorgung dieser Zellen während des Differenzierungsprozesses von Adipozyten [34].

Differenzierte BMAds tragen zudem genetische Marker für Adipokine wie Leptin, FABP4 (Fettsäurebindungsprotein aP2) und Adiponektin [22]. Interessanterweise exprimieren BMAds im Gegensatz zu Fettzellen im WAT und BAT auch den osteoblastischen Transkriptionsfaktor Osterix (*Osx1*), womit diese sowohl osteogene als auch adipogene Eigenschaften aufweisen. [22].

Da Knochenmarkadipozyten im Vergleich zu WAT und BAT aus einer anderen Vorläuferzelle hervorgehen, unterscheiden sich diese dementsprechend auch genetisch von den anderen Fettgewebsarten und bilden eine eigenständige Entität [23].

1.2.5 Sekretorische Eigenschaften von BMAT

Das Knochenmarkfettgewebe besitzt neben seiner Rolle als Energiespeicher auch signifikante sekretorische Funktionen, die wesentlich zur Regulation des Knochenstoffwechsels, der Hämatopoese und des Glukosestoffwechsels beitragen. Aufgrund seiner Lokalisation in der Knochenmarknische liegt die Vermutung nahe, dass BMAT vorrangig Energie für das hämatopoetische und mesenchymale Gewebe im Knochen bereitstellt [24, 35, 36]. BMAds sind allerdings auch maßgeblich am Knochenmetabolismus beteiligt: BMAT dient beispielsweise

als Lipidreservoir für freie Lipide und schützt Osteoblasten in der Knochenmarksnische vor Lipotoxizität [30, 37]. Wie zuvor in 1.2.4 beschrieben, besteht eine Interaktion zwischen den Signalwegen, die die Adipogenese fördern und somit die Osteogenese hemmen, und solchen, die durch Hemmung der Adipogenese die Differenzierung von Osteoblasten begünstigen [21]. Spezifisch sezernieren reife Adipozyten bioaktive Moleküle, beispielsweise RANK (*receptor activator of nuclear factor κ B*) Ligand und das proteolytische Enzym Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP4), welche den Knochenmetabolismus beeinflussen [21]. In einer wissenschaftlichen Untersuchung wurde festgestellt, dass BMAd in der Abwesenheit von Parathormon die Sekretion des RANK-Liganden induzieren, welcher osteoklastische Zellen aktiviert und somit für Knochenabbau verantwortlich ist [21, 38]. DPP4 verstärkt ebenfalls die Knochenresorption und fördert zudem den Lipid- und Glukosemetabolismus [21, 39].

Neben den Adipokinen sezernieren die Adipozyten zahlreiche Zytokine und Chemokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8) und diverse Chemokine, welche die hämatopoetische Regulation beeinflussen [40]. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie konnte die Rolle von BMAT in der Notfallhämatopoese nach einem Myokardinfarkt aufzeigen, wobei Knochenmarkadipozyten als kritische Energiequelle durch Freisetzung von Fettsäuren für hämatopoetische Stammzellen dienen [41]. Ferner spielen Adipokine wie Leptin und Adiponektin im BMAT analog zu den extramedullären Fettdepots, im Kontext des Glukose- und Lipidhaushalts eine besondere Rolle [21]. Adiponektin reguliert unter anderem die hepatische Insulinsensitivität im peripheren Gewebe und scheint eine besondere Rolle im medullären Fettgewebe zu haben [24, 40]. Cawthorn *et al.* konnten 2014 beispielweise zeigen, dass BMAT bei Mäusen unter kalorischer Restriktion um 40% zunahm und die Adipozyten dabei verstärkt Adiponektin sezernierten, was besonders spezifisch für dieses Fettdepot zu sein scheint [42]. Es wird daher angenommen, dass die Expansion von BMAT eine adaptive Reaktion des Organismus auf Zustände begrenzter Energieverfügbarkeit darstellt. Zudem wird angenommen, dass Adiponektin antiinflammatorische und positive kardiovaskuläre Effekte hat [40]. Generell nimmt BMAT einen größeren systemischen Einfluss auf die Glukosehomöostase ein, als bisher angenommen. Hierzu untersuchten 2020 Suchacki *et al.* unter anderem murines

BMAT: Dabei konnte gezeigt werden, dass die relative Glukoseaufnahme im BMAT im Vergleich zu WAT und der Skelettmuskulatur erhöht ist [29].

Insgesamt beeinflusst BMAT durch die Sekretion verschiedener bioaktiver Substanzen signifikant die hämatopoetische Regulation, den Glukose- und Lipidstoffwechsel sowie die Energieverfügbarkeit und zeigt eine adaptive Expansion unter kalorischer Restriktion.

1.2.6 Klinische Relevanz von BMAT

Als hochdynamisches Gewebe kann die Expansion von BMAT durch verschiedene Faktoren induziert werden: Eine Vielzahl von Faktoren wie Alter, Röntgenstrahlung, Glukokortikoidtherapie und Knochenverlust bei Osteoporose korrelieren mit einer Zunahme von BMAT [26]. Bei postmenopausalen Frauen wurde dies unter anderem mit einem erhöhtem Frakturrisiko in Verbindung gebracht [25, 43]. Zudem expandiert BMAT auch bei Erkrankungen des metabolischen Spektrums wie Adipositas und T2D [25]. Paradoxerweise nimmt BMAT auch bei Patienten mit Anorexia nervosa als potenzielle Anpassung an Zustände reduzierter Energiezufuhr zu [25, 44]. Interessanterweise konnte eine humane Studie zeigen, dass die Aktivierung von BMAT die frühe Atherosklerose begünstigt und somit ein kardiovaskuläres Risiko darstellt [45].

Die genauen Mechanismen hinter der Regulation und Funktion von BMAT sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch deutlich, dass BMAT, ähnlich wie andere Fettdepots, als autonomes endokrines Organ fungiert, welches über sekretorische Fähigkeiten verfügt und in Abhängigkeit von der metabolischen und immunologischen Situation des Körpers reguliert wird. Die Prozesse, die zur Aktivierung und Reduktion von BMAT führen, unterliegen spezifischen, noch zu erforschenden Mechanismen, die neue Einsichten in die komplexen Interaktionen innerhalb des Knochenmarks versprechen.

1.3 Extrazelluläre Matrix

Bei der extrazellulären Matrix (EZM) handelt es sich um eine komplexe dreidimensionale zell-freie Struktur, die Zellen im lebenden Organismus umgibt [46, 47]. Diese ist eine Komposition aus Proteoglykanen wie Chondroitinsulfat, zahlreichen Enzymen wie Matrixmetalloproteinasen (die beispielsweise den Abbau der EZM regulieren), aber auch von unzähligen Rezeptor-Liganden-Konfigurationen [47, 48]. Generell betrachtet, ist die EZM essenziell für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase: Sie spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der mikroanatomischen Anpassung von Zellveränderungen, sondern ist unter anderem auch auf molekularer Ebene entscheidend für die Zell-Zell-Interaktion, Zellmigration und Zelldifferenzierung unter physiologischen und pathologischen Bedingungen [47-49].

Eine wichtige Komponente der EZM für diese Funktionen ist die ubiquitär vorkommende Hyaluronsäure deren vielfältige Eigenschaften und Rollen im Folgenden präsentiert werden [50].

1.4 Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA) ist in der heutigen Gesellschaft als variationsbreites Kosmetikprodukt bekannt. Das Molekül ist allerdings sehr vielfältig und reguliert in Kombination mit HA-Bindungsproteinen (Hyaladherine, Rezeptoren) wichtige Funktionen im Zellmetabolismus, wozu unter anderem die Zellmigration, Adhäsion und Proliferation von glatten Muskelzellen, Fibroblasten und anderen Zelltypen im vaskulären Gewebe gehören [51]. Viele Forschungsgruppen beschäftigen sich daher auch mit HA als Modulator bei kardiovaskulären Erkrankungen. HA ist wichtig im vaskulären *Remodeling* und kann im hyperglykämischen und inflammatorischen Milieu in den Endothelialzellen von Gefäßen akkumulieren, sodass diabetische Komplikationen wie Makro- und Mikrozirkulationsstörungen begünstigt werden [52]. Erhöhte Level der HA mit Infiltration von Immunzellen im Lymphgewebe konnten zudem auch beim Typ 1 Diabetes mellitus nachgewiesen werden [53].

Die Veränderung der EZM und somit der HA-Matrix scheint auch ein entscheidender Prozess in der Tumorgenese zu sein: Mehrere Studien zeigten, dass eine

vermehrte Produktion der HA in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen werden konnte [54]. Beispielweise konnte in Tumorzellen des duktales Adenokarzinoms im Pankreas eine erhöhte Sekretion und Expression der HA gezeigt werden, sodass die Funktion der HA in der tumorbiologischen Forschung von wachsendem Interesse ist [54, 55].

1.4.1 Aufbau und Synthese der HA

Chemisch betrachtet, ist HA ein nicht-sulfatiertes lineares Glykosaminoglykan, welches ein wichtiger Bestandteil der EZM des menschlichen aber auch des prokaryontischen Organismus' ist [56]. Das Molekül setzt sich aus Dimeren der Glukosederivate N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNAc) und der D-Glukuronsäure (GlcA) über eine beta-1,3- beziehungsweise beta-1,4-glykosidische Bindung zu einem Disaccharid (400 Da) zusammen [57]. Dabei können die Disaccharide so miteinander verknüpft werden, dass das Molekül einer Größe von 6000-8000 kDa und einer Länge von 10-15 μm entspricht [58]. Die chemische Struktur der HA wird in Abb. 3 dargestellt.

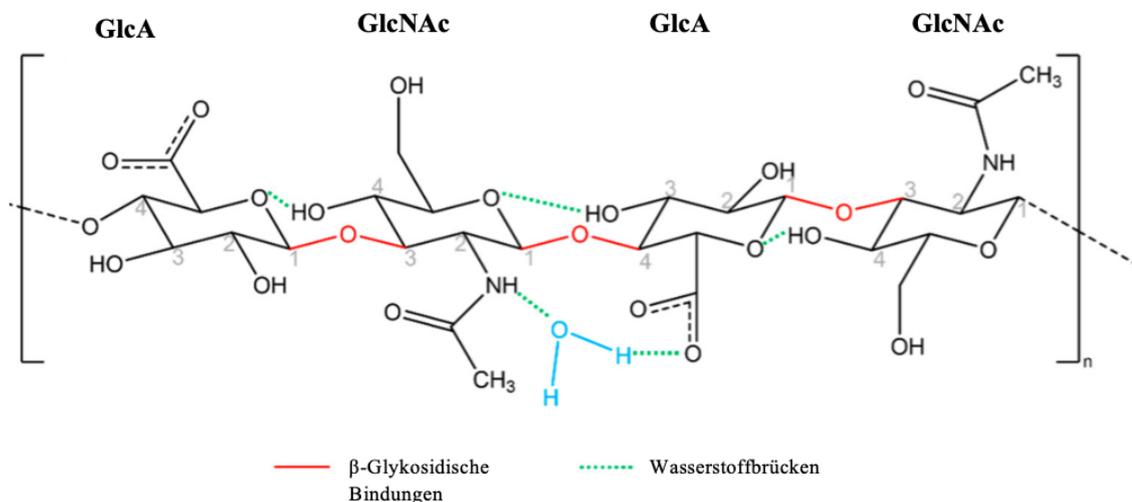


Abb. 3: Molekülaufbau der Hyaluronsäure, modifiziert nach Marinho et al., 2021 [59]

HA wird im Gegensatz zu anderen Glykosaminoglykanen wie Heparansulfat oder Chondroitinsulfat nicht im Golgi-Apparat einer Zelle, sondern an der zytosolischen Plasmamembran einer Zelle synthetisiert und in den Extrazellularraum sekretiert [56, 60]. Der Aufbau erfolgt hierbei über die *Hyaluronan Synthases* (HAS),

Plasmamembranproteine, die sich in die Isoenzyme HAS1, HAS2 und HAS3 unterteilen [61]. Die Isoenzyme haben unterschiedliche enzymkinetische Eigenschaften, sodass HAS1 beispielsweise eine geringere katalytische Aktivität aufweist als HAS2 und HAS3, um HA zu synthetisieren [62]. Generell unterscheiden sich die HAS auch in ihrem Vorkommen und potenziellen Rollen: Das Isoenzym HAS2 wird von den meisten Zellen exprimiert und ist wichtiger Bestandteil der Embryogenese, da es mitunter die für die Organogenese essenzielle epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) reguliert, sodass ein Fehlen zum embryonalen Tod führen würde [49, 63]. Zur Rolle von HAS3 ist nicht viel bekannt, jedoch konnte eine Studie von 2021 zeigen, dass die murine endotheliale Synthase die Arteriogenese bei bestehender Beinischämie induzieren konnte [64].

Generell erfolgt der Abbau der HA über Hyaluronidasen (HYAL) und über reaktive Sauerstoffspezien [51, 59]. Vor allem HYAL-1 und HYAL-2 gehören zu den häufigsten Formen im menschlichen Körper und spalten die glykosidische Bindung der HA, sodass Oligosaccharide entstehen, die anschließend degradiert werden [65].

1.4.2 HA-Rezeptoren

Als wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix agiert HA auch als Ligand an unterschiedlichen Bindungsproteinen. Dazu gehören unter anderem die Rezeptoren CD44 (*cluster of differentiation*), RHAMM (*receptor for hyaluronan mediated motility*) und LYVE1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor*) [66-68]. LYVE1 reguliert den lymphatischen HA-Transport und ist daher interessant in der Tumorbilogie von Metastasen, während RHAMM vor allem als Mediator für Zellmigration und Proliferation fungiert [65]. Bei CD44 handelt es sich um den einzigen Rezeptor, der HA unmittelbar an der Zelloberfläche bindet [66-68]. CD44 gehört zu den transmembranären und durch N-Glykolisierung regulierten Proteinen, welche auf vielen unterschiedlichen Zelltypen wie Epithelzellen, Fibroblasten und Immunzellen exprimiert werden [67]. Die Funktionen von CD44 sind vielfältig und könnten eine entscheidende Schlüsselrolle im entzündlichen Prozess von metabolischen Erkrankungen spielen: Durch eine Hemmung von CD44 konnte die Immunzellinfiltration im weißen Fettgewebe bei diabetischer Stoffwechsellage im Mausmodell reduziert und somit die Insulinsensitivität verbessert werden, sodass eine starke Assoziation mit T2D bestehen könnte [69-71]. Zudem konnte gezeigt

werden, dass bei Abwesenheit von CD44 die inflammatorische Phase nach Myokardinfarkt milder verläuft: Der Rezeptor wird vermehrt auf Immunzellen nach einem Myokardinfarkt exprimiert und scheint wichtig in der fibroblastischen Antwort zum fibrotischen Gewebsumbau zu sein [72, 73].

1.4.3 Therapeutische Implikation der HA-Inhibition

Der Abbau der HA erfolgt, wie bereits erwähnt, über HYAL und über reaktive Sauerstoffspezien [51, 59]. Die HA-Synthese selbst kann pharmakologisch mittels 4-Methylumbelliferon (4-MU, auch 7-Hydroxy-4-Methylcumarin, INN: Hymecromone genannt) gehemmt werden. Bei 4-MU handelt es sich um ein Cumarinderivat, welches als Gallenspasmolytikum eingesetzt wird [74, 75]. Die chemische Struktur von 4-MU wird in Abb. 4 gezeigt. Das Therapeutikum kann zudem auch als Hemmstoff der HA-Synthese verwendet werden: Zum einen inhibiert 4-MU als Substrat die UDP-Glukuronosyltransferase, sodass 4-MU-Glukoronid entsteht und somit das Angebot an zytosolischer UDP-Glukuronsäure reduziert wird, die für den Aufbau der HA benötigt wird [74, 76, 77]. Zum anderen trägt 4-MU zu einer verminderten Expression der HAS-Gene *Has2* und *Has3* bei [77, 78].

Die Spannbreite von 4-MU als potenzielles Therapeutikum scheint sehr vielfältig zu sein. Als kompetitiver und genetischer Inhibitor der HA führte 4-MU zu besonderem Interesse in der Tumorforschung, da es beispielsweise zu einer verminderten Zellproliferation und Migration in diversen Tumorzellen führt, sodass die Verwendung als potenzielles Tumorthapeutikum diskutabel bleibt [75, 77, 79].

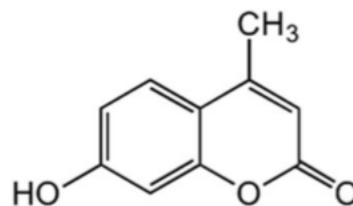


Abb. 4: Chemische Struktur von 4-Methylumbelliferon, modifiziert nach Vitale *et al.*, 2021 [80]

1.5 Vorkommen und Funktion der HA in Fettgeweben

Die EZM ist maßgeblich an dem Differenzierungsprozess von Präadipozyten beteiligt, da eine Anpassung an das vergrößerte Zellvolumen und den Interzellularraum nötig ist, um ein Platzen der empfindlichen Lipidtröpfchen somit zu verhindern [81]. HA nimmt hierbei als wesentlicher Modulator der EZM eine wichtige Rolle als Zell-Zell Kommunikator im weißen und braunen Fettgewebe ein, die im Folgenden skizziert werden:

In mehreren Studien konnte die Rolle der HA im WAT herauskristallisiert werden. Dokoshi *et al.* stellten als eine von mehreren Forschungsgruppen 2018 ebenfalls eine vermehrte HA-Synthese während der Differenzierung der murinen Präadipozyten-Zelllinie 3T3-L1 fest und konnten die *in vitro* Adipogenese durch HA-Verdau so hemmen, dass die Adipozytendifferenzierungsmarker wie Adiponektin und *C/EBP_α* infolgedessen vermindert exprimiert wurden [82]. Interessanterweise konnte in einem weiteren humanen Versuchsansatz die inflammatorische Adipozytenbildung infolge einer Colitis mittels HA-Verdau ebenfalls reduziert werden [82]. Die genaue Rolle der HA kann allerdings nicht exakt geklärt werden und scheint konfliktbehaftet zu sein: Beispielsweise konnte in einer anderen Studie von 2019 zur Differenzierung von humanen subkutanen Adipozyten durch Verwendung des HA-Inhibitors 4-MU eine verstärkte Adipogenese nachgewiesen werden, was eher eine inhibitorische Rolle der HA vermuten lassen würde [83]. Bekannt ist allerdings, dass HA einen wichtigen Ausgangspunkt der Glykolyse darstellt und als entsprechendes Glykosaminoglykan ein Modulator des Glukosestoffwechsels ist [74, 84]. Kang *et al.* konnten 2013 in einem Mausmodell mit diätinduzierter Insulinresistenz eine Zunahme der HA im Skelettmuskel nachweisen [85]. Durch Inhibition der HA in der EZM mittels Hyaluronidase konnte zudem eine Reduktion der Adipozytengröße und eine Verbesserung der hepatischen und muskulären Insulinresistenz induziert werden, was HA zu einem potenziellen therapeutischen Angriffspunkt in T2D macht [85].

Der Zusammenhang der HA und BAT wird aktuell ebenfalls untersucht. Grandoch *et al.* zeigten 2019, dass durch die Inhibition der HA-Synthese durch 4-MU

die Insulinresistenz und die Glukosehomöostase im braunen Fettgewebe verbessert werden konnten. Als zusätzlicher Effekt wurde außerdem ein Anstieg der thermogenetischen Kapazität jenes Fettgewebes beobachtet [74].

Allerdings ist kaum etwas zur EZM und vor allem zur Charakterisierung der HA im Knochenmarkfettgewebe bekannt. Wie bereits aufgeführt, ist die Regulation von BMAT an viele physiologischen, aber auch pathologisch-metabolischen Prozesse im Körper gekoppelt. Somit stellt sich die Frage, wie die EZM im BMAT aufgebaut ist, welche Rolle die HA hierbei nimmt und welche potenziellen Targtpunkte HA im BMAT bietet.

1.6 Ziele

Das BMAT scheint ein weiteres spezifisches Fettdepot im Körper mit wichtigen endokrinen Charakteristika zu sein, welches sich bei verschiedenen metabolischen Krankheitsbildern verändert und einen systemischen Effekt auf den Organismus ausübt. Bekannt ist, dass die Plastizität der HA sowohl im BAT als auch im WAT Einfluss auf die Adipogenese, den metabolischen Stoffwechsel und inflammatorische Prozesse zu haben scheint. Allerdings bleibt bis jetzt unbekannt, ob BMAT eine ähnliche Matrix aufweist und wie sich diese während der Adipogenese verhält.

Primäres Ziel war die Etablierung eines Modells zur Differenzierung von Präadipozyten. Die vorliegende Arbeit befasst sich daraufhin mit der Aufschlüsselung der EZM des BMAT auf *in vitro*-Ebene, um vor allem die HA-Matrix während der Differenzierung von Knochenmarkadipozyten zu charakterisieren, in der es folgende Fragen zu beantworten gilt:

- (i) Gibt es im BMAT eine HA-reiche EZM? Wie wird diese während der Differenzierung reguliert?
- (ii) Welche HA-spezifischen Isoenzyme (HAS-1,-2,-3) agieren im Rahmen dieses Prozesses? Wie verhalten sich dabei die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM?
- (iii) Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede der HA-Matrix während der Differenzierung von Knochenmarkadipozyten?
- (iv) Wie verhält sich die Adipogenese von Knochenmarkadipozyten, wenn Präadipozyten mit 4-MU und Hyaluronidase behandelt werden?

2. Material und Methoden

2.1 Organentnahme

Die Genehmigung zur Organentnahme (Projektname: O4/02) liegt vor. Das Projekt wird von den Tierschutzbeauftragten des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV, Nordrhein-Westfalen) begleitet. Ich habe im Rahmen meiner FELASA Zertifizierung die Durchführung der Organentnahme vorgenommen.

2.2 Verwendete Tiere

Für die Organentnahme des Knochenmarkfettgewebes aus den Tibiae wurden ausschließlich 10-12 Wochen alte männliche Wildtyp C57BL/6J Mäuse (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet, welche *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter hatten. Der geschlechtsspezifische Vergleich erfolgte mit 10-12 Wochen alten weiblichen C57BL/6J Mäuse (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich).

2.3 Zellkultur

Substanz	Produkt/Zusammensetzung	Hersteller
Chloroform	Chloroform (CHCl ₃)	VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium, high glucose</i> (4,5 g/L)	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, USA
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> (DPBS)	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, USA
Ethanol	Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Otto Fischar GmbH & Co.KG, Saarbrücken
FCS	Fetales Kälberserum	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, USA
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthine	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	2-Propanol	AnalaR NORMAPUR, VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
HMW-HA	<i>High molecular weight hyaluronic acid</i> , 1,4MDa	AnalaR NORMAPUR, VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Hyaluronidase	Hyaluronidase aus <i>Streptomyces hyalurolyticus</i>	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
MEM-Alpha	<i>Minimum Essential Medium</i>	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, USA
Ölrot O	Ölrot O Pulver	Fluka, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA

OP9-Zellen	Zelllinie aus stromalem Knochenmark (ATCC®-Nummer: CRL-2749™)	American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (137 Millimolar (mM) NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 8,3 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4)	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, USA
PenStrep	Penicillin-Streptomycin (10.000 <i>Units</i> /mL)	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, USA
<i>PureCol</i>	<i>Type I Bovine Collagen Solution</i> (3 mg/mL)	Advanced Biomatrix, Carlsbad, USA
Roti®-Histofix 4%	Säurefreie, phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4% (pH 7)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
<i>StemXVivo Adipogenic Supplement</i>	Adipozyten-Cocktail	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
TE	Trypsin EDTA Lösung	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, USA

Tabelle 1: Substanzen in der Zellkultur

Arzneistoff	Zusammensetzung	Hersteller
Dexamethason	Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Insulin	Insulin aus bovinem Pan- kreas (gelöst in RNase freiem H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rosiglitazon	Rosiglitazon	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4-MU-Natriumsalz	4-Methylumbelliferon-Natri- umsalz (100µM gelöst in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 2: Arzneistoffe in der Zellkultur

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Bildaufnahme	<i>Axiocam 208 color</i>	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Plattenlesegerät	<i>Synergy Mx Microplate Reader</i>	Biotek™ Instruments
Reverse Transkriptions- kit	<i>QuantiTect Reverse Transcription Kit</i>	Qiagen, Hilden
Spektrophotometer	<i>Nano Drop 1000 Spectrophotometer</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer	<i>Mixing Block MB-102</i>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Olden- dorf
Thermal Cycler	<i>Mastercycler personal (No. 5332 02731)</i>	Eppendorf AG, Ham- burg
Zentrifuge	<i>Centrifuge 5810 R Centrifuge 5418 R</i>	Eppendorf AG, Ham- burg

Tabelle 3: Verwendete Geräte gesamt

2.4 Isolation von Präadipozyten aus dem Knochenmarkfettgewebe

2.4.1 Präparation

Zur Kultivierung von Knochenmarkadipozyten wurden die Tibiae der Mäuse entnommen. Bei der Freipräparation der Tibiae war es wichtig, dass diese samt Knie- und oberem Sprunggelenk intakt blieben. Die entnommenen Knochen wurden während der weiteren Präparation und vor Isolation in einem Röhrchen auf Eis gestellt.

2.4.2 Isolation von Knochenmarkadipozyten

Ziel war die Entnahme von murinen Präadipozyten aus der Tibia und das Anlegen einer Zellkultur. Die verwendeten Utensilien und Geräte in der Zellkultur sind Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3 zu entnehmen. Zur Vorbereitung der anschließenden Differenzierung zu Adipozyten wurden 12-Well-Platten mit jeweils 500 µL PureCol (*Type I Bovine Collagen Solution*, Advanced BioMatrix) in einer Konzentration von 100 µg/mL gecoatet. Die Platten wurden bei offenem Deckel unter Raumtemperatur für mehrere Stunden unter der Sterilbank getrocknet. Nach dem die Tibiae frei präpariert waren, wurde der Knocheninhalt mithilfe einer 26 G-Kanüle in ein Falconsches Zentrifugenröhrchen gespült. Die hierbei verwendete Lösung enthielt 4 mL DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco®, Life Technologies™, Paisley, USA), welche mit 20 % fetales Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PenStrep) zugesetzt wurde. Dabei wurden gruppenweise die Tibiae von sechs C57BL/6J Mäusen gepoolt. Anschließend wurde eine gepoolte Zellgruppe in zwei T-75 mL Flaschen ausgesät. Da die entnommenen Zellen empfindlich waren, schien ein einheitlicher Wachstumsnährboden wie in den T75-Flaschen wichtig zu sein, um durch Zell-Zell-Kontakte und den Aufbau einer EZM ein Überleben der Zellen zu gewährleisten. Nach 24 Stunden wurde der Überstand mit den nicht adhärennten Zellen abgesaugt und durch frisches zuvor erwärmtes Medium (15 mL/T-75 Flasche) ersetzt. Daraufhin wurde das Medium alle 48 Stunden gewechselt und die Zellen so lange bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis sich nach circa 7-10 Tagen unter täglicher Kontrolle ein konfluenten Zellrasen gebildet hat. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden diese gesplit-

tet. Dabei wurde das Medium zunächst abgesaugt und 10 mL kaltes DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, Gibco®, Life Technologies™, Paisley, USA) (10 mL) zum Spülen der Zellen verwendet. Nach Absaugen der Pufferlösung wurde TE (5 mL) hinzugefügt und die Flasche für fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Unter Beobachtung im Mikroskop und nach Ablösung der Zellen wurden diese mit 10 mL DMEM (10 % FCS, 1 % PenStrep) gespült. Bei unzureichender Ablösung der Zellen vom Boden der T-75 Flaschen wurde ein steriler Zellschaber verwendet, um adhärenente Zellen zusätzlich mechanisch abzutragen. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Reagenz überführt und fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand im Reagenz wurde bis auf das Zellpellet abgesaugt. Dieses wurde in 1mL DMEM (10 % FCS, 1 % PenStrep) vorsichtig unter ordentlichem Spülen gelöst.

2.4.3 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:

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

Die Zellen wurden anschließend in einer Dichte von 6×10^5 Zellen/Well auf einer 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden erneut im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis diese konfluent gewachsen waren, um die folgende Differenzierung zu beginnen.

2.4.4 Differenzierung zu Knochenmarkadipozyten

Die Differenzierung primär isolierter Präadipozyten aus dem Knochenmark in der Zellkultur erfolgte mithilfe eines speziellen Differenzierungsmediums, das die Adipogenese induzieren soll. Der adipogene Cocktail (AC) besteht aus DMEM (10 % FCS, 1% PenStrep), welcher mit 30% *StemXVivo Adipogenic Supplement*, 1 μ M Insulin, 2 μ M Rosiglitazon versetzt wurde. Der Cocktail musste hierbei frisch hergestellt werden. Die Präadipozyten wurden alle 72 Stunden mit frischem Differenzierungsmedium behandelt. Die Zellen wurden zu vier Differenzierungszeitpunkten (d0, d3, d6, d10) geerntet. Das Differenzierungsprotokoll orientierte sich am dargestellten Schema in Abb. 5.

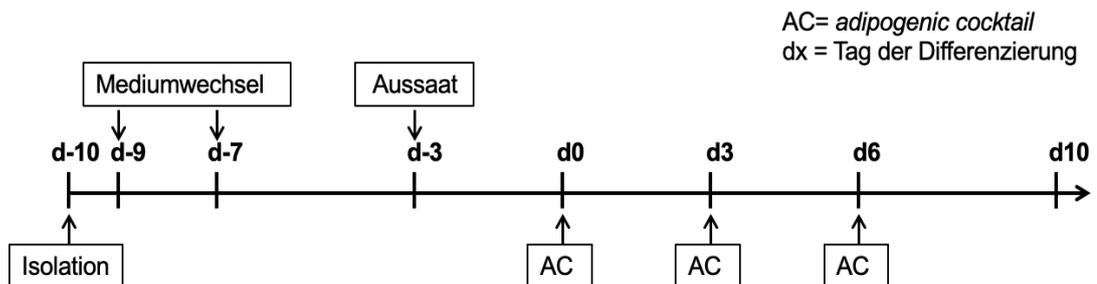


Abb. 5: Differenzierungsprotokoll der murinen tibialen Präadipozyten

2.5 OP9-Zellen

2.5.1 Aussaat

Für die Versuche wurden OP9 Zellen (ATCC®, Manassas, USA) laborintern aufgetaut und bei Erreichen einer 70%igen Konfluenz anschließend gesplittet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um murine Fibroblasten-ähnliche embryonale Stammzellen aus murinem Knochenmarkstroma [86]. Die Zellen wurden auf 12-Well -Platten zu 4000/cm² ausgesät, wobei zur Kultivierung MEM-Alpha (Gibco®, Life Technologies™, Paisley, USA) verwendet wurde, welches mit 20 % FCS und 1 % PenStrep versetzt war. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 5 %

CO₂ inkubiert. Nach zwei bis drei Tagen waren die Zellen konfluent gewachsen. Für die Versuche wurden die eingefrorenen Passagen 10-14 verwendet.

2.5.2 Differenzierung zu Adipozyten

Die Differenzierung erfolgte auf Basis eines etablierten Protokolls [86]. Die Zellen wurden zur Vorbereitung der Differenzierung zunächst zwei weitere Tage mit DMEM (10 % FCS, 1 % PenStrep) behandelt. Daraufhin wurde mit der Differenzierung begonnen: Die Zellen erhielten zwei Tage lang einen Differenzierungscocktail aus DMEM (10 % FCS, 1 % PenStrep), der mit 175 nmol/L Insulin, 0,25 µM Dexamethason und 0,5 mM IBMX versetzt war. Anschließend wurden diese weitere zwei Tage mit DMEM (10 % FCS, 1 % PenStrep) und 175 nmol/L Insulin behandelt. Nach Induktion der Differenzierung erhielten die Zellen bei jedem Mediumwechsel erneut das Kultivierungsmedium MEM-Alpha (20 % FCS, 1 % PenStrep). Abb. 6 zeigt eine zusammenfassende Übersicht des beschriebenen Differenzierungsvorgangs mit den verschiedenen Differenzierungsmedien.

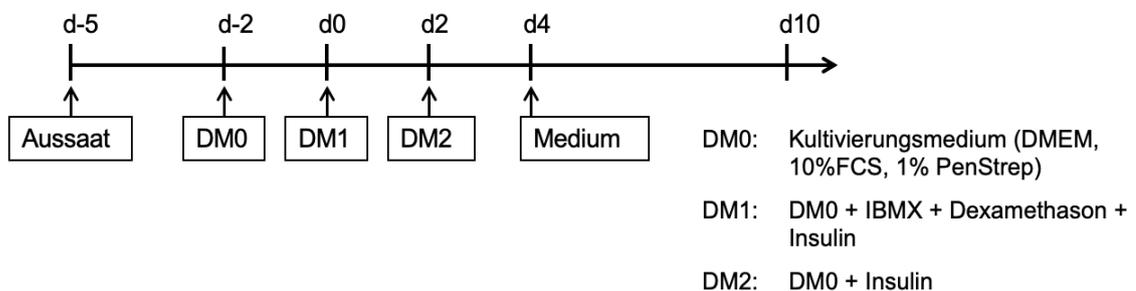


Abb. 6: Differenzierungsprotokoll von OP9-Zellen

Schematische Darstellung der Differenzierung von OP9-Zellen im Verlauf von zehn Tagen (dx) ab Tag d0 mit verschiedenen Differenzierungsmedien (DM0, DM1, DM2).

2.6 Öl- Rot-O-Färbung

2.6.1 Messung im Plattenlesegerät

In verschiedenen Differenzierungsstadien der Präadipozyten (Tag 0, 3, 6, 10) und der OP9-Zelllinie erfolgte die Fixierung der Zellen nach Absaugen des Mediums mittels PFA (Roti®-Histofix 4%, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) für mindestens 20 Minuten. Die fixierten Adipozyten konnten nun bei 4°C, nach Gabe von 500 µL DPBS pro Well, gelagert oder direkt mit einer Öl-Rot-O (ORO)-Färbung angefärbt werden. Bei der ORO-Färbung korreliert die Intensität der Färbung mit der Menge an Lipidtropfen in den Zellen. Hierzu wurde PFA von fixierten Zellen abgesaugt und die Platten wurden zwei bis drei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin wurden die Platten für circa 20 Minuten an der Luft getrocknet. Die ORO-Stocklösung wurde zuvor frisch aufbereitet. Hierbei wurden 300 mg des roten ORO-Pulvers in 100 mL 100% Isopropanol gelöst und auf einem Magnetrührer für mehrere Stunden erhitzt. Die warme ORO-Stocklösung musste vor Beginn der Färbung mit entmineralisiertem Wasser im Verhältnis 3:2 gemischt und mithilfe eines 0,2 µm Sterilfilters filtriert werden. Die Suspension wurde im Inkubator bei 37 °C warmgestellt. Währenddessen wurde 60 % Isopropanol für fünf Minuten auf die zuvor getrockneten Platten gegeben und anschließend abgesaugt. Die verdünnte ORO-Lösung (500 µL/ Well) wurde auf die 12-Well-Platte gegeben und vorsichtig bei Raumtemperatur für 15-20 Minuten bei 30 rpm im Inkubator geschwenkt. Die ORO-Lösung wurde vorsichtig abpipettiert und die Platten unter ständiger Beobachtung unter einem Mikroskop so lange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis die rote Farbe nicht mehr zu sehen war und das Wasser nicht mehr rosa verfärbt war. Daraufhin wurde 100% Isopropanol (250 µL/Well) auf die gefärbten Wells gegeben und je 200 µL der Lösung in eine 96-Well-Platte übertragen. Zusätzlich zum Zellüberstand wurden auch zwei Kontrollen inkludiert, ein Well mit 100 % Isopropanol und ein Well mit der reinen verdünnten ORO-Lösung. Zur quantitativen Absorptionsmessung der Proben wurde ein Plattenlesegerät (*Synergy Mx Microplate Reader, Biotek™ Instruments*) verwendet. Dieses misst die Absorption der roten ORO-Färbung bei einer Messung der Extinktion von 492 nm. Da hierbei die Menge der Lipideinlagerung der Zellen mit der Höhe der Absorption korreliert, konnte somit der Differenzierungsstatus der Präadipozyten ermittelt werden.

2.6.2 Aufnahmen ORO-Färbung

Die ORO-Färbung wurde hierbei auch nach dem bereits beschriebenen Prinzip, allerdings ohne Auswaschung, durchgeführt und die gefärbten Platten anschließend mit einer Kamera (*Axiocam 208 color*, Zeiss) für repräsentative Übersichtsaufnahmen fotografiert.

2.7 Molekularbiologische Analysen

2.7.1 HA-Überstandsmessung mittels HA-Bindeprotein Sandwich ELISA-ähnlichem Assay

An den zuvor definierten Differenzierungstagen wurde der Mediumüberstand abgenommen und die HA-Konzentration mittels HA-Bindeprotein ELISA-ähnlichem Assay nach Herstellerangaben (*Hyaluronic Acid (HA) Test-Kit*, Corgenix, Broomfield, Colorado, USA) bestimmt. Der HA-Überstand wurde stets doppelt bestimmt, indem der Mediumüberstand zweier Proben eines Differenzierungstages der jeweiligen Zellgruppe in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Die Platten wurden 15 Minuten bei 37 °C im Brutschrank bei 30 rpm geschwenkt. Die Suspension wurde anschließend in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße überführt. Da das Leermedium auch eine gewisse Konzentration an HA enthält, wurde stets bei jedem Differenzierungstag und bei jeder Zellpassage zusätzlich ein Leerwert (Nährmedium ohne Zellen, welches ebenfalls inkubiert wurde) bestimmt, der wie die Proben behandelt wurde. Dabei wurde ein Durchschnittsleerwert eines Differenzierungstages bestimmt, der anschließend von der gemessenen HA-Konzentration der Proben abgezogen wurde.

Für den Assay wurde die HA-Konzentration der Mediumproben mittels eines ELISA-ähnlichen Kits (*Hyaluronic Acid (HA) Test Kit*, Corgenix, Broomfield, Colorado, USA) nach Herstellerangaben gemessen. Dabei wurde eine 96-Well-Platte mit einem HA-bindungsspezifischen Protein (HABP), welches aus Rinderknorpel isoliert wurde, gecoatet. Die Proben wurden auf die Wells appliziert, um so eine mögliche HA-HABP Bindung zu induzieren. Nach dem ELISA-Prinzip wurde eine zweite enzym-konjugierte Version von HABP verwendet, um die Menge an HA je nach Farbumschlag quantifizieren zu können. Die Absorption konnte im ELISA-Plate Reader (*MultiskanTM FC Microplate Photometer*, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei einer Wellenlänge von 450

nm quantifiziert werden. Der optisch messbare Farbumschlag ist proportional zur HA-Konzentration einer Probe und konnte einer Referenzkurve der Standardreihe des Herstellers entnommen werden.

Die detektierte HA-Konzentration wurde in Relation zur Gesamtproteinkonzentration gesetzt. Zur Normalisierung des gemessenen HA-Gehalts wurde die Proteinmenge der jeweiligen Probe bestimmt. Hierzu wurden 500 μL 0,1 M NaOH zur Lyse auf die verbliebenen Zellen zur Proteinbestimmung gegeben. Die HA-Konzentration wurde in ng/ml Protein angegeben. Die Messung selbst wurde von Frau Irmhild Tibbe durchgeführt.

2.7.2 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time Polymerasekettenreaktion

2.7.2.1 RNA-Isolation aus den Adipozyten

Die primären Zellen wurden an Tag 0, 3, 6 und 10 geerntet, woraufhin die mRNA-Expression verschiedener HA-assoziiierter Gene mittels Realtime quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) gemessen wurde. Zunächst wurde die RNA nach der Phenol-Chloroform-Methode und nach Protokoll des Labors extrahiert: Die Zellen auf einem Well wurden mit 500 μL peqGOLD TriFast™ (PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen) lysiert. Nach Auftauen der Proben wurden zwei Proben eines Differenzierungstages gepoolt, um die RNA-Menge zu erhöhen. Nach Überführen der Proben in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 200 μL Chloroform (CHCl_3) hinzugeführt. Die Proben wurden invertiert, zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 15000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren waren drei Phasen zu sehen, wobei die obere wässrige Phase die RNA enthält. Diese wurde in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit demselben Volumen Isopropanol zugesetzt. Die Proben wurden gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut bei 15000 rpm für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das RNA-Pellet in 1 mL 75 % Ethanol gelöst. Die Proben wurden dann bei 4 °C 10 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und bei 65 °C getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 20 μL RNAse freiem Wasser (Merck, Millipore, Darmstadt) gelöst (65 °C für 10 Mi-

nuten). Die Qualität und die Menge der isolierten RNA wurde mittels Spektrometer (NanoDrop 1000 Spektrometers, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) analysiert.

2.7.2.2 cDNA-Synthese

Nach der RNA-Isolation erfolgte die cDNA-Synthese nach dem Prinzip der reversen Transkription, um anschließend die qPCR zur Messung der Genexpression zu nutzen. Voraussetzung für das Umschreiben der RNA war, dass der Absorptionsquotient (260 nm/280 nm) des Nanospektrometers den Wert >1,8 überschritt. Die c-DNA-Synthese erfolgte nach dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Quiagen, Hilden): Dabei wurden 1 µg der isolierten RNA in einem Endvolumen von 12 µL Wasser nach dem Pipettierschema des Herstellers verdünnt und mittels PCR-Cycler (*Mastercycler personal*, No. 5332 02731, Eppendorf, Hamburg) umgeschrieben.

2.7.2.3 Realtime quantitative PCR (qPCR)

Nach Umschreiben der RNA in cDNA wurden die Gene mittels qPCR quantifiziert. Hierfür wurde das Programm StepOnePlus™ Software Version 2.3 (Life Technologies, Singapore) unter Gebrauch des Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) verwendet.

Die Auswertung erfolgte nach dem $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Prinzip. Das Gen 18s wurde hierfür als Referenz (*housekeeping*-Gen) verwendet. Der Ct-Wert von 18s wurde vom jeweiligen Referenzgen subtrahiert und somit der ΔCt -Wert gebildet. Dieser wurde von einem ausgewählten Kontrollgen abgezogen, sodass der $\Delta\Delta\text{Ct}$ und anschließend der modifizierte $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ berechnen konnte. Die Werte wurden als ein Vielfaches der Kontrollgruppe d_0 angegeben. Als Grenzwert wurde ein Ct-Wert von >35 festgelegt, da das gemessene Gen kaum nachweisbar war, sodass diese in der Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Die eingesetzten Vorwärts- und Rückwärts-Primer-Sequenzen sind Tabelle 4 und das Protokoll zur Durchführung einer qPCR sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Gen	Vorwärts-Primer 5'-3'	Rückwärts-Primer 5'-3'
18s RNA	GCAATTATTCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCA
Has1	TATGCTACCAAGTATACCTCG	TCTCGGAAGTAAGATTTG- GAC
Has2	CGGTCGTCTCAAATTCATCTG	ACAATGCATCTTGTTCA- GCTC
Has3	GATGTCCAAATCCTCAACAAG	CCCACTAATACATTGCACAC
Cd44	GACCGGTTACCATAACTATT- GTC	CATCGATGTCTTCTT- GGTGTG
Hmmr	CAACTGCAGAACAACACTGACGC	TCAAGATGGCTTGGGCGTG
Adipoq	TGGATCTGACGACACCAAAA	TAACGTCATCTTCGGCATGA

Tabelle 4: Verwendete Primersequenzen zur *messenger ribonucleic acid (mRNA)*-Genexpressionsanalyse

	<i>holding stage</i>		<i>cycling stage x 40</i>		<i>melt curve stage</i>		
Temperatur	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C	95 °C	60 °C	95 °C + 0,3 °C Schritte
Dauer	2 min	2 min	15 s	30 s	15 s	1 min	15 s

Tabelle 5: Protokoll zur Ausführung einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR)

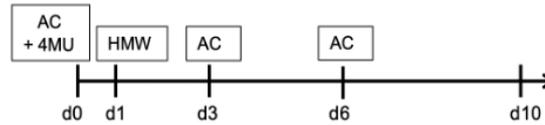
2.8 Behandlungen von Präadipozyten mit 4-MU, *High molecular weight*-HA und Hyaluronidase

Nach bereits beschriebener Isolation der Präadipozyten, wurden Tibiae von drei C57BL/6J Mäusen gepoolt. Die murinen Präadipozyten wurden *in vitro* zur Untersuchung der Hemmung der HA-Synthese während ihrer Differenzierung unter anderem mit 4-MU, *High molecular weight*- HA (HMW-HA) und Hyaluronidase in drei Assays behandelt, mit ORO gefärbt und dann quantifiziert. Zur Inhibition der HA-Synthese erhielten die Präadipozyten bei Differenzierungsbeginn zusätzlich zum Adipozytencocktail bei jedem Mediumwechsel 100µM 4-MU Natriumsalz. In einem weiteren Ansatz wurde ein *rescue*-Versuch durchgeführt. Bei einem *rescue*-Versuch handelt es sich um einen experimentellen Ansatz, bei dem eine durchgeführte experimentelle Manipulation wieder rückgängig gemacht wird, so dass ein kausaler Zusammenhang beschrieben werden kann. Hierbei wurden die mit 4-MU vorbehandelten Präadipozyten nach einem Tag mit der Zugabe von 50µg/500µL *High molecular weight*- HA (HMW-HA) behandelt. Anschließend wurde das Differenzierungsprotokoll weiter fortgeführt. In einem dritten Versuchsansatz erhielten die Zellen einen Tag nach der Gabe des Adipozytencocktails 1U/500µL Hyaluronidase zum Abbau der HA für 24 Stunden. Um den Differenzierungsstatus zu überprüfen, wurden die Zellen nach dem beschriebenen ORO-Protokoll gefärbt (siehe Absatz 2.6 Öl-Rot-O Färbung) das Absorptionsspektrum mittels Plattenlesegerät (*Synergy Mx Microplate Reader, Biotek™ Instruments*) gemessen. Zur anschaulichen Darstellung der Differenzierung zeigt Abb. 7 das zeitliche Verfahren zur Behandlung von Präadipozyten.

1. 4-MU



2. 4-MU+ HMW



3. Hyaluronidase



Abb. 7: Differenzierungsprotokoll vorbehandelter muriner Prädipozyten

Die Abb. verdeutlicht schematisch den Ablauf der Differenzierung von Prädipozyten aus den Tibiae von C57BL/6J-Tieren im Zeitraum von zehn Tagen (dx) mit Behandlung von 1. 4-MU (Konzentration: 100 μ M), 2. 4-MU (Konzentration: 100 μ M) + *High molecular weight* HA (Konzentration: 50 μ g/500 μ L) und 3. Hyaluronidase (Hyal, Konzentration: 1 U/500 μ L).

2.9 Statistische Analysen

Für die statistische Analyse der Daten wurde das Programm *GraphPad Prism 8* der *GraphPad Software, LLC* (La Jolla, Kalifornien, USA) verwendet. Statistische Ausreißer wurden mittels Grubb's Test ($\alpha=0,05$) ermittelt und aus der Auswertung ausgeschlossen. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Bei Daten, die mehr als zwei zu vergleichenden Ergebnisse zeigten, wurde eine Varianzanalyse mittels *One-way ANOVA* als parametrischer Test mit anschließendem *multiple comparison test* nach Dunnett durchgeführt. Wenn keine Normalverteilung bestand, wurde ein Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test mit anschließendem *multiple comparison test* nach Dunn angewandt. Eine *Two-way ANOVA* mit anschließendem multiplen Vergleichstest nach Sidak wurde verwendet, um den Einfluss zweier unabhängiger Variablen sowie deren Interaktion auf die abhängige Variable zu untersuchen. Bei zwei zu vergleichenden Datensätzen wurde ein t-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Werte angenommen, die einen p-Wert von unter 0,05 aufwiesen.

3. Ergebnisse

3.1 Differenzierungsvorgang von OP9-Zellen

3.1.1 ORO-Färbung und genetischer Differenzierungsmarker

In diesem Kontext wurde ein alternatives Modellsystem ähnlich den murinen Präadipozyten evaluiert, um die Durchführbarkeit weiterer experimenteller Studien an einer Zelllinie zu beurteilen. Die Differenzierung der OP9-Zellen erfolgte gemäß einem etablierten Protokoll. Der Vorgang der Adipogenese ist in 8 A dargestellt. Während der Differenzierung reicherten OP9-Zellen tendenziell bis Tag 4 mäßig Lipide an. Eine eindeutige Aussage zur Differenzierung nach sechs Tagen konnte nicht getroffen werden. Allerdings exprimierten OP9-Zellen den Differenzierungsmarker *Adipoq* im Verlauf vor allem nach vier und sechs Differenzierungstagen (dargestellt in Abb. 8 B).

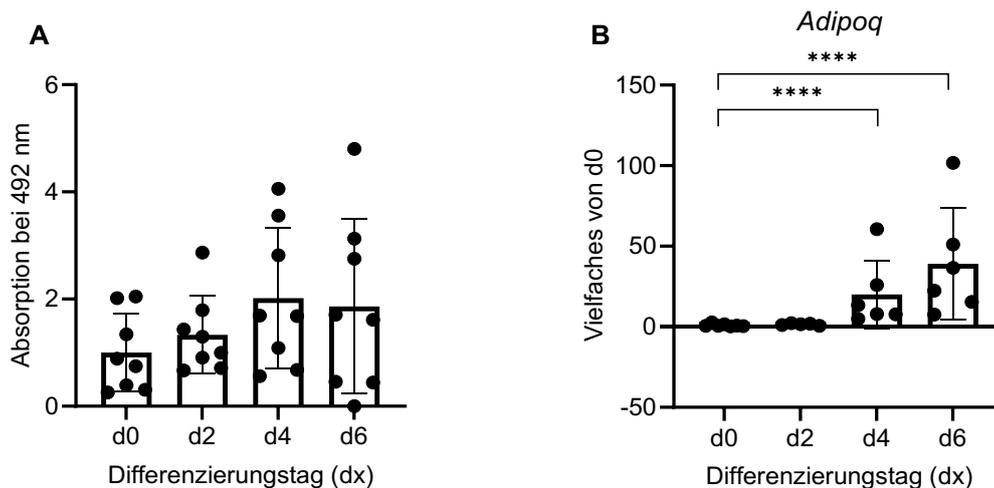


Abb. 8: ORO-Färbung nach sechs Differenzierungstagen und mRNA-Expression von *Adipoq* in OP9-Zellen nach Differenzierungsinduktion

A: OP9-Zellen mit zugehöriger Quantifizierung der Örot-O-Intensität (Absorption bei 492 nm) im Verlauf von sechs Differenzierungstagen (dx) (**A**, n=8); Mittelwert \pm SD; **B:** Messung der Genexpression der mRNA von Adiponektin (*Adipoq*) mittels *Realtime* qPCR im Verlauf von sechs Differenzierungstagen (**B**, n=4-7). Der Genexpressionsunterschied wird im Vergleich zu Tag 0 (d0) als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (normalisiert auf das *housekeeping*-Gen (18S)) dargestellt. Darstellung Mittelwert \pm Standardabweichung (*standard, deviation*, SD); **** $p \leq 0,0001$. Für **B** wurde eine *One-way* ANOVA mit *multiple comparison test* nach Dunnett durchgeführt.

3.1.2 Veränderungen im HA-System während der Differenzierung von OP9-Zellen

Im Folgenden werden detaillierte Untersuchungen zur HA-Sekretion und zur Expression der HA-assoziierten Gene während der Differenzierung von OP9-Zellen präsentiert. Für die Quantifizierung der HA im Überstand kam ein HABP-ELISA-ähnlicher Assay zum Einsatz, während die mRNA-Expression der HA-assoziierten Gene mittels qPCR analysiert wurde. Die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 9 A, verdeutlichten eine signifikante Zunahme der HA-Sekretion nach einem Zeitraum von vier Tagen, gefolgt von einem Rückgang am sechsten Tag, sodass auch OP9-Zellen HA extrudierten. Anhand Abschnitt B und C (Abb.9) konnte gezeigt werden, dass zwar eine mRNA-Expression der HA-Gene vorhanden war, allerdings war hierbei kein Muster ersichtlich. Aufgrund der geringen Übertragbarkeit der Daten von Präadipozyten auf OP9-Zellen erwies sich letztere als ungeeignet für die Fortführung weiterer experimenteller Untersuchungen.

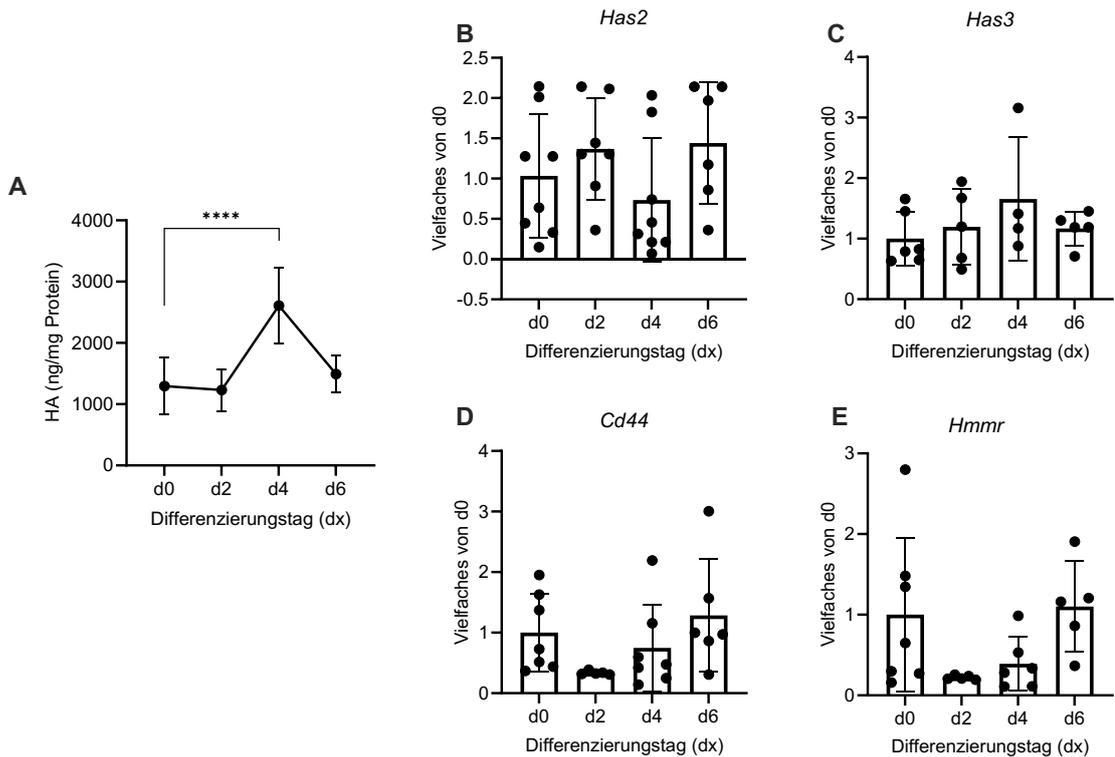


Abb. 9: HA-Sekretion und HA-assoziierte Gene während der Differenzierung von OP9-Zellen

A: HA-ELISA ähnlicher Sandwich Assay von OP9-Zellen im Zeitverlauf von sechs Tagen. Dargestellt sind die Konzentrationen der HA normiert auf die Proteinmenge (ng/mL Protein) zu vier verschiedenen Differenzierungszeitpunkten (dx); (A, n=7-8), Mittelwerte \pm SD, **** $p \leq 0,0001$. Durchführung einer *One-way ANOVA* mit *multiple comparison test* nach Dunnett.

B-E: mRNA-Expression der HA-Isoenzyme *Has2* (B, n=6-7) und *Has3* (C, n=4-6, 5 Werte nicht nachweisbar) und der HA-Rezeptoren *Cd44* (D, n=5-7) und *Hmnr* (E, n=5-7) während der Differenzierung von OP9-Zellen. Das Gen des Isoenzym *Has1* war nicht nachweisbar (nicht dargestellt). Der Genexpressionsunterschied wird im Vergleich zu Tag 0 (d0) als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (normalisiert auf das *housekeeping*-Gen(18S)) aufgeführt. Darstellung als Mittelwert \pm SD.

3.2 Differenzierung von Präadipozyten aus männlichen C57BL/6J-Tieren

3.2.1 ORO-Färbung von Präadipozyten

Präadipozyten wurden aus dem Knochenmark der Tibia von 10-12 Wochen alten C57BL/6J Mäusen isoliert und anschließend unter Verwendung eines Adipozyten-Differenzierungscocktails gemäß den in Abschnitt 2.4 dargelegten Protokollen kultiviert und differenziert. Das Hauptziel dieser Versuche bestand darin, ein Modell für die Differenzierung von Knochenmarkadipozyten zu etablieren, welches für nachfolgende experimentelle Analysen verwendet werden konnte. Nach sechs Tagen der Differenzierung (d6) zeigten die Zellen eine signifikante Zunahme des Lipidgehalts im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt (d0) (in Abb. 10 A dokumentiert). Diese Akkumulation an Lipiden setzte sich bis zum zehnten Tag (d10) fort. Eine repräsentative Darstellung der lipidbeladenen Präadipozyten zehn Tage nach der Induktion der Differenzierung, gefärbt mit ORO, ist Abb. 10 B zu entnehmen. Darüber hinaus wurde das von Knochenmarkadipozyten sekretierte Hormon Adiponektin als Differenzierungsmarker herangezogen [40]. Die Verwendung von Adiponektin ermöglichte es, den Differenzierungsprozess auf genetischer Ebene mittels *Realtime* qPCR zu veranschaulichen. Die mRNA-Expression von Adiponektin verzeichnete ebenfalls einen Anstieg in Präadipozyten (wie in Abb. 10 C dargestellt). Insgesamt bekräftigten die erzielten Ergebnisse die erfolgreiche Differenzierung von Knochenmarkadipozyten mithilfe des verwendeten adipogenen Cocktails. Das Differenzierungsprotokoll bat somit eine geeignete Grundlage für die Fortführung der Untersuchungen zur HA-Matrix und ihrer Rolle in adipogenen Prozessen.

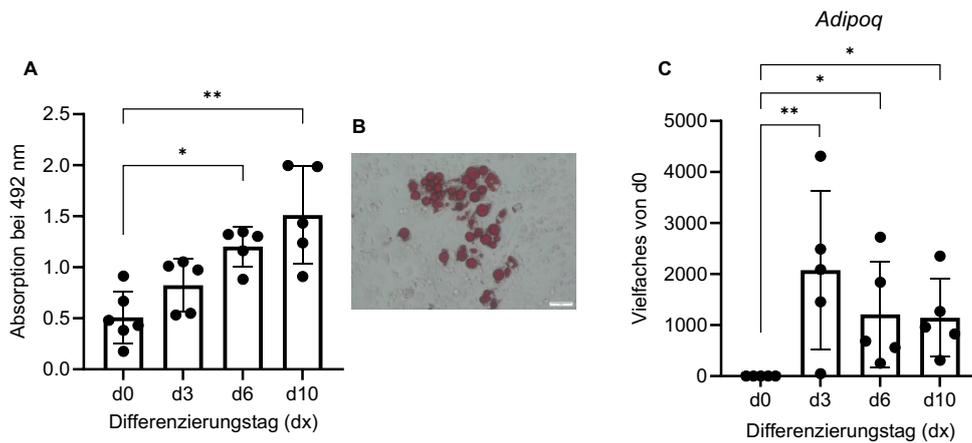


Abb. 10: Differenzierung von Präadipozyten aus der Tibia von männlichen C57BL/6J Tiere im Zeitraum von zehn Tagen

A/B: Knochenmarkadipozyten mit zugehöriger Quantifizierung der Ölrot-O-Intensität (Absorption bei 492 nm) im Verlauf von zehn Differenzierungstagen (**A**, n=5-6) sowie einer repräsentativen Übersichtsaufnahme der Ölrot-O-Färbung nach zehn Tagen; Maßstabballen: 200 µm; Vergrößerung: 10 fach (**B**).

C: mRNA-Expression von Adiponektin (*Adipoq*) in Präadipozyten von männlichen C57BL/6J Tieren mittels *RealTime*-PCR (**C**, n=4-5) im Zeitraum von zehn Tagen (dx).

Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SD, * $p \leq 0,05$; ** $\leq 0,01$. Für die statistische Analyse wurde in **A** und **C** jeweils ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *multiple comparison test* nach Dunn verwendet.

3.3 Charakterisierung der HA-Matrix während der Differenzierung von Präadipozyten

3.3.1 Genexpressionsanalysen der HA-Gene

Im Rahmen der Kultivierung von Knochenmarkadipozyten erfolgte zu definierten Zeitpunkten (dx) die Fixierung der Zellen und die Isolation der mRNA, entsprechend den in Abschnitt 2.7.2 dargelegten Methoden. Die Quantifizierung der Genexpression der HA-synthetisierenden Gene (*Has1*, *Has2*, *Has3*), sowie der HA-assoziierten Gene (*Cd44* und *Hmnr*) wurde mittels quantitativer *RealTime*-qPCR durchgeführt, um Einblicke in die Dynamik der Genexpression während der Adipozytendifferenzierung zu gewinnen.

Anhand der Ct-Werte in Abb. 11 A und 11 B ist nachzuvollziehen, dass die Präadipozyten insbesondere *Has2* im Vergleich zu *Has3* exprimierten. Die Daten in Abb. 11 C und D stellen den Verlauf der mRNA-Expression der HA-Isoenzyme *Has2* und *Has3* in murinen Präadipozyten über einen Zeitraum von zehn Tagen dar. Dabei war das Gen *Has1* während des gesamten Differenzierungsprozesses nicht detektierbar. Obwohl die Expression von *Has3* generell gering zu sein schien, bestand eine Tendenz zu einem ähnlichen Expressionsmuster wie bei *Has2*. Die Ergebnisse werden als Vielfaches der Expression am Tag 0 (d0), also vor Beginn der Differenzierung mittels Adipozyten-Differenzierungscocktail, dargestellt. Die mRNA-Expression HA-assoziiierter Gene in Präadipozyten wie eine oszillierende Genexpression auf.

Sowohl der Rezeptor *Cd44* als auch *Hmnr* (RHAMM) zeigten eine verringerte mRNA-Expression im Vergleich zu Tag 0 und wurden im Laufe der Differenzierung herunterreguliert (mRNA-Expressionsmuster von *Cd44* und *Hmnr* in Abb. 12 A und B dargelegt). Die Ct-Werte für *Cd44* und *Hmnr* sind hier nicht dargestellt.

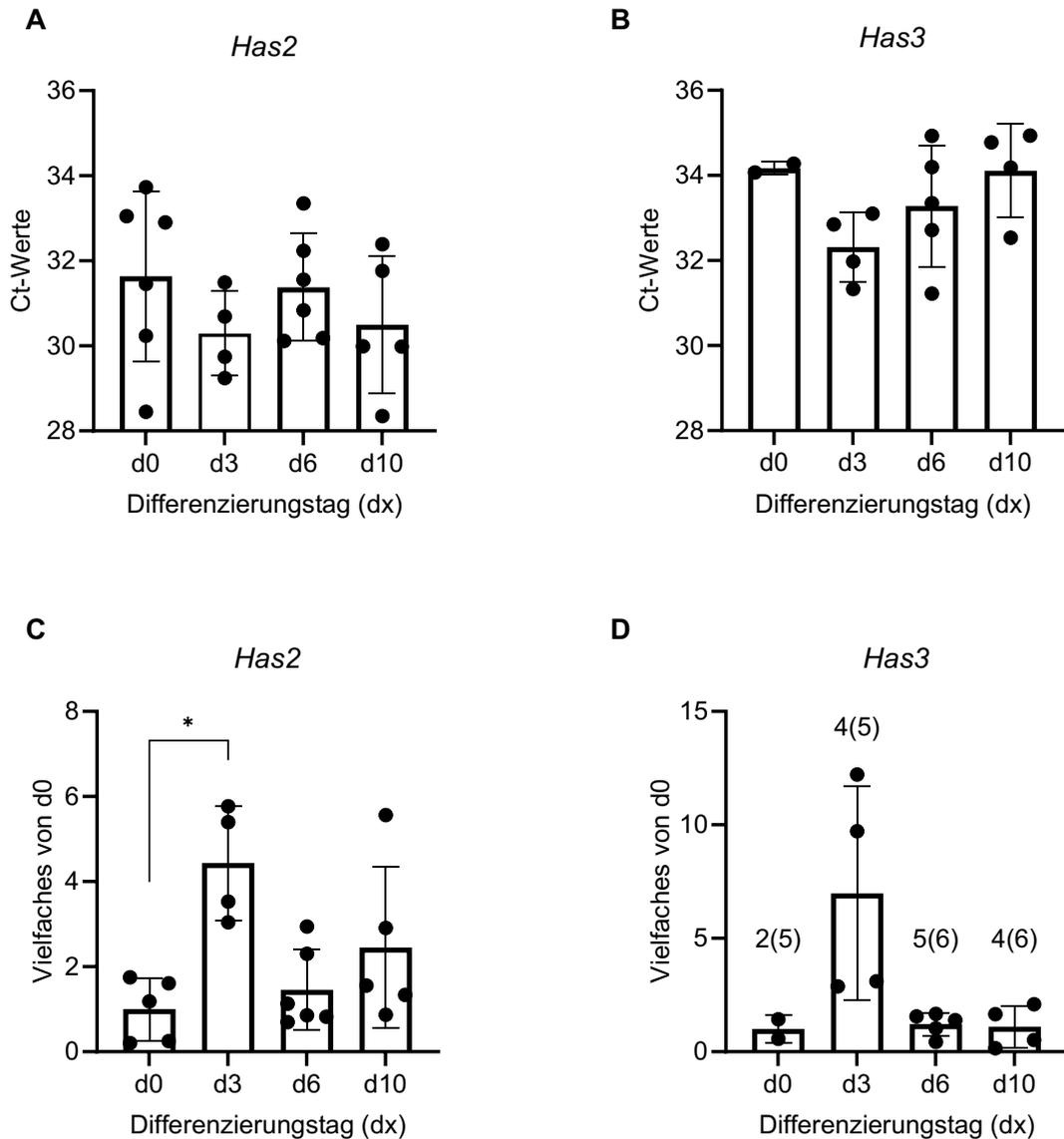


Abb. 11: Ct-Werte und mRNA-Expression der HA-Synthasen Has2 und Has3 aus tibialen Präadipozyten von männlichen C57BL/6J-Tieren nach Differenzierungsinduktion

A/B: Darstellung der Ct-Werte der HA-Isoenzyme *Has2* (A, n=4-6) und *Has3* (B, n=4-5) in Knochenmarkadipozyten im Verlauf von zehn Differenzierungstagen (dx). *Has1* war nicht nachweisbar.

C/D: mRNA-Expression der HA-Isoenzyme *Has2* (C, n=5-6) und *Has3* (D, n=5-6) in Knochenmarkadipozyten. In Grafik D ließen sich nicht alle gemessenen Proben detektieren. Die Gesamtzahl der gemessenen Proben ist daher in Klammern angegeben. *Has1* war über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht nachweisbar. Der Genexpressionsunterschied wird im Vergleich zu Tag 0 (d0) als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (normalisiert auf das *housekeeping*-Gen (18S)) aufgeführt. Die Daten in A und B werden als Mittelwert \pm SD dargestellt, * $p \leq 0,05$. Für Grafik C wurde eine *One-way ANOVA* mit anschließendem *multiple comparison test* nach Dunnett durchgeführt.

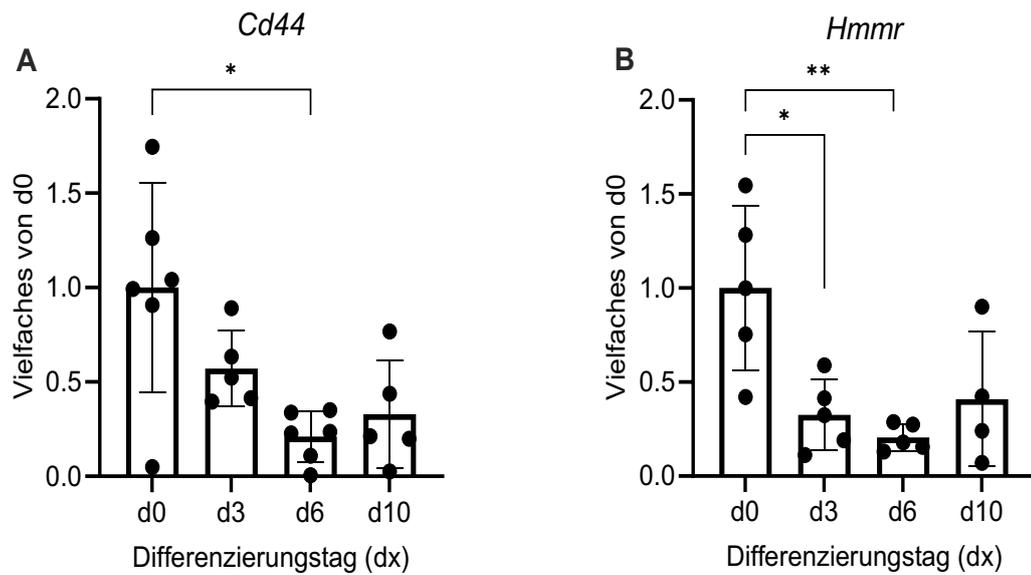


Abb. 12: mRNA-Expression der HA-Rezeptoren *Cd44* und *Hmnr* aus tibialen Präadipozyten von männlichen C57BL/6J-Tieren nach Differenzierungsinduktion

A/B: mRNA-Expression der HA-Rezeptoren *Cd44* (**A**, n=5-6) und *Hmnr* (**B**, n=4-5) während der Differenzierung von Knochenmarkadipozyten. Der Genexpressionsunterschied wird im Vergleich zu Tag 0 (d0) als $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (normalisiert auf das *housekeeping*-Gen (18S)) dargestellt. Mittelwert \pm SD, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. Für Grafik **A** wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *multiple comparison test* nach Dunn und für Grafik **B** wurde eine *One-Way ANOVA* mit *multiple comparison test* nach Dunnett durchgeführt.

3.3.2 Veränderungen der HA-Sekretion im Reifungsprozess der BMAds

Um die Veränderungen der HA-Sekretion im Zuge der Differenzierung von Knochenmarkadipozyten zu quantifizieren, wurde der Zellkulturüberstand während der Kultivierung und Differenzierung der Präadipozyten über einen Zeitraum von zehn Tagen entnommen. Die Bestimmung der HA-Konzentrationen erfolgte mittels eines HABP-ELISA ähnlichem Assay, wobei die ermittelten HA-Werte auf die Gesamtproteinkonzentration des Überstandes normiert wurden. Abb. 13 illustriert die HA-Sekretionsprofile (in ng/ml Protein) über den Beobachtungszeitraum. Initial, am Tag 0 (d0) der Differenzierungsinduktion, sekretierten Präadipozyten eine ähnliche HA-Sekretionsrate. Im weiteren Verlauf, insbesondere ab dem dritten Tag, nahm die HA-Sekretion zu (* $p \leq 0,05$). Die Ergebnisse in Abb. 13 B demonstrieren, dass eine moderate Korrelation zwischen Lipidakkumulation und HA-Sekretionsvolumen ($R^2 = 0,34$) bestand, was darauf hindeutet, dass HA nicht zu allen erfassten Zeitpunkten in konsistenter Weise von Präadipozyten sekretiert wurde. Der signifikante p-Wert (p-Wert = 0,0142) deutet allerdings darauf hin, dass hier ein enger Zusammenhang zwischen den Variablen bestand.

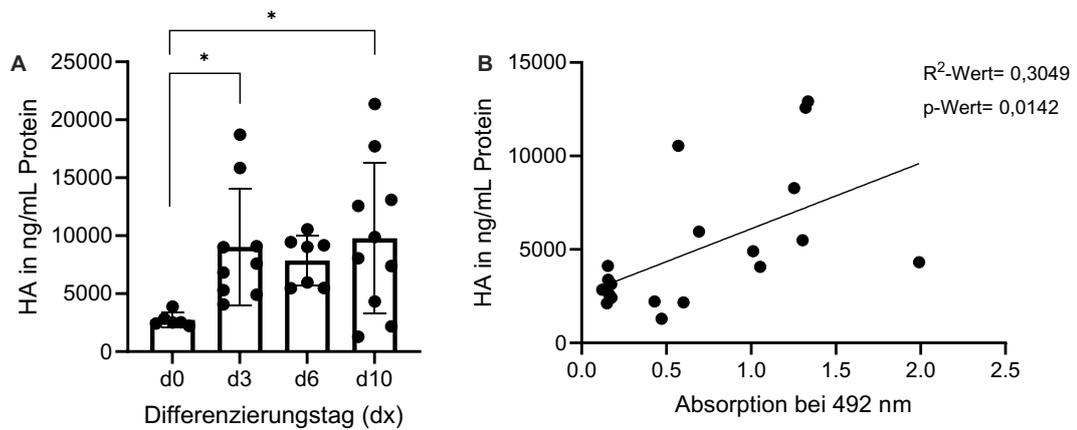


Abb. 13: HA-Sekretion im Reifungsprozess von Präadipozyten von männlichen C57BL/6J Mäusen

A: HA-Bindeprotein-ELISA ähnlicher Sandwich Assay von Präadipozyten im Zeitverlauf von zehn Tagen. Dargestellt sind die Konzentrationen der HA normiert auf die Proteinmenge (ng/mL Protein) zu vier verschiedenen Differenzierungszeitpunkten (dx), (**A**, n=6-10). Daten in **A** als Mittelwert \pm SD. Die Signifikanzen wurden mittels *One-way* ANOVA und anschließendem *multiple comparison* test nach Dunnett berechnet. Der p-Wert stellt hierbei einen Vergleich zwischen der Kontrollgruppe d0 und dx dar, *p \leq 0,05.

B: Lineare Regression der ORO-Färbung (Absorption bei 492 nm) und der dazugehörigen HA-Sekretion mittels HABP-ELISA ähnlichem Assay (ng/ml Protein), (**B**, n=19), R²-Wert= 0,3049, p-Wert=0,0142.

3.4 Differenzierungsvorgang von primären Zellen aus weiblichen C57BL/6J

3.4.1 ORO-Färbung und genetischer Differenzierungsmarker

In einem weiteren Versuch wurden mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede in der Präadipozytendifferenzierung untersucht (Abb. 14 A). Einhergehend mit der moderat zunehmenden Ausreifung der Präadipozyten nahm auch die mRNA-Expression von Adiponektin als Differenzierungsmarker deutlich zu (Abb 14 B).

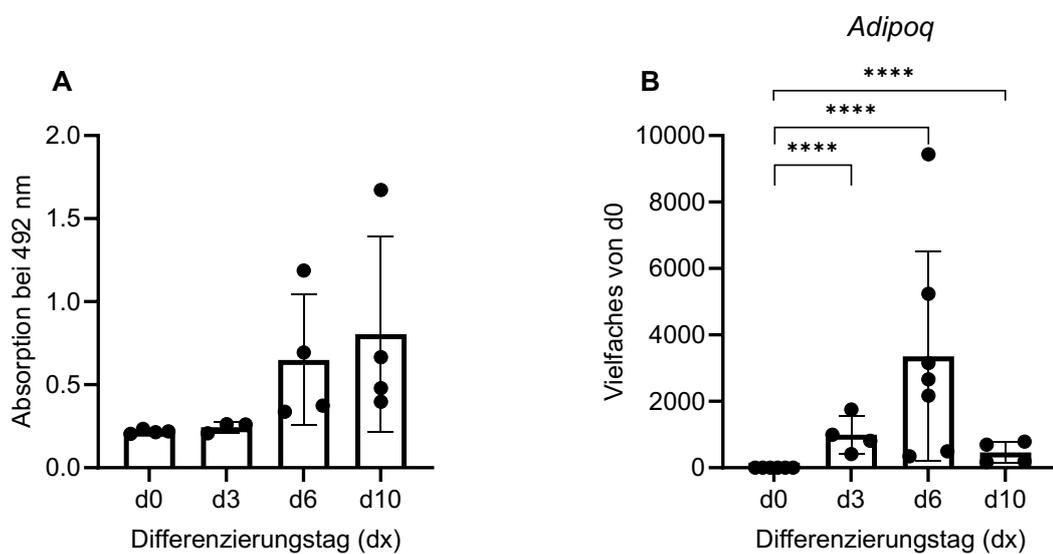


Abb. 14: Präadipozyten aus der Tibia von weiblichen C57BL/6J Tieren im Differenzierungsprozess im Zeitraum von 10 Tagen

A: Präadipozyten mit zugehöriger Quantifizierung der Ölrot-O-Intensität (Absorption bei 492 nm) im Verlauf von zehn Differenzierungstagen (**A**, n=3-4); **B:** Messung der Genexpression der mRNA von Adiponektin (*Adipoq*) mittels *Realtime*-q-PCR (**B**, n=4-7). Die Daten in **A** und **B** werden als Mittelwert \pm SD dargestellt, ****p \leq 0,0001. Der Genexpressionsunterschied wird im Vergleich zu Tag 0 (d0) als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (normalisiert auf das *housekeeping*-Gen (18S)) aufgeführt. Für **B** wurde eine *One-way* ANOVA mit *multiple comparison test* nach Dunnett durchgeführt.

3.4.2 mRNA-Expression HA-assoziiierter Gene während der Differenzierung

Analog zu den Versuchen mit Präadipozyten männlicher Tiere wurde nachfolgend die HA-Matrix der Präadipozyten weiblicher Tiere untersucht. Hierbei war das Gen *Has1* ebenfalls in keiner Probe nachweisbar. *Has2* wurde auch hier in den Zellen von weiblichen C57BL/6J als primäres Isoenzym-Gen exprimiert (vgl. Abb. 15 Grafik A, Ct-Werte nicht dargestellt). Die mRNA-Expression folgte einem oszillierenden Verlauf, wobei *Has2* in Weibchen im Gegensatz zu Männchen herunterreguliert wurde. Die mRNA-Expression von *Has3* war nur in wenigen Proben nachweisbar, sodass hier keine eindeutige statistische Aussage getroffen werden kann (vgl. Abb. 15 B). Die Daten in C und D in Abb. 15 zeigen die mRNA-Expression von *Cd44* und *Hmnr*, die im Verlauf der Differenzierung (d0-d10) im Vergleich zu Tag 0 analog zu den Präadipozyten aus männlichen C57BL/6J herunterreguliert wurden.

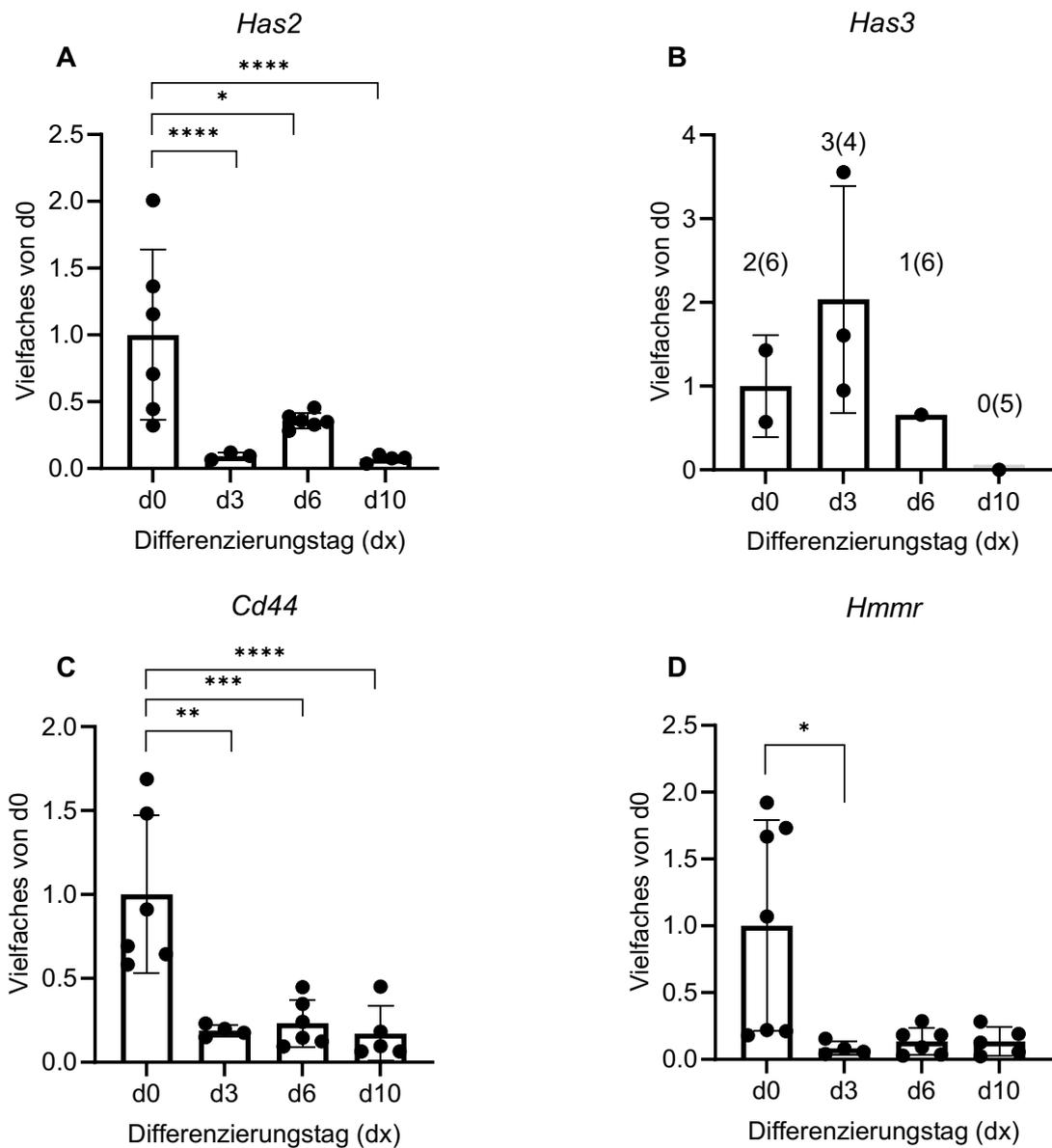


Abb. 15: mRNA-Expression HA relevanter Gene in Prädipozyten aus der Tibia von weiblichen C57BL/6J Tieren im Differenzierungsprozess im Zeitraum von 10 Tagen

A/B: mRNA-Expression der HA-Isoenzyme *Has2* (**A**, n=3-6) und *Has3* (**B**, n=2-3) in Knochenmarkadipozyten. In Grafik **B** ließen sich nicht alle gemessenen Proben detektieren. Die Gesamtzahl der gemessenen Proben ist daher in Klammern angegeben. Das Isoenzym *Has1* war nicht

nachweisbar. Der Genexpressionsunterschied wird im Vergleich zu Tag 0 (d0) als $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (normalisiert auf das *housekeeping*-Gen (18S)) aufgeführt.

C/D: mRNA-Expression der HA-Rezeptoren *Cd44* (**C**, n=4-6) und *Hmnr* (**D**, n=4-7) während der Differenzierung von Knochenmarkadipozyten. Der Genexpressionsunterschied wird im Vergleich zu Tag 0 (d0) als $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (normalisiert auf das *housekeeping*-Gen (18S)) dargestellt.

Die Daten in **A/B/C/D** werden als Mittelwerte \pm SD dargestellt, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. Für die Statistik wurde in **A**, **B** und **C** eine *One-way ANOVA* mit *multiple comparison test* nach Dunnett durchgeführt. Da die Daten in **D** nicht parametrisch waren, wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem *multiple comparison test* nach Dunn verwendet.

3.4.3 HA-Sekretion von Präadipozyten im

Geschlechtervergleich

In Kapitel 2.7.1. wurde die Quantifizierung der HA-Überstände von Präadipozyten aus männlichen C57BL/6J Mäusen mittels HABP-ELISA-ähnlichem Assay beschrieben. Derselbe Versuchsansatz wurde auch bei Präadipozyten von weiblichen C57BL/6J Mäusen durchgeführt. Grafik A in Abb. 16 zeigt eine direkte Gegenüberstellung der HA-Sekretion (in ng/mL Protein) von Präadipozyten aus männlichen und weiblichen Tieren zu vier verschiedenen Zeitpunkten (d0, d3, d6, d10). Die HA-Sekretionsmenge unterschied sich hierbei zu keinem Zeitpunkt im direkten Vergleich signifikant (d0: $p = 0,4602$; d3: $p = 0,8584$; d6: $p = 0,3756$; d10: $p = 0,5960$; vgl. Abb. 16 A:). Unabhängig des Geschlechts produzierten Präadipozyten signifikant HA bereits kurz nach Behandlung mit einem adipogenen Cocktail über den gesamten beobachteten Zeitraum (Abb. 16 B).

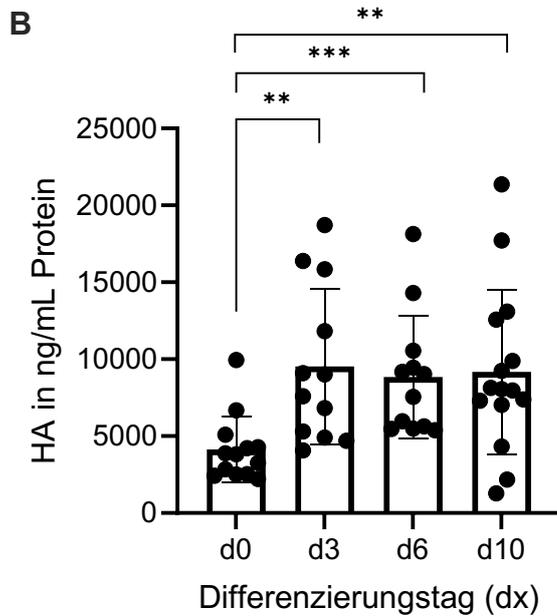
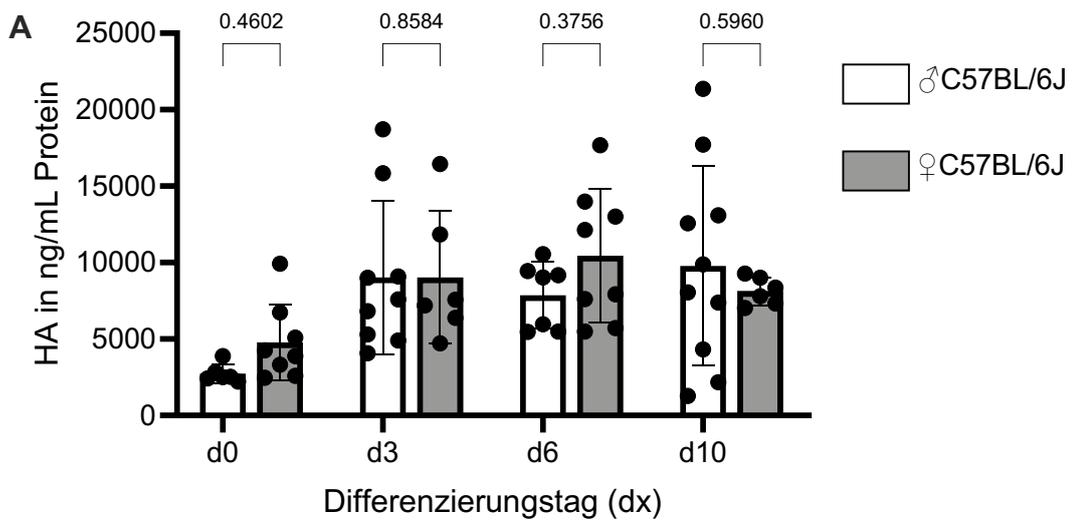


Abb. 16: Geschlechtsspezifischer Vergleich der HA-Sekretion in Präadipozyten aus dem tibialen Knochenmarkstroma von männlichen und weiblichen C57BL/6J Versuchstiere

In Abb. **A** ($n=6-10$) wird die sekretierte HA-Menge (ng/ml Protein) während der Differenzierung von Knochenmarkadipozyten zu den Zeitpunkten d0, d3, d6, d10 aus männlichen und weiblichen C57BL/6J-Mäusen direkt miteinander verglichen. Grafik **B** summiert die sekretierte HA-Menge (in ng/mL Protein) sowohl der männlichen und weiblichen Tiere über einen Zeitraum von zehn Tagen (dx). Für die statistische Analyse wurde in **A** eine *Two-Way ANOVA* mit einem multiplen Vergleichstest nach Sidak und in Grafik **B** ein *Kruskal-Wallis Test* mit einem *multiple comparison test*

nach Dunn verwendet. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD dargestellt, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$, *** $p \leq 0,0001$.

3.5 Einfluss einer HA-Inhibition auf die Differenzierung von Knochenmarkadipozyten

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde der Effekt einer Inhibition der HA durch 4-Methylumbelliferon (4-MU) auf die Adipogenese von Präadipozyten analysiert. Die Ergebnisse demonstrierten eine Beeinträchtigung der Adipogenese in Adipozyten, die mit 4-MU behandelt wurden, wie in Abb. 17 A dargestellt. In einem anschließenden *rescue*-Experiment wurden murine BMAds, die 24 Stunden nach der Einleitung der Differenzierung mit 100 μ M 4-MU vorbehandelt waren, mit 50 μ g hochmolekularer HA (HMW-HA) versetzt. Dieses Vorgehen zielte darauf ab, zu evaluieren, ob 4-MU direkt eine verringerte HA-Sekretion bewirkt und dadurch die Differenzierung von BMAds hemmt. Die in Abb. 17 A präsentierten Ergebnisse verdeutlichen, dass der durch 4-MU induzierte Effekt durch die Zugabe von HMW-HA aufgehoben werden konnte, sodass die Adipogenese der Präadipozyten nicht eingeschränkt wurde: Die Zellen differenzierten zudem moderat schlechter bei Zugabe von 1 U/500 μ L Hyaluronidase während der Differenzierung ($p = 0,1185$; vgl. Abb. 17 B). Diese Befunde legen nahe, dass die HA-Matrix eine zentrale Rolle im Prozess der Differenzierung von Knochenmarkadipozyten einnimmt.

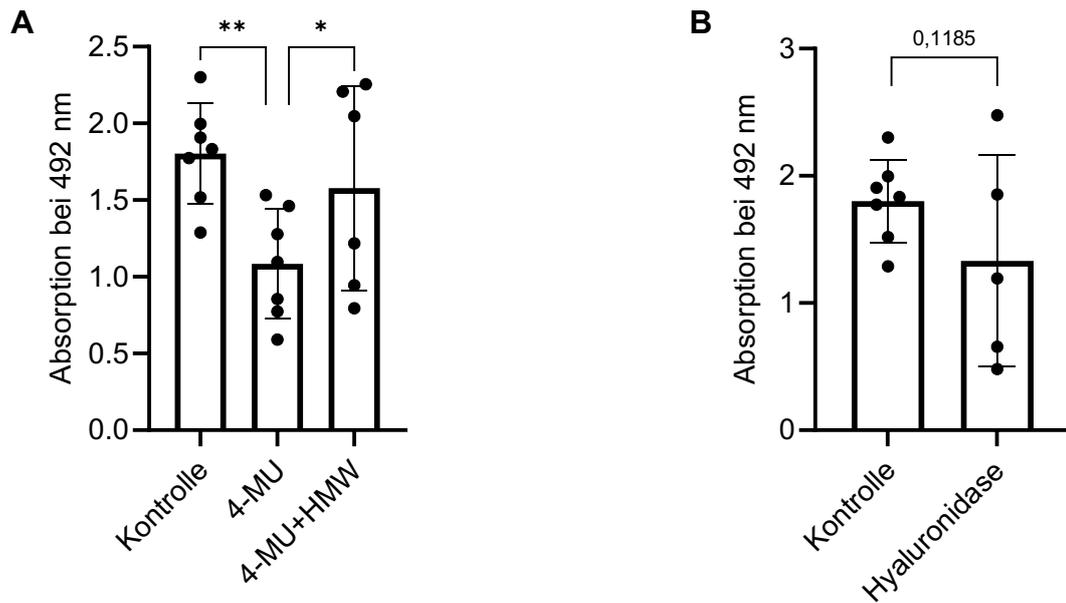


Abb. 17: Einfluss einer HA-Inhibition auf die Differenzierung von BMAds

A: Dargestellt wird die Absorptionsmessung bei 492 nm nach ORO-Färbung von vorbehandelten Knochenmarkadipozyten aus den Tibiae von männlichen C57BL/6J Mäusen zehn Tage nach Differenzierungsinduktion mit 4-MU (n=7) und 4-MU + HMW nach 24 Stunden (n=6), im Vergleich zu einer Kontrolle (n=7), die nach Differenzierungsprotokoll ohne zusätzliche Behandlung kultiviert wurde (Konzentration 4-MU: 100 μ M; Konzentration 4-MU + HMW: 100 μ M und 50 μ g)

B: Vergleich der Absorptionsmessung bei 492 nm von Knochenmarkadipozyten einer Kontrollgruppe (n=7) mit einer mittels Hyaluronidase (Konzentration: 1 U/500 μ l) behandelten Gruppe (n=5) zehn Tage nach Differenzierungsinduktion. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SD dargestellt. In **A** wurde eine *One-way ANOVA* mit anschließendem *multiple comparison test* nach Dunnett und für **B** ein gepaarter t-Test durchgeführt; ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$.

4. Diskussion

Diverse Forschungsarbeiten zeigten, dass HA sowohl im braunen als auch weißen Fettgewebe regulative Rollen besitzt [74, 82, 85]. So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine HA-Inhibition im WAT zu einer Reduktion der Adipogenese führte, während sie im BAT eine Verbesserung der Glukosehomöostase bewirkte [74]. Aktuell liegen keine Studien vor, die aufschlüsseln, ob eine HA-Matrix auch im BMAT vorhanden ist und inwiefern HA die EZM von BMAT funktionell moduliert. Ziele der hier vorliegenden Arbeit waren daher, zunächst ein Modell zur Differenzierung von Knochenmarkadipozyten zu generieren und erstmalig die HA-Matrix von Knochenmarkadipozyten umfassend im Verlauf der Adipogenese zu untersuchen. Anschließend wurde der funktionelle Effekt einer Inhibition der HA-Synthese untersucht. BMAT ähnelt zwar morphologisch WAT, unterscheidet sich aber hinsichtlich der Ursprungszelle, der Lokalisation und der sekretorischen Fähigkeiten sowie Funktionen. Analog zu den Ergebnissen im BAT und WAT könnte die Adipogenese der Knochenmarkadipozyten auch mit der funktionellen Rolle der HA zusammenhängen.

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit werden nachfolgend im Kontext des aktuellen Forschungsstands diskutiert und analysiert. Hierbei wird sich zunächst mit der Diskussion des Modells zur Differenzierung von Knochenmarkadipozyten befasst. Im weiteren Verlauf werden die Daten zur HA-Matrix durch Untersuchungen hinsichtlich der HA-Sekretion, der mRNA-Expression HA-assoziiierter Gene sowie geschlechtsspezifischer Unterschiede im HA-System charakterisiert. Abschließend wird der Einfluss der pharmakologischen HA-Inhibition auf die Adipogenese von BMAds diskutiert.

4.1 Generierung eines Modells zur Differenzierung von Knochenmarkadipozyten

In einem ersten Schritt wurde ein Modell zur Differenzierung von Knochenmarkadipozyten etabliert, um die biologischen Prozesse in diesen Zellen besser zu verstehen. Ausgangspunkt war die Verwendung von OP9-Zellen, die in der Literatur als etabliertes Modell für die Differenzierung zu Knochenmarkadipozyten beschrieben wurden [86]. OP9-Zellen sind fibroblastenähnliche embryonale Stammzellen aus murinem Knochenmarkstroma und wurden in dieser Arbeit genutzt, um ihre Eignung für die Untersuchung der HA-Matrix in BMAds zu prüfen [86]. Das Differenzierungsmedium basierte hierbei auf dem adipogenen Cocktail, welcher auch für 3T3L1-Zellen, einer einleitend erwähnten murinen weißen Präadipozyten-Zelllinie, verwendet wird [86]. Trotz der etablierten Protokolle zeigten die OP9-Zellen in dieser Arbeit jedoch eine unzureichende Differenzierung zu Adipozyten. Mögliche Ursachen hierfür könnten spezifische Handhabungsprobleme oder die Verwendung von hohen Passagennummern (10-14) sein, die die Differenzierungsfähigkeit der Zellen beeinträchtigen könnten, sodass diese kaum adipogene Eigenschaften angenommen haben. Laut Literatur ist dieser Effekt allerdings zu vernachlässigen [86]. Im Zuge des Versuchs wäre auch die Verwendung eines modifizierten Differenzierungscocktails denkbar gewesen. Die Zellen selbst extrudierten im Verlauf zwar HA und exprimierten verschiedene Gene sowohl für die HA-Rezeptoren als auch die HA-Synthasen. Allerdings konnte auf Basis der qPCR weder eine eindeutige Aussage zu den HA-Synthasen noch zu den HA-Rezeptoren getroffen werden. Der Einsatz von OP9-Zellen erwies sich somit insgesamt als ungeeignet. Da die Daten *ex vivo* kaum kohärent zu murinen Knochenmarkadipozyten waren und deutliche Unterschiede zeigten, wurden im Verlauf der Arbeit daher nur noch primär isolierte Präadipozyten aus dem Knochenmarkstroma von C57BL/6J-Mäusen verwendet. Die Etablierung eines zuverlässigen *in vitro*-Modells ist entscheidend für die Untersuchung der Adipogenese in Knochenmarkadipozyten. Denkbar wäre auch hier die Verwendung eines anderen Modells. Neben OP9-Zellen konnten die Gruppe um Lee *et al.* 2021 zeigen, dass auch *bone lining cells* (Knochenoberflächenzellen) als Quelle zur Differenzierung für Knochenmarkadipozyten genutzt werden konnten [87]. Dieses

Protokoll erwies sich jedoch für die hier geplanten Versuche als zu aufwendig und wenig erfolgsversprechend.

Im Zuge der weiteren Entwicklung eines Modells zur Differenzierung von BMAds wurden nachfolgend Präadipozyten aus dem stromalen Kompartiment der Tibiae von männlichen C57BL/6J- Mäusen isoliert und anschließend kultiviert. Die generierten *in vitro* Daten verifizierten eine erfolgreiche Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten. Aus der Literatur geht hervor, dass die Präadipozyten nach Differenzierungsinduktion multiple mitotische Zyklen durchlaufen, bevor sie in der G₁-Phase des Zellzyklus in einen Zellarrest übergehen [16, 88]. In dieser Phase entscheidet sich, ob die Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten, ihre fibroblastischen Eigenschaften verlieren und durch Triglyzeridakkumulation Charakteristika reifer Adipozyten annehmen [16, 88]. Die Verwendung eines Differenzierungscocktails mit adipogenen Faktoren, wie in der vorliegenden Arbeit verwendet, erwies sich als fundamental, um den Wiedereinstieg in den Zellzyklus und somit die terminale Differenzierung zu Adipozyten zu gewährleisten [16, 88]. Bekannt ist, dass die Präadipozyten daraufhin acht bis zehn Tage benötigen, um auszureifen [89]. Ein Bestandteil dieses Cocktails war unter anderem Insulin. Die Verwendung von hoch konzentriertem Insulin ist wichtig, da dieses an den IGF-1 Rezeptor bindet und somit die Expression der Transkriptionsfaktoren wie *C/EBP* induziert, die den adipogenen Phänotypen maßgeblich formen [16, 88, 90].

Da sich weiße Fettzellen und Knochenmarkadipozyten morphologisch und phänotypisch sehr ähneln, wurde für die Etablierung eines Protokolls zur Differenzierung von Knochenmarkadipozyten ein ähnlicher Mechanismus vermutet. Die konstitutiven Knochenmarkadipozyten sind, wie die Zellen im WAT, durch die frühe und erhöhte Expression der *C/EBP*-Familie und PPAR_γ charakterisiert [30, 91]. PPAR_γ ist wie *C/EBP* ein zentraler Transkriptionsfaktor, der verschiedene adipogene regulatorische Enzyme wie die Lipoproteinlipase aktiviert und somit die endgültige Adipozytenformation fördert [88]. Wie einleitend erwähnt, ist der PPAR_γ Signalweg zudem unerlässlich in der Formation von MSZ zu reifen BMAds [31]. Die Aktivierung von PPAR_γ induziert die Differenzierung zu Knochenmarkadipozyten und kann die mögliche Bildung von Osteoblasten unterdrücken [24]. Rosiglitazon, ebenfalls ein Bestandteil des Differenzierungscocktails,

ist ein solcher PPAR_γ-Agonist, der ursprünglich in der Therapie von T2D eingesetzt wurde, um die Insulinsensitivität zu erhöhen. Die erfolgreiche Umwandlung von Präadipozyten in reife Adipozyten hing somit stark von der korrekten Anwendung eines Differenzierungscocktails ab, was die Bedeutung adipogener Faktoren in der komplexen Steuerung der Zelldifferenzierung hervorhebt.

Die bereits genannten Transkriptionsfaktoren spielen auch eine essenzielle Rolle in der Adipogenese von Knochenmarkadipozyten. Speziell die Sekretion von Adiponektin durch BMAdS wurde untersucht, indem der Verlauf der mRNA-Genexpression dieses Adipokins als später Differenzierungsmarker verwendet wurde, um eine erfolgreiche Bildung der Adipozyten zu überprüfen [42, 91]. Das hormonell aktive Adiponektin ist wichtig für die Fettoxidation und die Insulinsensitivität [42]. Zudem spielt es beispielsweise als metabolischer Modulator während der Expansion von BMAT bei kalorischer Restriktion eine entscheidende Rolle, denn eine Ablation von BMAT führt auch zu niedrigeren Adiponektin Spiegeln, wie einleitend erwähnt [42]. Bereits präadipozytäre Vorläuferzellen weisen eine Expression des Adiponektin-Gens (*Adipoq*) auf, dessen Genexpression während der Reifung zunimmt [91]. In diesem Kontext wurde ebenfalls gezeigt, dass Präadipozyten vor Induktion kaum *Adipoq* aufwiesen, welches dann allerdings vor allem zu Beginn der Differenzierung aber auch im Verlauf überexprimiert wurde. Somit konnte auch in der hier isolierten Zelle auf genetischer Ebene eine erfolgreiche Differenzierung von Präadipozyten nachgewiesen werden.

Ziel war es, möglichst den physiologischen Prozess der Adipogenese in Knochenmarkadipozyten nachzuvollziehen. Eine Studie zur Differenzierung von 3T3-L1-Zellen zeigte, dass Zellen, die einer höheren Glukosekonzentration von 4,5 g/L ausgesetzt wurden, reaktive oxidative Spezies entwickelten und das hyperglykämische Milieu eine Insulinresistenz mit proinflammatorischer Antwort begünstigte [92]. Die Präadipozyten in dieser Arbeit wurden ebenfalls in einer höheren Glukosekonzentration kultiviert (4,5 g/L). Für weitergehende Forschungsvorhaben auf Basis dieser Arbeit gerade auch im Kontext eines Diabetes wäre

es daher interessant, Präadipozyten aus dem Knochenmark vergleichend in einer hypo- und hyperglykämischen Umgebung zu kultivieren und die HA-Matrix im diesem Kontext zu untersuchen.

Zusammengefasst wurde ein zuverlässiges *in vitro*-Modell etabliert, um murine Präadipozyten zu reifen Adipozyten zu differenzieren. Die Methode bietet dementsprechend eine geeignete Grundlage, um die physiologische und pathologische Plastizität der HA-Matrix während der Adipogenese von Knochenmarkadipozyten zu untersuchen.

4.2 Charakterisierung der HA-Matrix in Knochenmarkadipozyten

Nachfolgend wird diskutiert, ob BMAT eine HA-reiche EZM aufweist und falls ja, wie diese während der Differenzierung reguliert wird. Aus der Literatur ist bisher nicht bekannt, ob eine HA-Matrix im Knochenmarkfettgewebe vorliegt. Verschiedene Untersuchungen haben die zentrale Bedeutung von HA in anderen Fettgeweben verdeutlicht: Diverse Studien belegten, dass die HA-Synthese im anerkannten WAT-Modell der 3T3-L1-Zellen während der Adipogenese hochreguliert wird und auch notwendig für die Adipogenese ist [82, 93, 94]. Die Hypertrophie in weißen Adipozyten korrelierte ebenfalls mit der HA-Synthese. Auch die Rolle von HA im BAT wurde beleuchtet, so dass in einer Studie von Grandoch *et al.* 2019, festgestellt wurde, dass HA einen Einfluss auf die Glukosehomöostase und auf die thermogene Kapazität hatte [74]. In der hier vorliegenden Arbeit wurden Messungen des HA-Überstands mittels HABP- ELISA-ähnlichem Assay durchgeführt. Die Daten demonstrierten, dass sowohl Präadipozyten aus dem Knochenmarkstroma männlicher und weiblicher C57BL/6J-Mäuse vor Induktion der adipogenen Differenzierung eine vergleichbar hohe Menge an HA sezernierten (vgl. Abb. 16). Vor allem zu Beginn des Reifungsprozesses nach drei Tagen Differenzierung extrudierten Adipozyten vermehrt HA. Die Daten ließen die Vermutung zu, dass BMAT ähnlich wie WAT und BAT eine HA-reiche EZM besitzt. Die lineare Regression zeigte, dass eine statistisch signifikante Beziehung zwischen dem Differenzierungsstatus und der HA-Sekretion bestand. Auch wies der R^2 -Wert darauf hin, dass die beiden Variablen moderat korrelierten, allerdings ist die Beziehung wahrscheinlich komplexer war, als hier untersucht wurde. Da die HA-Sekretion einem eher oszillierenden Muster folgte, könnte dies bedeuten, dass HA nicht direkt mit der Lipideinlagerung der Adipozyten korrelierte, sondern dass sie eher benötigt wurde, um die initiale Differenzierung und Adipogenese in Gang zu setzen. BMAds könnten HA möglicherweise auch für die frühe Ausreifung und

die Anpassung der EZM benötigen, was die zunehmende HA-Sekretion vor allem zu Beginn der Differenzierung erklären könnte.

4.2.1 Regulation der mRNA-Expression HA-assoziiierter Gene während der Adipogenese von Knochenmarkadipozyten

Für die Untersuchung der HA-assoziierten Gene wurde eine Analyse der mRNA-Expression der HA-Synthasen und Rezeptoren mittels qPCR durchgeführt. Das Gen *Has2* wurde vor allem nach drei Tagen hochreguliert, was zeitlich konkordant mit der gemessenen HA-Sekretion im ELISA war (siehe Abb. 11 und 12). *Has3* konnte hingegen kaum nachgewiesen werden und spielte laut ersten *in vivo* Daten aus dem eigenen Institut auch tatsächlich eine eher untergeordnete Rolle. Die Ergebnisse in dieser Arbeit können die Relevanz von *Has3* jedoch nicht komplett ausschließen. Allerdings bekräftigen die niedrigeren Ct-Werte von *Has3*, dass das Gen *Has2* die dominierende Isoform der HA-Synthasen in BMAds *in vitro* ist. Diese These wird zudem unterstützt, da bekannt ist, dass HAS2 die Hauptisoform in adultem weißem Fettgewebe ist [95]. Die tragende Rolle und Funktion von HAS2 im WAT wurde auch weiter eruiert: In einer Studie von Ji *et al.* aus dem Jahr 2014, wurde *Has2*-siRNA in 3T3-L1-Zellen transfiziert, welche zu einer verminderten Lipidakkumulation, zu einer geringeren Expression der adipogenen Transkriptionsfaktoren PPAR γ und Fabp4 und somit zu einer schlechteren Differenzierung jener Zellen führte [96]. Dass HAS2 auch in BMAds eine ähnliche Funktion aufweisen könnte, scheint daher plausibel. Die spezifische Rolle von HAS2 in BMAds erfordert allerdings weitere detaillierte Untersuchungen. Aktuelle Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe stützten und bestätigten die Erkenntnisse dieser Arbeit, dass *Has2*-mRNA in BMAT *in vivo* exprimiert wird. Die exakte Modulation der Adipogenese in Knochenmarkadipozyten durch HAS2 bedarf jedoch weiterer Klärung.

Die Expression von *Has1* konnte hingegen in keiner BMAd Probe nachgewiesen werden. Bei den HA-Synthasen handelt es sich allerdings um *low-copy* Gentranskripte, sodass diese in der genomischen Analyse womöglich nicht messbar waren und nicht erfasst werden konnten [51]. Insgesamt sind die Aussagen der qPCR limitiert. Um die Daten zu stützen, wäre eine zusätzliche Sekretomanalyse

erstrebenswert, zumal die gemessene mRNA nicht zwingend die auch gebildete HA-Konzentration widerspiegelt.

Die Ergebnisse zur Genexpressionsanalyse der HA-Rezeptoren veranschaulichten eine gleichzeitige Herunterregulation von *Cd44* und *Hmmr* während der Differenzierung (vgl. Abb. 12). Dies würde die Aussage unterstützen, dass Präadipozyten in einer frühen Phase HA freisetzen. Ein hohes Angebot an HA könnte eine Reduktion der Rezeptoren im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus bedingen. Die genaue Rolle von RHAMM bleibt in der Literatur wenig beleuchtet. Eine Studie im murinen weißem Fettgewebe veranschaulichte, dass HA als Ligand für CD44 und RHAMM die Differenzierung von adipösen Stammzellen zu Adipozyten begünstigte [97]. Die mRNA-Expression der HA-Rezeptoren ging mit dem Reifungsprozess der Adipozyten einher [97]. Da die Rezeptor-Liganden-Bindung von CD44 beziehungsweise RHAMM und HA im WAT somit unentbehrlich für die Formation von Adipozyten ist und wäre dieser Mechanismus auch im BMAT ebenfalls plausibel.

Wie bereits beschrieben, stellten mehrere Studien fest, dass die Inhibition des HA-Rezeptors CD44 zu einer Reduktion der Insulinresistenz im murinen WAT führt [69-71]. Da aus der Literatur bisher keine Untersuchungen zu CD44 und BMAT, geschweige zur Wechselbeziehung unter hyperglykämischen Konditionen vorliegen, wäre ein ähnlicher Mechanismus hier noch zu untersuchen.

Um die genauen Rollen der HA-Gene im Differenzierungsprozess weiterführend zu revidieren, sind weitere spezifische Studien mit individuellen *knockout* der HA-Isoenzyme und Rezeptoren nötig, um die Veränderung der HA-Matrix und die Differenzierung nachzuvollziehen. Unveröffentlichte *in vivo* Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe mit *Has2-knockout* Tieren zeigten, dass die Adipogenese von BMAds insgesamt reduziert war. Dies unterstützt die These, dass HAS2 unentbehrlich für die Adipozytenreifeung ist.

Die durchgeführten Untersuchungen ermöglichen eine umfassende Betrachtung der Regulation der Genexpression der HA-Synthasen während der Differenzie-

rungsprozesse. Die vorliegende Arbeit zeigt somit zusammenfassend, dass neben den bekannten Fettgewebstypen auch das Knochenmarkfettgewebe eine HA-Matrix bildet und die HAS2 hierbei die vorrangige HA-Synthese in BMAds ist.

4.2.2 Geschlechtsspezifische Veränderungen der HA-Matrix

während der Differenzierung von Knochenmarkadipozyten

In der aktuellen Literatur wird kaum beleuchtet, wie sich die HA-Matrix geschlechtsspezifisch im WAT oder BAT verhält. Eine Gruppe um Bahrami *et al.* stellte 2017 fest, dass eine Deletion von CD44 zu einer signifikanten Abnahme von WAT in weiblichen Mäusen führte, wobei RHAMM-negative weibliche Mäuse deutlich mehr im Vergleich zu CD44-negativen weiblichen Mäusen wogen. Die Deletionen beider Rezeptoren hatten hingegen keinen Effekt auf das WAT-Volumen männlicher Mäuse [97]. Die HA-Matrix im BAT weiblicher Mäuse wurde bisher nicht untersucht. Auch die Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede der HA-Matrix im BMAT selbst wäre interessant und relevant. Bekannt ist, dass das Vorkommen von BMAT auch vom Geschlecht abhängt. Männer verfügen zwar grundsätzlich über eine größere Knochenmarkreserve als Frauen, dieser Grundsatz dreht sich allerdings mit dem Eintritt in die Menopause um [98]. Eine Studie zeigte zudem, dass die Induktion einer Östrogendefizienz in einem Mausmodell ebenfalls zur Abnahme des BMAT-Volumens führte [99]. Wie die HA-Matrix im BMAT geschlechtsspezifisch moduliert wird, geht aus der aktuellen Literatur jedoch nicht hervor. Um dies zu untersuchen, wurden für den geschlechtsspezifischen Vergleich der HA-Matrix in BMAds Präadipozyten 10-12 Wochen alter weiblicher C57BL/6J Tiere verwendet. Die vergleichende Betrachtung der HA-Sekretion zwischen männlichen und weiblichen Präadipozyten unterstreicht, dass die HA-Sekretionsprozesse von Knochenmarkadipozyten nicht geschlechtsspezifisch differierten und *Has2* in beiden Geschlechtern die vorrangige Isoform der HA-Synthesen war. Zudem wurden die HA-Rezeptoren *Cd44* und *Hmnr* analog zu den Männchen im Verlauf herunterreguliert. Hinsichtlich der Regulation der HA-Rezeptoren und der HA-Sekretion stehen diese somit im Einklang mit Präadipozyten aus männlichen C57BL/6J-Tieren. Allerdings variieren die Daten in einem Punkt: Im Vergleich zu den Männchen wurde *Has2* im Verlauf der Differenzierung in Weibchen herunterreguliert. Denkbar wäre hier, dass eine Hochregulation von *Has2* bereits vor Tag 3 stattfand, die mittels der vorliegenden

Daten nicht erfasst wurde. Die Frage, ob geschlechtsspezifische hormonelle Faktoren einen Einfluss auf die Adipogenese und die HA-Matrix ausübten, ließ sich anhand von *in vitro* Analysen nicht abschließend beantworten. Da in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur Vergleichsdaten fehlen, sind weitere *in vivo* Untersuchungen erforderlich, um diese Frage zu klären.

4.3 Veränderungen der Adipogenese in Knochenmarkadipozyten nach HA-Inhibition

Um die funktionelle Relevanz der HA für die Adipogenese von Knochenmarkadipozyten zu bestätigen, wurde der Effekt der Synthesehemmung durch 4-Methylumbelliferon (4-MU), einem unspezifischen Hemmstoff der HA-Synthasen, untersucht. Das Ziel war es zu evaluieren, ob die Applikation von 4-MU eine Reduktion in der Differenzierung von BMAds induzierte. Dabei konnte nach ORO-Färbung und Absorptionsmessung gezeigt werden, dass die Zellen unter Behandlung von 4-MU schlechter zu Adipozyten differenzierten. Die Inhibition der HA-Synthese lässt sich, wie einleitend erwähnt, über zwei Mechanismen erklären: Das Mittel inhibiert als Substrat die UDP-Glukuronosyltransferase, womit das Angebot an zytosolischer UDP-Glukuronsäure reduziert wird, die für den Aufbau der HA benötigt wird. Zum anderen hemmt 4-MU die Expression der Gene *Has2* und *Has3* [74, 76, 77]. Die HA-Synthese kann grundsätzlich somit auf mehreren Ebenen zuverlässig inhibiert werden. Allerdings bleibt fraglich, ob die schlechtere Differenzierung im dargelegten Experiment allein auf die Inhibition der HA-Sekretion zurückzuführen war. Um die Relevanz der HA für die gezeigten Effekte zu belegen, wurde ein *rescue*-Versuch mittels *high molecular weight*-HA (HMW-HA) durchgeführt, welcher den antiadipogene Effekt von 4-MU rückgängig machen konnte. Dies lässt die Hypothese zu, dass 4-MU lediglich zur Inhibition der HA-Synthese beigetragen hat und der Effekt mittels HMW-HA reversibel war. Auch die einmalige Behandlung der Präadipozyten mit Hyaluronidase führte zu einer marginal schlechteren Differenzierung. Die tragende Rolle von HA wird auf Basis dieser Daten dementsprechend deutlich: BMAds scheinen HA für die Adipogenese und Differenzierung zu benötigen, da sowohl eine pharmakologische Inhibition mit 4-MU als auch ein Verdau mit Hyaluronidase zur verminderten Differenzierung führte und dieser Effekt mittels HMW-HA reversibel war. Allerdings hemmt 4-MU die HA-Synthese unspezifisch, weshalb mittels der vorliegenden Daten nicht geklärt werden konnte, über welche HA-Synthase 4-MU seine Effekte auf die BMAds und deren Adipogenese ausübte. Zudem war der Aufbau des Experiments limitiert, da HMW-HA nur zu Beginn einen Tag nach Induktion der Differenzierung und Behandlung mit 4-MU appliziert wurde. Diskutabel bleibt daher, ob derselbe Effekt eingetreten wäre, wenn man HMW-HA zu einem späteren

Zeitpunkt nach einer längeren Behandlung mit 4-MU gegeben hätte beziehungsweise ob derselbe Effekt durch den *rescue*-Versuch eingetreten wäre. Zudem wäre interessant zu untersuchen, wie sich verschiedene HA-Größen auf die Adipogenese auswirken. In einer weiteren Studie zur 3T3-L1-Zelllinie führte die Verwendung von *medium molecular weight*- HA-Fragmenten (50kDa) zu einer verminderten Lipidakkumulation [100]. So bleibt unklar, ob auch die Verwendung von kleineren HA-Fragmenten zu einer schlechteren Adipogenese in BMAds geführt hätte und möglicherweise kein *rescue* möglich gewesen wäre.

Insgesamt stützen zahlreiche Studien aus der Literatur die Daten, in denen der Effekt von 4-MU auf WAT untersucht wurde: Die Inhibition der HA-Synthese in 3T3-L1-Zellen durch 4-MU führte zu einer schlechteren Differenzierung von Adipozyten [82]. Weiterhin wurde in Untersuchungen von Grandoch *et al.* 2019 festgestellt, dass die HA-Inhibition mit 4-MU in murinem weißem Fettgewebe eine Reduktion der Adipozytengröße sowie eine Abnahme entzündlicher Prozesse herbeiführte [74]. Diese Erkenntnisse und die vorliegenden Daten lassen darauf schließen, dass 4-MU auch in BMAds eine ähnlich inhibierende Wirkung auf die Differenzierung ausübte. Dies stützt die These, dass HA somit essenziell in der Adipogenese von BMAds ist.

Es bedarf weiteren Untersuchungen, wie sich die HA-Matrix und BMAds bei beispielsweise *Cd44*- und *Hmmer-knockout* Mäusen oder bei pharmakologischer Hemmung der HA-Rezeptoren verändern würde. Denkbar wäre eine spezifischere Hemmung, indem beispielsweise die Zellen mittels kleiner interferierender RNA (*small interfering* RNA, siRNA) transfiziert werden, um einen genetischen *knockout* der genannten Moleküle zu induzieren. Interessanterweise wurden in Fortführung dieses Projekts *in vivo* Antikörper gegen CD44 verwendet, um die spezifische Bindungsstelle von HA und CD44 zu blockieren und anschließend die Adipozyten zu untersuchen. Externe Variablen, die diesen Prozess beeinflussen können, wurden somit reduziert. Die Ergebnisse hierfür und weitere Moleküle, die an der Adipogenese beteiligt sind, bleiben zu untersuchen.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein murines *in vitro*-Modell zur Differenzierung von Knochenmarkadipozyten etabliert werden. Im Verlauf wurden weitere Experimente zur Untersuchung der funktionellen Rolle der EZM während der Reifung der Präadipozyten durchgeführt. Die Daten zeigten, dass Präadipozyten im Verlauf der Differenzierung HA sekretierten. HA wurde hierbei vor allem in der frühen Differenzierungsphase sezerniert, um so die Ausreifung zu Adipozyten zu induzieren und diese zu beeinflussen. Die Genexpressionsanalysen legten nahe, dass hierbei vorrangig HAS2 von Bedeutung ist. Die Gene der HA-Rezeptoren *Cd44* und *Hmnr* wurden dagegen im Differenzierungsprozess herunterreguliert. Hier könnte eine kompensatorische Regulation diskutiert werden. Es konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede zur HA-Matrix in BMAds eruiert werden. Sowohl die Zellen männlicher als auch weiblicher Tiere wiesen eine HA-Matrix auf, die während der Differenzierung reguliert wurde. Erste Daten zeigten, dass die Inhibition der HA-Synthese durch 4-MU zu einer verminderten Differenzierung in Knochenmarkadipozyten führte. Die HA-Matrix und die Anpassung der EZM spielt somit insgesamt eine entscheidende Rolle in der Adipogenese von BMAds.

Die Expansion von Knochenmarkfettgewebe steht im engen Zusammenhang mit Erkrankungen des metabolischen Spektrums wie Adipositas und T2D [25]. Auch für HA und die dazugehörigen Zielproteine wie CD44 wurde eine funktionell wichtige Regulation im Rahmen metabolischer Erkrankungen beschrieben, jedoch nur in anderen Fettgewebsdepots wie beispielsweise im WAT [69-71, 74, 85]. So führte eine HA-Inhibition sowohl im WAT, BAT als auch in der Skelettmuskulatur zu einer Verbesserung der Insulinresistenz, was HA zu einem potenziellen therapeutischen Angriffspunkt in T2D macht. Die Wechselbeziehung von HA und BMAT unter diabetischen Konditionen wird in der Literatur bis dato noch nicht diskutiert. Ein vertieftes Verständnis dieser Wechselwirkungen könnte auf lange

Sicht bedeutende Implikationen für die Behandlung und Prävention von metabolischen Erkrankungen haben. Insbesondere könnte HA in Verbindung mit BMAT ein vielversprechendes translationales *target* im Bereich des T2D darstellen.

Insgesamt betrachtet, kann die vorliegende Arbeit somit als Basis für weitere Untersuchungen bezüglich der Rolle des BMAT, Veränderungen der HA-Matrix und möglicher therapeutischer Optionen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen verwendet werden.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Kwok, K.H., K.S. Lam, and A. Xu, *Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications*. *Exp Mol Med*, 2016. **48**: p. e215.
2. Zwick, R.K., et al., *Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue*. *Cell Metab*, 2018. **27**(1): p. 68-83.
3. Lee, Y.H., E.P. Mottillo, and J.G. Granneman, *Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1842**(3): p. 358-69.
4. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *What we talk about when we talk about fat*. *Cell*, 2014. **156**(1-2): p. 20-44.
5. 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.
6. Europe, C.W.R.O.f., *WHO European Regional Obesity Report 2022*. 2022.
7. Guh, D.P., et al., *The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis*. *BMC Public Health*, 2009. **9**: p. 88.
8. Galicia-Garcia, U., et al., *Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(17).
9. Reyes-Farias, M., et al., *White adipose tissue dysfunction in obesity and aging*. *Biochem Pharmacol*, 2021. **192**: p. 114723.
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. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(1): p. 277-359.
12. Kajimura, S. and M. Saito, *A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis*. *Annu Rev Physiol*, 2014. **76**: p. 225-49.
13. Marlatt, K.L. and E. Ravussin, *Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings*. *Curr Obes Rep*, 2017. **6**(4): p. 389-396.
14. Cypess, A.M., et al., *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(15): p. 1509-17.
15. 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.
16. 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.
17. Lizcano, F., *The Beige Adipocyte as a Therapy for Metabolic Diseases*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(20).
18. Min, S.Y., et al., *Human 'brite/beige' adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice*. *Nat Med*, 2016. **22**(3): p. 312-8.
19. Altinova, A.E., *Beige Adipocyte as the Flame of White Adipose Tissue: Regulation of Browning and Impact of Obesity*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2021. **107**(5): p. e1778-e1788.

20. Hart, N.H., et al., *Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2020. **20**(3): p. 347-371.
21. Li, Z., et al., *Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues*. Bone, 2018. **110**: p. 134-140.
22. 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.
23. Horowitz, M.C., et al., *Bone marrow adipocytes*. Adipocyte, 2017. **6**(3): p. 193-204.
24. Lecka-Czernik, B., *Marrow fat metabolism is linked to the systemic energy metabolism*. Bone, 2012. **50**(2): p. 534-9.
25. Veldhuis-Vlug, A.G. and C.J. Rosen, *Clinical implications of bone marrow adiposity*. J Intern Med, 2018. **283**(2): p. 121-139.
26. Sebo, Z.L., et al., *Bone Marrow Adiposity: Basic and Clinical Implications*. Endocr Rev, 2019. **40**(5): p. 1187-1206.
27. Scheller, E.L., et al., *Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7808.
28. Craft, C.S., et al., *Molecular differences between subtypes of bone marrow adipocytes*. Curr Mol Biol Rep, 2018. **4**(1): p. 16-23.
29. 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.
30. Scheller, E.L., et al., *Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat*. Trends Endocrinol Metab, 2016. **27**(6): p. 392-403.
31. Rosen, C.J. and M.C. Horowitz, *Nutrient regulation of bone marrow adipose tissue: skeletal implications of weight loss*. Nat Rev Endocrinol, 2023. **19**(11): p. 626-638.
32. Rosen, E.D., et al., *C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 22-6.
33. 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.
34. Ning, K., et al., *Update on the effects of energy metabolism in bone marrow mesenchymal stem cells differentiation*. Mol Metab, 2022. **58**: p. 101450.
35. Muruganandan, S., R. Govindarajan, and C.J. Sinal, *Bone Marrow Adipose Tissue and Skeletal Health*. Curr Osteoporos Rep, 2018. **16**(4): p. 434-442.
36. Ducy, P., *The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism*. Diabetologia, 2011. **54**(6): p. 1291-7.
37. Gunaratnam, K., et al., *Mechanisms of Palmitate-Induced Lipotoxicity in Human Osteoblasts*. Endocrinology, 2014. **155**(1): p. 108-116.
38. Fan, Y., et al., *Parathyroid Hormone Directs Bone Marrow Mesenchymal Cell Fate*. Cell Metab, 2017. **25**(3): p. 661-672.
39. 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.

40. Sulston, R.J. and W.P. Cawthorn, *Bone marrow adipose tissue as an endocrine organ: close to the bone?* *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 2016. **28**(1): p. 21-38.
41. Zhang, S., et al., *Bone marrow adipocytes fuel emergency hematopoiesis after myocardial infarction*. *Nat Cardiovasc Res*, 2023. **2**(12): p. 1277-1290.
42. 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.
43. Paccou, J., et al., *The Role of Bone Marrow Fat in Skeletal Health: Usefulness and Perspectives for Clinicians*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015. **100**(10): p. 3613-21.
44. Bredella, M.A., et al., *Increased bone marrow fat in anorexia nervosa*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. **94**(6): p. 2129-36.
45. Devesa, A., et al., *Bone marrow activation in response to metabolic syndrome and early atherosclerosis*. *Eur Heart J*, 2022. **43**(19): p. 1809-1828.
46. Naba, A., et al., *The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era*. *Matrix Biol*, 2016. **49**: p. 10-24.
47. Lu, P., et al., *Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. **3**(12).
48. Bonnans, C., J. Chou, and Z. Werb, *Remodelling the extracellular matrix in development and disease*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(12): p. 786-801.
49. Vigetti, D., et al., *Metabolic control of hyaluronan synthases*. *Matrix Biol*, 2014. **35**: p. 8-13.
50. Garantziotis, S. and R.C. Savani, *Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context*. *Matrix Biol*, 2019. **78-79**: p. 1-10.
51. 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.
52. Moretto, P., et al., *Regulation of hyaluronan synthesis in vascular diseases and diabetes*. *J Diabetes Res*, 2015. **2015**: p. 167283.
53. Bogdani, M., et al., *Hyaluronan and hyaluronan-binding proteins accumulate in both human type 1 diabetic islets and lymphoid tissues and associate with inflammatory cells in insulinitis*. *Diabetes*, 2014. **63**(8): p. 2727-43.
54. Caon, I., et al., *Revisiting the hallmarks of cancer: The role of hyaluronan*. *Semin Cancer Biol*, 2020. **62**: p. 9-19.
55. Sato, N., et al., *Role of hyaluronan in pancreatic cancer biology and therapy: Once again in the spotlight*. *Cancer Sci*, 2016. **107**(5): p. 569-75.
56. Wang, A., et al., *Hyaluronan matrices in pathobiological processes*. *FEBS J*, 2011. **278**(9): p. 1412-8.
57. Bukhari, S.N.A., et al., *Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects*. *Int J Biol Macromol*, 2018. **120**(Pt B): p. 1682-1695.
58. Cowman, M.K. and S. Matsuoka, *Experimental approaches to hyaluronan structure*. *Carbohydr Res*, 2005. **340**(5): p. 791-809.

59. Marinho, A., C. Nunes, and S. Reis, *Hyaluronic Acid: A Key Ingredient in the Therapy of Inflammation*. *Biomolecules*, 2021. **11**(10).
60. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
61. Vigetti, D., et al., *Hyaluronan: biosynthesis and signaling*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1840**(8): p. 2452-9.
62. Itano, N. and K. Kimata, *Mammalian hyaluronan synthases*. *IUBMB Life*, 2002. **54**(4): p. 195-9.
63. Hascall, V.C., et al., *The dynamic metabolism of hyaluronan regulates the cytosolic concentration of UDP-GlcNAc*. *Matrix Biol*, 2014. **35**: p. 14-7.
64. Schneckmann, R., et al., *Endothelial Hyaluronan Synthase 3 Augments Postischemic Arteriogenesis Through CD44/eNOS Signaling*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021. **41**(10): p. 2551-2562.
65. Al-Khateeb, R. and J. Prpic, *Hyaluronic Acid: The Reason for Its Variety of Physiological and Biochemical Functional Properties*. *Applied Clinical Research, Clinical Trials and Regulatory Affairs*, 2019. **6**(2): p. 112-159.
66. Aruffo, A., et al., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate*. *Cell*, 1990. **61**; **1303-1313**.
67. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(1): p. 221-64.
68. Lesley, J., et al., *Hyaluronan Binding by Cell Surface CD44*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(35): p. 26967-26975.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. Huebener, P., et al., *CD44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response*. *J Immunol*, 2008. **180**(4): p. 2625-33.
73. Cao, G., et al., *Involvement of endothelial CD44 during in vivo angiogenesis*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(1): p. 325-36.
74. Grandoch, M., et al., *4-Methylumbelliferone improves the thermogenic capacity of brown adipose tissue*. *Nat Metab*, 2019. **1**(5): p. 546-559.
75. Nagy, N., et al., *4-methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 123.
76. Kakizaki, I., et al., *A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(32): p. 33281-9.
77. Kultti, A., et al., *4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3*. *Exp Cell Res*, 2009. **315**(11): p. 1914-23.
78. Kuipers, H.F., et al., *The pharmacokinetics and dosing of oral 4-methylumbelliferone for inhibition of hyaluronan synthesis in mice*. *Clin Exp Immunol*, 2016. **185**(3): p. 372-81.

79. Pibuel, M.A., et al., *4-Methylumbelliferone as a potent and selective antitumor drug on a glioblastoma model*. *Glycobiology*, 2021. **31**(1): p. 29-43.
80. Vitale, D.L., et al., *Targeting the Tumor Extracellular Matrix by the Natural Molecule 4-Methylumbelliferone: A Complementary and Alternative Cancer Therapeutic Strategy*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 710061.
81. Zhu, Y., et al., *Hyaluronan in adipogenesis, adipose tissue physiology and systemic metabolism*. *Matrix Biol*, 2019. **78-79**: p. 284-291.
82. Dokoshi, T., et al., *Hyaluronidase inhibits reactive adipogenesis and inflammation of colon and skin*. *JCI Insight*, 2018. **3**(21).
83. Wilson, N., et al., *Role of Hyaluronan in Human Adipogenesis: Evidence from in-Vitro and in-Vivo Studies*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(11).
84. Vigetti, D., et al., *Role of UDP-N-acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of hyaluronan synthase 2 in the control of chondroitin sulfate and hyaluronan synthesis*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(42): p. 35544-35555.
85. Kang, L., et al., *Hyaluronan accumulates with high-fat feeding and contributes to insulin resistance*. *Diabetes*, 2013. **62**(6): p. 1888-96.
86. Wolins, N.E., et al., *OP9 mouse stromal cells rapidly differentiate into adipocytes: characterization of a useful new model of adipogenesis*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(2): p. 450-60.
87. Lee, J.Y., J.Y. Yang, and S.W. Kim, *Bone Lining Cells Could Be Sources of Bone Marrow Adipocytes*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021. **12**: p. 766254.
88. Otto, T.C. and M.D. Lane, *Adipose development: from stem cell to adipocyte*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005. **40**(4): p. 229-42.
89. Herroon, M.K., J.D. Diedrich, and I. Podgorski, *New 3D-Culture Approaches to Study Interactions of Bone Marrow Adipocytes with Metastatic Prostate Cancer Cells*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016. **7**: p. 84.
90. Smith, P.J., et al., *Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263**(19): p. 9402-9408.
91. Tratwal, J., et al., *Reporting Guidelines, Review of Methodological Standards, and Challenges Toward Harmonization in Bone Marrow Adiposity Research. Report of the Methodologies Working Group of the International Bone Marrow Adiposity Society*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020. **11**: p. 65.
92. Lin, Y., et al., *The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(6): p. 4617-26.
93. 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.
94. 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.
95. 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.

96. 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.
97. Bahrami, S.B., et al., *Receptor for hyaluronan mediated motility (RHAMM/HMMR) is a novel target for promoting subcutaneous adipogenesis*. *Integr Biol (Camb)*, 2017. **9**(3): p. 223-237.
98. 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.
99. 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.
100. Park, B.G., et al., *Enzymatic fragments of hyaluronan inhibit adipocyte differentiation in 3T3-L1 pre-adipocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **467**(4): p. 623-8.

7. Anhang

Bildlizenzen

Für zwei Abbildungen in dieser Arbeit sind in diesem Abschnitt zusätzlich die Bildlizenznummern hinterlegt. Diese wurden von John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center für Abb. 1 und von der Oxford University Press and Copyright Clearance Center für Abb.2 bereitgestellt und zur Veröffentlichung für diese Arbeit genehmigt.

Für Abb.1 mit der schematischen Darstellung der Knochenmarkszusammensetzung im Laufe eines Menschenlebens, modifiziert nach Veldhuis-Vlug, A.G. and C.J. Rosen aus dem Paper „*Clinical implications of bone marrow adiposity*“, veröffentlicht im *Journal of Internal Medicine*, 2018 ist die Lizenznummer 5776031348359 hinterlegt [25].

Für Abb.2 mit der schematischen Übersicht der Adipozytentypen, modifiziert nach Sebo, Z.L., *et al.*, „*Bone Marrow adiposity: Basic and Clinical Implications*“, veröffentlicht im *Endocrine Reviews*, 2019 ist die Lizenznummer 5776031378484 hinterlegt [26].

Danksagung

Zuallererst möchte ich meine tiefste Dankbarkeit gegenüber Prof. Dr. Maria Grandoch ausdrücken. Ihre fachliche Expertise, ihr unermüdliches Engagement und ihre inspirierende Leitung haben maßgeblich zum Erfolg und zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Timm Filler für die Übernahme der Rolle als Co-Betreuer und für die wertvolle Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Ich möchte ebenfalls den Mitarbeiterinnen des Instituts meine Anerkennung aussprechen. Ohne die Hilfe von Kerstin Freidel, Peggy Marra-Mann, Beate Weyrauther und Irmhild Tibbe, die freundliche Atmosphäre und die stets offenen Türen und ohne die stundenlangen Gespräche mit Rebekka Schneckmann und Katja Heller wäre meine Forschungstätigkeit eine viel größere Herausforderung gewesen. Ihr habt nicht nur zur wissenschaftlichen Qualität meiner Arbeit beigetragen, sondern auch das tägliche Arbeitsumfeld bereichert.

Zudem möchte ich meinen Dank der Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Forschungsstipendiums aussprechen.

Ein besonderer Dank geht außerdem an meine ehemalige Mitbewohnerin, Theresia und an Fabienne. Eure Unterstützung, Verständnis und die vielen Momente der Aufmunterung während der Arbeit waren eine enorme Hilfe.

Meinen Schwestern, Linda, Merita und Amina, danke ich für ihre Liebe, ihren Glauben an mich und die ständige Motivation.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern meinen tiefsten Dank aussprechen. Ohne ihre Unterstützung und das Vertrauen in meine Fähigkeiten wäre ich nicht dort, wo ich heute bin.