

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Einfluss von hochreaktiven Dicarbonylen auf die Alterung von mesenchymalen Stammzellen und die Differenzierung zu Fettzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt von Susan Garbe-Weber

geboren am 09.07.1994 in Bautzen

Betreuerin: apl. Prof. Dr. Anne Navarrete Santos

Gutachter:

PD Susann Weihrauch-Blüher

Prof. Lars-Oliver Klotz, Friedrich-Schiller-Universität Jena

01.06.2021

21.12.2021

Referat

Weltweit lässt sich eine starke Zunahme der Prävalenz von Adipositas beobachten. Bei der Entstehung von Adipositas ist eine multifaktorielle Genese wahrscheinlich. Die bekannten Ursachen umfassen Überernährung und Bewegungsmangel, dazu gehören aber auch genetische Faktoren und Umweltkontaminanten. Als Barker den Zusammenhang zwischen ungünstigen Einflüssen in der embryonalen Entwicklung und dem Auftreten von Erkrankungen im Erwachsenenalter beobachtete, formulierte er die *Developmental Origin of Health and Disease* (DOHaD)-Hypothese. Grundlage für diese Hypothese war die angenommene metabolische Prägung während des embryonalen und fetalen Wachstums und der daraus resultierenden Entwicklung von Krankheiten im Erwachsenenalter. Bei zahlreichen Erkrankungen konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die metabolische Prägung von Stammzellen durch Methylglyoxal (MGO) und Glyoxal (GO) als eine mögliche Ursache für die Veranlagung von Adipositas untersucht. MGO und GO sind toxische Metabolite des Glukose- und Fettstoffwechsels und werden unter physiologischen Bedingungen im Körper abgebaut und ausgeschieden. Durch Erkrankungen wie Diabetes mellitus erhöht sich ihre Konzentration im Blut und innerhalb der Zelle, was dazu führt, dass die hochreaktiven Dicarbonyle chemische Verbindungen mit Makromolekülen eingehen. Beide Metabolite reagieren mit basischen Biomolekülen wie Lysin und Arginin zu *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs). Dadurch werden Proteine irreversibel modifiziert, was in Stammzellen zur Seneszenz und zur Modifikation der Zellplastizität führen kann.

Entsprechend der aktuellen Literatur konnte in der vorliegenden Arbeit die Seneszenzinduktion bei der Exposition der MSC mit MGO und GO beobachtet werden. Die Exposition der multipotenten mesenchymalen Stammzelllinie C3H10T1/2 mit MGO und GO führte zur Formation von AGEs und zur Induktion von p21. Die AGEs und p21 wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Analyse der adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierungsmarker erfolgte mit der quantitativen *Real-Time-PCR* und mit Western Blot. Die hochreaktiven Metaboliten hatten das Potential die Zellfunktion und Differenzierung in MSC zu verändern. Nach Exposition mit GO und MGO differenzierten multipotente mesenchymale Stammzellen (C3H10T1/2) vermehrt zu Adipozyten. Als der adipozytenspezifische Hauptregulator der Adipogenese und Lipohomöostase wies PPAR γ 2 eine veränderte Proteinmenge nach der Exposition mit MGO und GO auf. Ein Einfluss auf die Lipohomöostase ließ sich anhand der verringerten Induktion des *fatty acid binding protein* (FABP4) nachvollziehen.

Garbe-Weber, Susan: Einfluss von hochreaktiven Dicarbonylen auf die Alterung von mesenchymalen Stammzellen und die Differenzierung zu Fettzellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 76 Seiten, 2021

Inhalt	
Inhalt.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Adipositas.....	1
1.2 Fettzellen und Fettgewebe.....	2
1.2.1 Adipogenese.....	4
1.3 Methylglyoxal (MGO) und Glyoxal (GO).....	7
1.3.1 Biochemische Eigenschaften und Vorkommen.....	7
1.3.2 Advanced Glycation Endproducts (AGEs).....	8
1.4 Altern.....	9
2. Zielstellung.....	11
3. Material und Methoden.....	12
3.1 Chemikalien, Puffer, Medien, Lösungen, Gele, Verbrauchsmaterialien, Oligonukleotide, Geräte, Software.....	12
3.1.1 Chemikalien.....	12
3.1.2 Puffer, Medien, Lösungen und Gele.....	13
3.1.3 Verbrauchsmaterial.....	18
3.1.4 Oligonukleotide.....	18
3.1.5 Geräte.....	18
3.1.6 Software.....	19
3.2 Kultur der C3H10T1/2-Zellen.....	20
3.2.1 Auftauen.....	20
3.2.2 Kultur.....	20
3.2.3 Passagieren.....	20
3.2.4 Kryokonservierung der C3H10T1/2-Zellen.....	20
3.2.5 Stimulation/Exposition von C3H10T1/2.....	21
3.2.6 Exposition von C3H10T1/2-Zellen in der undifferenzierten Wachstumsphase.....	21
3.2.7 Adipogene Differenzierung der C3H10T1/2 unter dem Einfluss von MGO und GO.....	21
3.2.8 Adipogene Differenzierung der C3H10T1/2 unter Einfluss von BMP4.....	22
3.3 Analyse der AGE-Modifikationen am Tag 7.....	23
3.3.1 Vereinzelung der Zellen.....	23

3.3.2	Durchflusszytometrie	23
3.4	Quantifizierung der Differenzierungseffizienz am Tag 13.....	24
3.4.1	Lichtmikroskopischer Vergleich durch die Ölrotfärbung.....	24
3.4.2	Vereinzelung der Zellen und Durchführung der Nilrot-Durchflusszytometrie.....	24
3.5	Herstellung von cDNA	26
3.5.1	RNA-Isolation.....	26
3.5.2	Quantifizierung und Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA	26
3.5.3	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren.....	27
3.5.4	DNase-Verdau	27
3.5.5	Reverse Transkriptase-Reaktion.....	27
3.6	Analyse der cDNA	28
3.6.1	Quantitative Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	28
3.6.2	Primer für die qRT-PCR.....	28
3.6.3	Auswertung der Transkriptmenge.....	29
3.6.4	Herstellung des Plasmidstandards	30
3.6.5	Ligation von DNA-Fragmenten mit dem pGEMT-Vektor.....	30
3.6.6	Transfektion in den kompetenten E. coli-Stamm.....	30
3.6.7	Plasmidisolierung	31
3.6.8	Restriktionsverdau.....	31
3.6.9	DNA-Sequenzierung	31
3.6.10	Anlegen der Glycerinkultur	31
3.6.11	Herstellung einer Verdünnungsreihe des DNA-Plasmidstandards.....	32
3.7	Analyse der Proben auf Proteinebene	32
3.7.1	Proteinisolation	32
3.7.2	Quantifizierung der gewonnenen Proteinmenge.....	32
3.7.3	Western Blot.....	32
3.8	Statistische Auswertung.....	36
4.	Ergebnisse.....	37
4.1	Bestimmung geeigneter Expositionskonzentrationen	37
4.2	Einfluss von MGO und GO auf die Modifikation mit AGE und dem Seneszenzmarker p21.....	37
4.2.1	Analyse des Seneszenzmarkers p21 und des Zellzyklus.....	38
4.2.2	AGE-Modifikationen	40

4.3	Vergleich der Differenzierungseffizienz der spontanen und der induzierten Adipogenese	41
4.4	Einfluss von MGO und GO auf die adipogene Differenzierungseffizienz	43
4.5	Einfluss von MGO und GO auf Gene der Adipogenese	44
4.5.1	Transkription der Markergene der mesenchymalen Zelldeterminierung.....	45
4.5.2	mRNA-Transkription adipogener Markergene der Induktionsphase	47
4.5.3	Protein-Expressionsprofil in der Induktionsphase	47
4.5.4	Expression adipogener Markergene in der terminalen Differenzierung	48
4.5.5	Proteinmenge der adipogenen Markergene in der terminalen Differenzierung.....	50
5.	Diskussion.....	52
5.1	MGO und GO induzieren Seneszenz und regulieren den Zellzyklus in MSC	53
5.1.1	BMP4 und das Glyoxalasesystem modulieren die Wirkung von MGO und GO	57
5.2	MGO und GO verändern die Differenzierungsvorgänge in MSC.....	58
5.2.1	Der obesogene Effekt von MGO und GO wird nicht über Gene des undifferenzierten Wachstums vermittelt.....	59
5.2.2	MGO und GO reduzieren die Expression von PPAR γ 2	62
5.3	Induktion der Seneszenz durch MGO und GO hat Auswirkungen auf die Lipohomöostase.....	65
6.	Zusammenfassung und Ausblick	67
7.	Literaturverzeichnis.....	68
8.	Thesen	76
9.	Anlagen.....	VII
9.1	Sequenzierung der PCR-Produkte	VII
9.1.1	Runx2.....	VII
9.1.2	Col2a1.....	VII
9.1.3	18s	VII
9.1.4	FABP4.....	VIII
9.1.5	Wnt10b.....	VIII
9.1.6	PPAR γ 1	VIII
9.1.7	PPAR γ 2	IX
9.1.8	Pref1/Dlk1.....	IX
	Selbstständigkeitserklärung	X
	Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	X
	Abbildungsverzeichnis.....	XII

Tabellenverzeichnis XIV

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Langwort
AGEs	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ASCs	<i>adipose-derived stem/stromal cells</i>
BMP4/2	<i>Bone Morphogenic Protein 4/2</i>
BMP2:BMP1a	<i>bone morphogenic protein receptor2:bone morphogenic protein receptor 1a</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
BMSCs	<i>Bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i> , aus dem Knochenmark gereifte MSCs
BPA	Bisphenol A
BSA	Bovines Serumalbumin
C/EBP α	CCAT/Enhancer-Binding Proteine α
C/EBP β	CCAT/Enhancer Binding Protein β/δ
CML	Carboxymethyllysine
Col1 α 1	<i>collagen type 1 alpha 1</i>
Col2 α 1	<i>Collagen type 2 alpha 1</i>
CT-Wert	<i>Cycle treshold-Wert</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
DEHP	Bis(2-ethylhexyl)phthalat
DM	Differenzierungsmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOHaD	<i>Developmental Origin of Health and Disease</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz-Lösung
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
EOCCs	Zelllinie, <i>rat osteogenic calvarial cells</i> , embryonale Schädelknochenzellen der Ratte
FABP4	<i>fatty acid binding protein 4</i>
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FKS	Fetales Kälberserum
FOXO1	<i>Forkhead-box-protein O1</i>
GAM	<i>Goat-anti-mouse</i> , Ziege-anti-Maus
GLO1	Glyoxalase 1
GLO2	Glyoxalase 2
GO	Glyoxal
GSH	Gluthathion
hATECs	Zelllinie, <i>human adipose tissue endothelial cells</i> , humane Endothelzellen aus dem Fettgewebe
HbA1c	Langzeitblutzuckerwert, glykiertes Hämoglobin
hPROG	Zelllinie, <i>human progenitor</i> , humane Progenitorzellen
HVECs	Zelllinie, <i>Human vascular endothelial cells</i>

IGFBP3	<i>Insulin growth factor like binding protein 3</i>
IM	Induktionsmedium
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
KM	Kulturmedium
MCP1	<i>monocytes chemotactic protein 1</i>
MG-H1	<i>Methylglyoxal-derived hydroimidazolone 1</i>
MGO	Methylglyoxal
MPCs	Zelllinie, <i>mesenchymal progenitor cells</i> , mesenchymale Vorläuferzellen
MSC	<i>Multipotent stem cell</i> , multipotente mesenchymale Stammzelle
MuSC	<i>Muscle stem cells</i> , Muskelstammzellen
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK92	Zelllinie, <i>natural killer cell lymphoma cell 92</i>
NPC	Zelllinie, <i>Neural progenitor cells</i> , neurale Vorläuferzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PEPCKC	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PPAR γ 1/2	peroxisome proliferator activated receptor gamma 1/2
pRB	Phosphoryliertes Retinoblastomprotein
Pref1, Dlk1	delta-like non-canonical Notch ligand 1
PRXX1	<i>paired related homeobox 1</i>
p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
qRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
RIPA	<i>Radioimmunpräzipitationsassaypuffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SABG	<i>senescence associated β-galactosidase</i> , seneszenzassoziierter β -Galaktosidase
SDS	Sodium dodecyl sulfat
Smad-1,-5,-7	<i>small body size mothers against decapentaplegic</i>
Sox5, 6, 9	<i>sex determining region Y box 5</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBT	Tributylzinn
Tcf 1,3,7	T-Zellfaktor 1,3,7
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TGF β	<i>Tumor growth factor β</i> , Tumorstromungsfaktor β
WHO	<i>World health organization</i>
Wnt10b	Wnt family member 10b
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Adipositas

Seit der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wird in Deutschland eine steigende Prävalenz der Adipositas beobachtet (Helmert und Strube 2004). Bereits am Anfang der 2000er Jahre waren ca. 23 % der Gesamtbevölkerung Deutschlands adipös (Helmert und Strube 2004). 2017 betrug der Anteil an Adipösen gemessen am *Body Mass Index* (BMI) deutschlandweit 52,7%, in Sachsen-Anhalt lag der Anteil von allen Bundesländern am höchsten bei 60,7% (Rainer Radtke 2018, zuletzt geprüft am 26.11.2020). Der BMI steigt nicht nur in Deutschland, sondern ist als Indikator ein Hinweis auf ein globales Gesundheitsproblem (Ng et al. 2014) (Abbildung 1). Seit 1975 hat sich die Anzahl adipöser Menschen weltweit verdreifacht (Weschenfelder und Groten 2019). Eine wirkungsvolle Adipositasprävention ist für das Gesundheitssystem entscheidend (Wirth et al. 2014; Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation 2000).

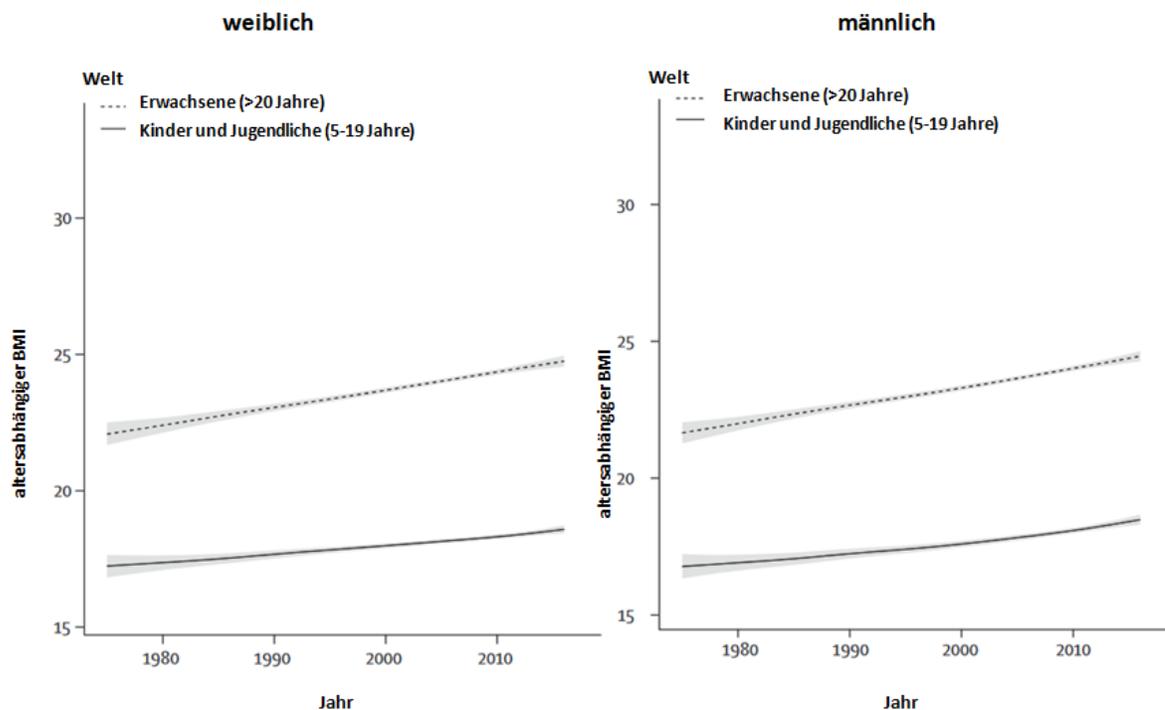


Abbildung 1: Trends des altersstandardisierten mittleren BMI nach Geschlecht zwischen 1975 und 2016 weltweit (Abarca-Gómez et al. 2017). Die Graphen zeigen den weltweiten Anstieg des altersabhängigen *Body Mass Index* (BMI) bei weiblichen (rechts) und männlichen (links) Personen sowohl bei Kindern und Jugendlichen (5- 19 Jahre) als auch bei Erwachsenen (>20 Jahre). Der schattierte Bereich markiert das 95%-Konfidenzintervall.

Adipositas wird gemäß der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation, WHO*) als eine Vermehrung von Fettgewebe über das Normalmaß hinaus definiert. Grundlage für die Einteilung ist der BMI, der sich wie folgt berechnet:

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht in kg}}{(\text{Körpergröße in m})^2}$$

Übergewicht ist definiert als BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$, ab einem BMI von $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ spricht man von Adipositas (Branca 2007). Adipositas ist ein Risikofaktor für kardiovaskuläre, metabolische und neoplastische Erkrankungen und erhöht das Mortalitätsrisiko (Flegal et al. 2013; Harrisons Innere Medizin, S. 447–455). Die WHO definiert das metabolische Syndrom als Krankheit, die durch abdominale Adipositas, Insulinresistenz, Hypertonie und Hyperlipidämie charakterisiert ist (Saklayen 2018). Durch eine persistierende Hyper-glykämie mit Insulinresistenz kann sich ein Diabetes mellitus Typ 2 manifestieren, der durch mikro- und makroangiopathische Veränderungen in kardiovaskulären Erkrankungen wie ein Myokardinfarkt und koronare Herzkrankheit (KHK) sowie Niereninsuffizienz und Minderung der Reproduktion resultieren kann (Blüher 2019; Sarparanta et al. 2017; Spiegelman und Flier 2001).

Die Untersuchung der zunehmenden Prävalenz von Übergewicht und Adipositas hat eine große medizinische und soziale Bedeutung. Neben den bekannten sogenannten „life style“ Faktoren, Überernährung und Bewegungsmangel (Spiegelman; Harrisons Innere Medizin) können pathogenetische Veränderungen des Endokrinen Systems (Tang und Lane 2012) durch eine Fehlregulation des Stoffumsatzes die Zunahme des Körperfettanteils verursachen. Als eine Ursache für endokrine Störungen konnten sogenannte endokrine Disruptoren (*endocrine disrupting compounds, EDCs*) identifiziert werden. Studien thematisieren den Einfluss von EDCs, wie zum Beispiel die in Plastik enthaltenen Bisphenol A und Tributylzinn, auf den Anstieg der Adipositas durch Beeinflussung des Hormonhaushalts (Biemann et al. 2014b). Desweiteren wird die genetische Veranlagung als Ursache der Adipositas diskutiert. So wurde z.B. das Gen *Grid2* als möglicher Kandidat für die erblich bedingte Adipositas entdeckt (Keele et al. 2018).

1.2 Fettzellen und Fettgewebe

Das folgende Kapitel fasst, sofern keine andere Quelle genannt wird, Informationen aus dem Kapitel 8.2 Fettgewebe von Lüllmann-Rauch und Asan 2015 zusammen. Das Fettgewebe besteht aus Fettzellen (Adipozyten), die Lipide bilden und diese als großen Lipidtropfen oder als viele kleine Tröpfchen speichern. Adipozyten werden von einer Basalmembran und retikulären Fasern be-

grenzt. Histologisch werden zwei Fettgewebetypen, braunes und weißes Fettgewebe, unterschieden. Braunes Fettgewebe ist durch plurivakuoläre Fettzellen mit einem hohen Gehalt an Mitochondrien und eine reiche Blutgefäßversorgung charakterisiert. Durch das in der Mitochondrienmembran liegende *uncoupling protein 1* werden die Lipide verarbeitet. Dieser Vorgang dient der Wärmeproduktion bei Neugeborenen und Säuglingen und wird vom Sympathikus gesteuert. Beim Erwachsenen kommt das braune Fettgewebe nur in einigen Körperregionen wie z.B. der Supraklavikularregion und dem oberen Mediastinum vor. Weißes Fettgewebe entwickelt sich erst im Laufe des Kindesalters und ist im Gegensatz zu braunem Fettgewebe univakuolär, wenn es terminal ausdifferenziert ist. Die Fettzellen werden bis zu 100 µm groß. Histologisch zeigen sie sich mit einem großen Lipidtropfen, der sich über den gesamten Zellraum ausweitet. Der Zellkern liegt eng am Zellrand, dadurch entsteht die „Siegelringform“ der Adipozyten. Der Lipidtropfen enthält vor allem Neutralfette und wird durch eine monomolekulare Phospholipidschicht von dem Zytosol abgegrenzt. Durch Intermediärfilamente wie Vimentin wird der Lipidtropfen in Form gehalten. Fettzellen können ubiquitär im interstitiellen Bindegewebe einzeln oder in Gruppen verteilt sein, im eigentlichen Fettgewebe bilden sich „Pakete“ aus vielen Adipozyten, die von retikulären und kollagenen Fasern umgeben sind. Diese „Pakete“ sind von kräftigeren Bindegewebssepten, in denen Nerven und Blutgefäße verlaufen, in Läppchen verbunden. Lipidtropfen können in unterschiedlicher Zahl und Größe auch in anderen Zellen wie z.B. in Hepatozyten, Herz- und Skelettmuskelzellen sowie Knorpelzellen auftreten.

Fettzellen dienen als Speicher für energiereiche Lipide (insbesondere das subkutane und viszerale Fett) und haben mechanische und konstruktive Funktionen (Sobotta 2003; Lüllmann-Rauch und Asan 2015). Das subkutane Fett dient als Isolierschicht gegen Wärmeverlust, da es Wärme schlechter leitet als andere Gewebe. Fettzellen bilden aus Fettsäuren Triacylglycerine und Glycerin (Lipogenese). Zur Energiefreisetzung müssen die Lipide durch Lipasen gespalten werden (Lipolyse) und werden dann ans Blut abgegeben. Die Lipogenese wird von Insulin stimuliert, während die Lipolyse durch Glucagon und Adrenalin gefördert wird. Adipozyten sezernieren Hormone wie Adiponektin, das die Insulinsensitivität von Fettzellen und Muskulatur erhöht, und Leptin, das den Appetit vermindert.

Fettzellen entstehen aus mesenchymalen Stammzellen. Aus diesen entwickeln sich fibroblastenähnliche, mitotisch aktive Präadipozyten, welche dann in mitotisch inaktive reife Adipozyten differenzieren. Die Fettzellendifferenzierung bezeichnet man als Adipogenese. Aus dem Stammzellvorrat können sich lebenslang neue Fettzellen bilden. Die Anzahl der Fettzellen wird prä- und postnatal

sowie in der Kindheit festgelegt, wenn die Stammzellen in ihrer Differenzierung determiniert werden (Otto und Lane 2005). Nach neuen Erkenntnissen wird diskutiert, dass auch im Erwachsenenalter eine Determination von MSC zu Adipozyten erfolgen kann (M. Wabitsch und P. Fischer-Posovszky 2008). Die Zunahme von Körperfett im Erwachsenenalter ist durch eine verstärkte Lipidaufnahme in die Fettzelle charakterisiert (Hypertrophie).

1.2.1 Adipogenese

Die Differenzierung der mesenchymalen Stammzelle (MSC) zur reifen Fettzelle wird von Signalmolekülen und Hormonen zeitabhängig gesteuert (Abbildung 2).

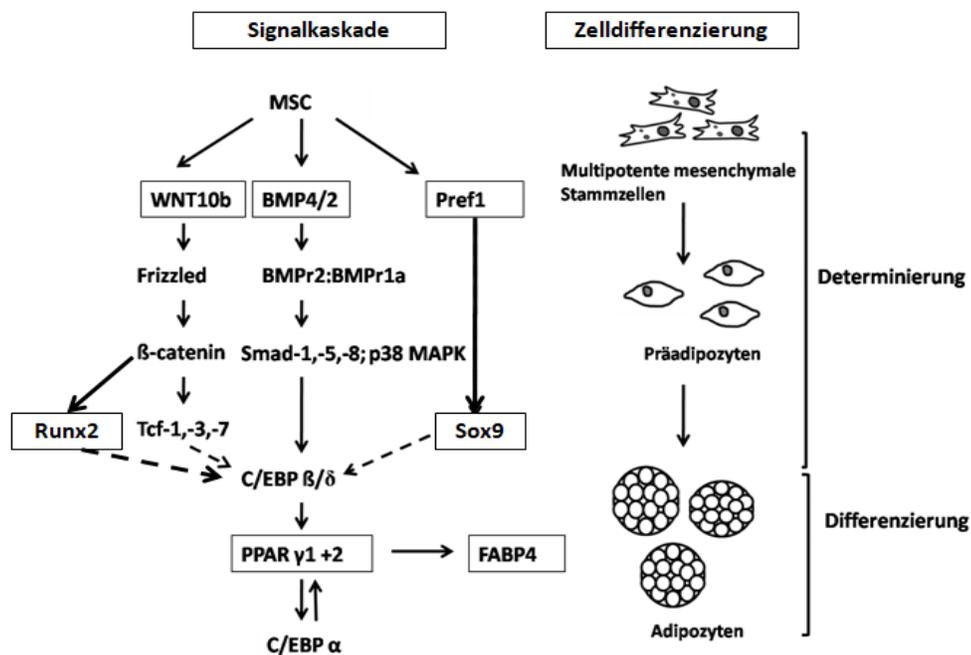


Abbildung 2: Modifizierte schematische Darstellung der Signaltransduktion und Zelldifferenzierung in der Adipogenese (Takenaka et al. 2013; Tang und Lane 2012). Eine multipotente mesenchymale Stammzelllinie (MSC) entwickelt sich in der Determinierungsphase zu einem Präadipozyten. Über WNT10b werden das *Frizzled Protein*, β -Catenin und Tcf-1,-3 und -7 aktiviert und inhibieren C/EBP β/δ . Gleichzeitig hemmt die Wnt-Familie die Aktivierung von PPAR γ 1 und 2 (Almario und Karakas 2015). Durch die Stimulation von BMP4/2 wird BMPPr2:BMPPr1a aktiviert und induziert Smad-1,-5- und 8 und p38 MAPK. Dadurch wird C/EBP β/δ induziert. Pref1 reguliert durch Sox9 die Adipogenese negativ. Sox9 hemmt über p38 die Adipogenese und induziert die chondrogene Differenzierung. Zeitgleich wird Cyclin D1 und die osteogene Differenzierung aktiviert (Stöckl et al. 2013).

In der terminalen Differenzierung werden PPAR γ 1 und 2 durch C/EBP β/δ aktiviert. PPAR γ 1/2 und C/EBP α beeinflussen sich gegenseitig. PPAR γ 1 und 2 regulieren Gene, die für den Fettstoffwechsel essentiell sind, unter anderem auch FABP4 (Rosen und MacDougald 2006; Tang und Lane 2012).

Legende: Die umrandeten Proteine werden in dieser Arbeit beschrieben und untersucht. Die schwarzen Pfeile markieren eine aktivierende Wirkung, während die gestrichelten Pfeile eine inhibierende Wirkung zeigen.

WNT10b- Wnt family member 10b, C/EBP β - CCAT/Enhancer Binding Protein β/δ , PPAR γ 1/2- peroxisome proliferator activated receptor gamma 1/2, BMP4/2- bone morphogenic protein 4/2, BMPPr2:BMPPr1a- bone morphogenic protein receptor2:bone morphogenic protein receptor 1a, p38 MAPK- p38 mitogen-activated protein kinases, Pref1- Dlk1, delta-like non-canonical Notch ligand 1, Sox9- sex determining region Y box 9, C/EBP α - CCAT/Enhancer-Binding Proteine α , FABP4- fatty acid binding protein 4, Runx2- runt-related transcription factor 2.

Wnt10b, als Teil der Wnt-Familie, stimuliert durch Verhinderung der Degradierung des β -Catenin-Komplexes die Osteogenese über einen β -Catenin-abhängigen Mechanismus. Dadurch wird die Expression von osteogenen Proteinen ermöglicht. Durch Wnt10b wird die Expression von PPAR γ inhibiert und die Expression der alkalischen Phosphatase gesteigert (Cawthorn et al. 2012). Der Transkriptionsfaktor nimmt zusammen mit Wnt1, Wnt6 und Wnt10a eine essentielle Rolle in der Skelettentwicklung und in der Regulation der BMSCs (*bone marrow-derived stem cells*, MSC aus dem Knochenmark gereift) ein (Jing et al. 2018). Der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert die Expression des Transkriptionsfaktors Runx2, um die osteogene Differenzierung von BMSCs zu beginnen.

In der frühen osteogenen Differenzierung wird der Transkriptionsfaktor Runx2, der ebenfalls durch Pref1 und Sox9 inhibiert wird, hochreguliert. Runx2 steuert die Expression der Markergene Osteocalcin, Col1 α 1 und Sialoprotein in Osteoblasten (Bruderer et al. 2014).

Pref1 und Sox9 sind die Schlüsselregulatoren der Festlegung des Zellschicksals und inhibieren die terminale adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung (Biemann et al. 2014a). Bei der Differenzierung von MSC inhibiert Pref1 die Entwicklung adipogener Progenitorzellen, indem es mit Sox9 interagiert und die Promotorregion von C/EBP β / δ blockiert. Durch Dexamethason wird die Expression von Pref1 und Sox9 verringert, sodass die adipogene Differenzierung durch Expression von C/EBP β / δ induziert wird (Biemann et al. 2014a). Während Pref1 in den adipogenen Progenitorzellen hoch exprimiert wird, ist es in terminal differenzierten Adipozyten nicht mehr nachweisbar (Biemann et al. 2014a). Sox9 ist ein Transkriptionsfaktor mit einer DNA-Bindungsstelle, der in allen chondrogenen Progenitorzellen exprimiert wird. Zusammen mit Sox5 und Sox6 kontrolliert Sox9 die Expression von Col2a1 (*collagen type 2 alpha 1*) in der chondrogenen Differenzierung (Biemann et al. 2014a).

In der terminalen Differenzierung nehmen die Transkriptionsfaktoren C/EBP β / δ und PPAR γ 1 und 2 die Rolle der Hauptregulatoren ein. Während PPAR γ 1 in verschiedenen Geweben vorkommt, wird PPAR γ 2 spezifisch in Fettgewebe exprimiert und während der Adipogenese stark hochreguliert (Biemann et al. 2014a). PPAR γ 1 wird bereits während der MSC-Proliferation exprimiert, wobei die mRNA- und Proteinexpression von PPAR γ 2 erst mit der hormonalen Induktion der Adipogenese beginnt (Biemann et al. 2014a). Durch die gegenseitige Induktion von PPAR γ 2 und C/EBP α wird eine große Gruppe von Genen aktiviert, die den adipogenen Phänotyp „formen“ (Biemann et al. 2014a). Sie kontrollieren die Expression von der Lipoproteinlipase, von Fettsäuretransport- und –

bindungsproteinen FATP/FABP und von der Acyl-CoA-Synthase, die für die Verstoffwechslung und Aufnahme von Fettsäuren essentiell ist (Georg Thieme Verlag KG 2017). Betrachtet man die Effekte von PPAR γ auf den Körper und die Organsysteme insgesamt, so geht die PPAR γ -abhängige Aktivierung mit einer Senkung des Blutglukoselevels, der Wiederherstellung der Insulinsensitivität, Einschränkung der Dyslipidämie, Prävention der ektopen Ablagerung von Fettsäuren und Verhinderung von Entzündung einher (Briot et al. 2018). In der Studie von Briot et al. 2018 wurde beschrieben, dass eine Verringerung der PPAR γ -Expression durch Sekretion von IGFBP3 (insulinähnliches wachstumsfaktorbindendes Protein 3) und Entzündungszytokinen wie MCP1 (*monocytes chemotactic protein 1*, Monozytenchemotaktisches Protein 1), IL-6 und IL-8 (Interleukin 6 und 8) die angrenzenden Zellen beeinflusst.

C/EBP β / δ wird neben den inhibierenden Transkriptionsfaktoren Pref1, Sox9 und Wnt10b auch durch die stimulierenden BMP4 und 2 reguliert (Cawthorn et al. 2012; Almario und Karakas 2015; Stöckl et al. 2013, Tang et al. 2016; Zhang und Li 2005). BMP4 ist ein Protein, das zur Wachstumsfaktorfamilie TGF β gehört und sowohl in dem murinen als auch im humanen Genom auf dem Chromosom 14 lokalisiert ist (Modica und Wolfrum 2017). Es wird in embryonalem und in adultem Gewebe wie dem Gehirn und der Niere exprimiert und ist ein humoraler Faktor zur Induktion der Adipogenese (Modica und Wolfrum 2017).

Es ist wahrscheinlich, dass Alterungsprozesse oder metabolische Erkrankungen Veränderungen der genannten Signalmoleküle und Hormone abseits des physiologischen Spiegels bewirken und diese Einflüsse mit der Alterung des Organismus zunehmen. So ist bekannt, dass die Akkumulation von oxidativem Stress die Differenzierung von Stammzellen in Muskel- und Knorpelzellen vermindert (Cui et al. 2019). Der Verlust der Muskel-, Knochen- und Knorpelzellen im alternden Menschen führt zu Sarkopenie, Osteoporose und Arthrose (Curtis et al. 2015).

Durch die Verwendung von Stammzellen kann die Differenzierung von Fettzellen detailliert untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die immortalisierte mesenchymale Stammzelllinie C3H10T1/2 genutzt, um die Differenzierung während der Determination und in der terminalen Differenzierung zu betrachten. In der Determination wachsen die MSC in der Zellkulturschale bis zum subkonfluenten Stadium und treten in den G0/G1-Zellzyklusarrest ein (Otto und Lane 2005). Während dieser Zeit werden sie durch C/EBP β / δ stimuliert bis sie synchron in den Zellzyklus zurückkehren und anschließend zu Präadipozyten differenzieren (Otto und Lane 2005). Mit der Determination zu Präadipozyten ändert sich die Expression der Transkriptionsfaktoren. Der Anstieg

von PPARy1 und 2 stimuliert die Sekretion von FABP4 und Lipidvesikel entstehen. Dabei verlieren die Stammzellen ihre fibroblastische Morphologie und entwickeln morphologische und physiologische Eigenschaften von Adipozyten (Otto und Lane 2005).

Neben den C3H10T1/2-Zellen wird die Zelllinie 3T3-L1 zur Analyse der adipogenen Differenzierung genutzt. 3T3-Zellen sind eine Präadipozytenzelllinie, sodass die Determination der Zellen nicht analysiert werden kann (Zebisch et al. 2012). Eine weitere Zelllinie zur Analyse der Differenzierung von MSC in verschiedene Zelltypen und die zelluläre Seneszenz sind die *adipose-derived stem/stromal cells* (ASCs) (Jung et al. 2019). Aufgrund der bisher wenig bekannten Wirkungen von Methylglyoxal und Glyoxal auf MSC wurde bei dieser explorativen Studie das murine Zellmodell C3H10T1/2 eingesetzt, das für die Analyse der adipogenen Differenzierung bereits gut etabliert war. Weitere Vorteile, die das Modell bot, waren die einfache Kultivierbarkeit, die Stabilität in der Kultur und die bessere Verfügbarkeit im Vergleich zu humanen MSC (Reznikoff et al. 1973).

1.3 Methylglyoxal (MGO) und Glyoxal (GO)

1.3.1 Biochemische Eigenschaften und Vorkommen

Methylglyoxal (MGO) und Glyoxal (GO) sind hochreaktive Dicarbonyle, die über freie elektrophile Kohlenstoffbindungen der Carbonylgruppen leicht mit anderen chemischen Verbindungen reagieren können. Unter physiologischen Bedingungen werden MGO und GO innerhalb des Zellstoffwechsels gebildet (Mey und Haus 2018).

Der größte Teil entsteht durch den Abbau von Zuckern (anaerobe Glykolyse) und wird enzymatisch oder nicht-enzymatisch gebildet. Die enzymatische MGO-Bildung findet durch die β -Eliminierung der Phosphatgruppe des Dihydroxyacetonphosphats und der anschließenden Dehydratation des Dihydroxyacetons statt (Abbildung 3).

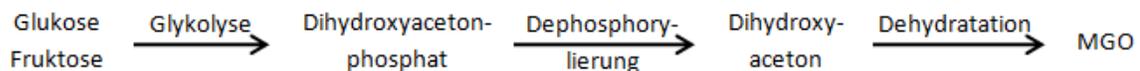


Abbildung 3: Schema zur Bildung von MGO. Bei dem glykolytischen Abbau von Einfachzuckern zu Dihydroxyacetonphosphat entsteht durch Dephosphorylierung und Dehydratation Methylglyoxal (MGO).

Andere MGO-Quellen sind der Abbau glykierter Proteine, der Aminosäure Threonin und von Ketokörpern bei diabetischer Ketoazidose sowie die Peroxidation von Fettsäuren (Rabbani et al. 2016). GO entsteht ebenfalls als Neben- und Zwischenprodukt verschiedener Stoffwechselwege wie der Retroaldolkondensation und indirekt aus Hexosen (Glukose, Mannose, Galaktose) und Pentosen (Fruktose) mit Glycoaldehyd als Zwischenstufe. Weitere Quellen von GO sind die spon-

tane Hydrolyse von Ascorbinsäure und die Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Thornalley et al. 1999).

MGO und GO sind unter physiologischen Stoffwechselbedingungen im menschlichen Körper in Konzentrationen von ungefähr 100- 120 nM im Blutplasma messbar. Die zellulären Konzentrationen betragen zwischen 1 – 5 μ M für MGO und 0,1- 1 μ M für GO (Thornalley 2008). Beim insulinabhängigen Diabetes mellitus zeigten sich bis zu 6fach erhöhte MGO- und GO-Konzentrationen (McLellan et al. 1994). Hohe Mengen an MGO und GO im Blut sind zytotoxisch und reagieren chemisch mit den Aminosäuren Lysin und Arginin, mit Nukleinsäuren und mit Fetten. Dies führt zur strukturellen und funktionellen Veränderung von Makromolekülen wie Proteinen, Enzymen und Signalstoffen (McLellan et al. 1994).

Die Detoxifizierung des hochreaktiven MGO und GO erfolgt in der Zelle durch eine Gruppe von Enzymen, das sogenannte Glyoxalasesystem. Es baut mehr als 99 % des in der Zelle gebildeten MGO ab (Rabbani et al. 2016). Das Entgiftungssystem besteht aus den Enzymen der Glyoxalase (GLO) 1 und 2. Die Aminosäuresequenzen beider Enzyme sind hochkonserviert (Rabbani et al. 2016). Durch GLO1 wird MGO mit Hilfe von Gluthathion zu S-D-Lactogluathion und anschließend von der GLO2 mit Wasser zu D-Laktat abgebaut (Xue et al. 2011).

1.3.2 Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

Die AGEs sind das Ergebnis der Maillard-Reaktion. Durch die Maillard-Reaktion entstehen unter physiologischen Bedingungen in der Zelle nicht-enzymatische Verbindungen von Glucose mit Aminosäuren, aus denen in weiteren Reaktionsschritten *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) gebildet werden (Arand 2009) (Abbildung 4).

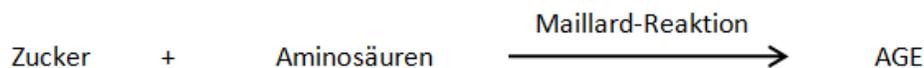


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Maillard-Reaktion. Zucker und Aminosäuren reagieren zusammen in der Maillard-Reaktion zu AGEs.

In der Lebensmittelchemie beschreibt die Maillard-Reaktion die Bräunungsreaktion, der viele Lebensmittel in der Zubereitung unterzogen werden. Wenn Lebensmittel bei hohen Temperaturen wie beim Backen, Grillen oder Rösten verarbeitet werden, entstehen AGEs (Arand 2009). Sie finden sich in Brot, verarbeitetem Fleisch und Frühstückscerealien (Semba et al. 2010). Über Nahrungsmittel werden 1-100 mg/Tag *Methylglyoxal-derived Hydroimidazolone* (MG-H1) und 1-5 mg/Tag *Carboxymethyllysine* (CML) aufgenommen (Zeier et al. 2003). Nur ein Teil der hochreaktiven Dicarbonyle wird intestinal aufgenommen, da MGO unter den physiologischen Darmbedin-

gungen zu instabil ist und das Glyoxalase-System in den Epithelzellen des Darmtrakts reich vertreten ist (Degen et al. 2013). Die AGEs entstehen bei Körpertemperatur sehr langsam (Arand 2009). MGO und GO verbinden sich in Form einer Schiffischen Base mit dem Protein. Das primäre Addukt lagert sich anschließend intramolekular unter H₂O-Abspaltung in der Amadori-Reaktion zu MG-H1 und CML um (Arand 2009; Henning und Glomb 2016). Neben der Maillard-Reaktion entstehen AGEs bei der Monosaccharid-Autooxidation, Fragmentierung von Schiffischen Basen und Fruktosaminabbau (Thornalley et al. 1999).

Zur Beobachtung des Therapieerfolgs und der Abschätzung von eventuellen Folgeerkrankungen wird bei einem Diabetes mellitus das AGE HbA_{1c} verwendet. Der HbA_{1c} wird als Langzeitzuckerwert bezeichnet und ist die glykierte Form der Hämoglobinmoleküle, die bei einem Diabetiker das zwei- bis dreifache im Vergleich mit Gesunden betragen (Henning und Glomb 2016).

1.4 Altern

Altern zeichnet sich durch regressive Veränderungen der Organstrukturen und –funktionen aus (Hansen 2007, c 2007). Mit der zunehmenden Alterung der Gesellschaft und der Frage nach dem „gesunden Altern“ ist die Rolle der AGEs im Alterungs- und Krankheitsprozess in den Fokus gerückt. Erhöhte AGE-Spiegel konnten in der Pathogenese vieler altersassoziierte Erkrankungen nachgewiesen werden (Abbildung 5), zudem gibt es Hinweise auf eine reduzierte Aktivität des Glyoxalase-Systems im Alter (Maessen et al. 2015; Xue et al. 2011).

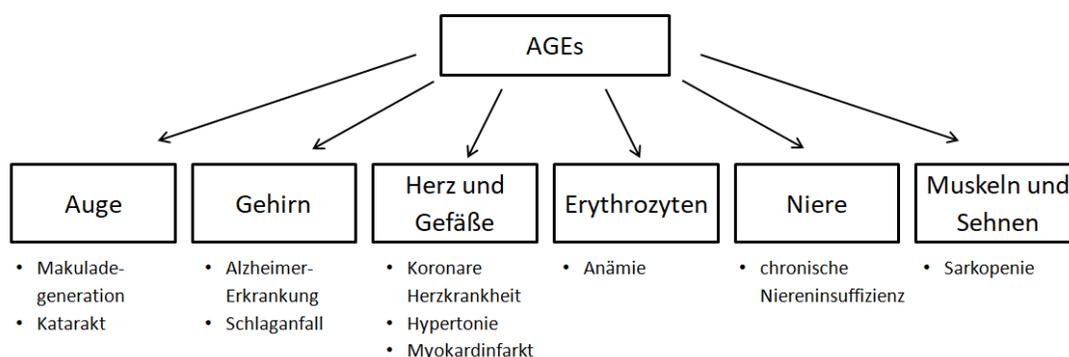


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Rolle der AGEs in der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder (Semba et al. 2010). Chronische AGE-Exposition führt zu chronischen Entzündungen, die zur Pathogenese der Makuladegeneration, des Katarakts und der Alzheimererkrankung beiträgt. Durch die Vernetzung von Kollagenfasern reduziert sich die Elastizität von Gefäßwänden und das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie die KHK und Myokard steigt (Semba et al. 2010).

Auf zellulärer Ebene wird Altern als Seneszenz bezeichnet. Seneszenz ist als komplexer und heterogener Prozess zu verstehen, der als stabiler Zellzyklusarrest das Wachstumspotential der Zellen hemmt. Auf molekularer Ebene wird Seneszenz durch Telomerdysfunktion, DNA-Schäden und

oxidativen Stress durch die Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren wie p53 und p21 induziert (Abbildung 6) (Fischer et al. 2016; Aravinthan 2015).

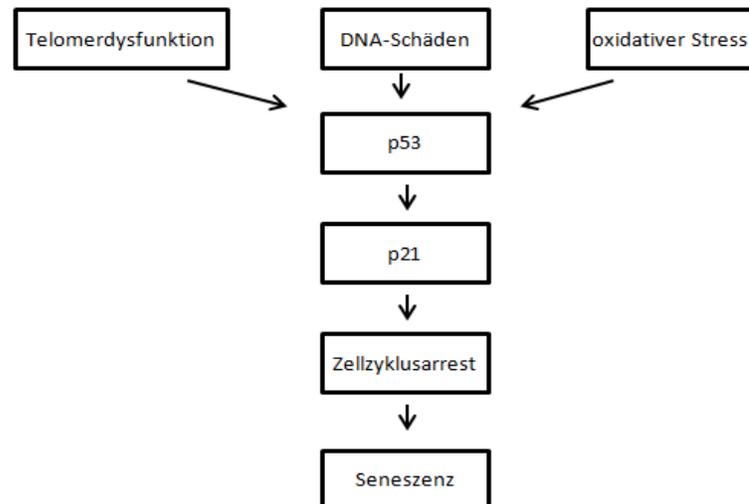


Abbildung 6: Induktion der zellulären Seneszenz durch Telomerdysfunktion, oxidativen Stress und DNA-Schäden über den p53-p21-Signalweg (Aravinthan 2015). Telomerdysfunktion, DNA-Schäden und oxidativer Stress induzieren p53 und p21, welche wiederum zu einem Zellzyklusarrest und Seneszenz führen.

Es gibt verschiedene Theorien, um Altern zu erklären. Die Genregulationstheorie bezieht sich auf die genetisch festgelegte Aktivierung bzw. Repression von Alterungsvorgängen (Hansen 2007, c 2007). Systemische Theorien beziehen sich auf die im hohen Lebensalter abnehmende Zellfunktion und die zelluläre Theorie konzentriert sich auf die freien, sehr reaktionsfähigen Radikale, die im Laufe des Lebens durch Stoffwechselforgänge akkumulieren (Hansen 2007, c 2007). Die mitochondriale Theorie des Alterns beschäftigt sich mit der Dysfunktion der Atmungskette, die zu einer erhöhten Produktion von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) und damit zu oxidativem Stress sowie der Akkumulation von DNA-Mutationen führt (Hansen 2007, c 2007).

Die Alterungsprozesse können auch durch posttranslationale Modifikationen des PPAR γ vermittelt werden (Briot et al. 2018). Durch die Abnahme des Transkriptionsfaktors kommt es zu einer Zunahme von FoxO1 (*forkhead box protein O1*), das mit einer Zunahme von Diabetes mellitus assoziiert wird (Briot et al. 2018). Des Weiteren schützen die FoxO-Proteine Zellen vor oxidativem Stress, indem sie durch verstärkte Expression Enzyme wie Superoxiddismutase, Katalase und Gluthationperoxidase kodieren (Lee und Dong 2017).

2. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung der hochreaktiven Dicarbonyle Methylglyoxal (MGO) und Glyoxal (GO) auf mesenchymale Stammzellen und die adipogene Differenzierung zu untersuchen. Dafür wurde die immortalisierte murine mesenchymale Stammzelllinie C3H10T1/2 als in-vitro-Zellmodell verwendet. Um die metabolische Stresssituation in Zusammenhang mit der zellulären Vulnerabilität von mesenchymalen Stammzellen bewerten zu können, wurden MGO und GO sowohl als einzelne Komponenten als auch in Kombination in unterschiedlichen Wachstumsphasen in verschiedenen Dosen eingesetzt. Die wirksamen Konzentrationen wurden durch Vorversuche ermittelt.

Die Bildung von AGEs und deren möglichen Einfluss auf die Seneszenz der mesenchymalen Stammzellen wurden mittels der Durchflusszytometrie, analysiert. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Beeinflussung der adipogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen wurden mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden untersucht. Die Durchflusszytometrie und Oil Red O-Färbung wurde verwendet, um mögliche Effekte auf die adipogene Differenzierung zu bestimmen. Mittels qRT-PCR und Western Blot wurde der Einfluss von MGO und GO auf wichtige Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren der mesenchymalen Determinierung und adipogenen Differenzierung gemessen. Folgende Fragen sollten dabei geklärt werden:

1. Führt eine Exposition mit MGO und GO zu einer vermehrten AGE-Bildung und veränderten Seneszenz in mesenchymalen Stammzellen?
2. Gibt es eine additive oder eine aufhebende Wirkung bei einer zeitgleichen Exposition mit MGO und GO in mesenchymalen Stammzellen?
3. Haben MGO und GO Einfluss auf die Adipogenese?
4. Ist eine Wirkung von MGO und GO auf die Adipogenese vom Zeitpunkt der Exposition abhängig?

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Puffer, Medien, Lösungen, Gele, Verbrauchsmaterialien, Oligonukleotide, Geräte, Software

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid Bis Solution	Serva GmbH, Heidelberg
Agar-Agar	Carl-Roth GmbH, Oldendorf
Agarose	Biozym Scientific GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Aminocarbonsäure	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblausalz	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
<i>Cell distribution solution</i> (CDS)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Coumarinsäure	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Diethyldicarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Dexamethason	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
D-MEM-Medium (Gibco 41965)	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
dNTP-Mix	TaKaRa Holdings Inc., Kyoto, Japan
Elektrochemilumineszenz-Lösung (ECL)	Merck, KGaA, Darmstadt
Essigsäure	Merck, KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck, KGaA, Darmstadt
Ethylendiaminessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (FKS) Gibco LOT	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Flüssiger Stickstoff	Linde Gas, München
Glycin	Carl-Roth GmbH, Oldendorf
Glycerin	Serva GmbH, Heidelberg
Glyoxal	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Hefeextrakt	Applichem GmbH, Darmstadt
Insulin Bovine Pancreas	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Isopropanol	Carl-Roth GmbH, Oldendorf
Luminolsalz	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Methanol	Honeywell AG, Leipzig

Methylglyoxal	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Milchpulver	TSI GmbH & Co KG, Zeven
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH, Oldendorf
Natriumdesoxycholat	Carl-Roth GmbH, Oldendorf
Natriumhydroxid	Merck, KGaA, Darmstadt
Nilrot	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Ölrot (RedOil®)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
PageRuler™ Protein Marker 26616	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Penicillin/ Streptomycin	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Pepton	Carl-Roth GmbH, Oldendorf
Polyethylenglucol	Serva GmbH, Heidelberg
Phosphatase-Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom GmbH, Berlin
Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Randomprimer	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Whylen
Reverse-Transkriptase-Reaktion	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva GmbH, Heidelberg
Transfektionsreagenz	Promega GmbH, Mannheim
Trichloroacetatessigsäure	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Tris-Base	Serva GmbH, Heidelberg
Trishydrochlorid	Carl-Roth GmbH, Oldendorf
Trishydroxymethylaminomethan	Serva GmbH, Heidelberg
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin-Trockenpulver	Serva GmbH, Heidelberg
Tween 20	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
T4-DNA-Ligase	Promega GmbH, Mannheim
Wasserstoffperoxid	Merck, KGaA, Darmstadt

3.1.2 Puffer, Medien, Lösungen und Gele

Agarplatten	15g Agar (<i>autoklaviert</i>)
	2 ml Ampicillin
	400 µl X-Gal (20 mg/ml in H ₂ O dest.)
	40 µl IPTG (200 mg/ml in Dimethylformamid)
	1 l LB-Medium
BMP4-Lösung (100 µg/ml)	100 µg BMP4

Bromphenolladepuffer	1 ml 5mM Zitronensäure (pH=3) 0,1 µg Bromphenolsalz 30 ml Glycerin 70 ml TAE
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H ₂ O	1 ml DEPC Ad 1l H ₂ O dest
Differenzierungsmedium (DM)	100 ml KM 10 µg/ml Insulin
DNA-Gel 1,8%	10 ml 10xTAE Puffer 90 ml H ₂ O dest. 1,8 g Agarose 1,5 µl Ethidiumbromid
DNA-Marker	4 µl Bromphenol-Ladepuffer 15 µl PCR-H ₂ O 1 µl DNA-Leiter
DNase Reaktion	2,5 µl DNA-Puffer 2 µl DNase 0,5 µl RNase-Inhibitor 2 µl Stoppreagenz
EDTA	8,766g EDTA 100 ml PBS <i>Einstellung mit NaOH auf pH-Wert 8,0, Autoklavierung Verdünnung 1:2000</i>
Elektrochemilumineszenz (ECL)- Reagenz für eine Membran	1 ml Luminol 100 µl p-Coumarinsäure 3 µl H ₂ O ₂ (3 %)
Induktionsmedium (IM)	100 ml KM 10 µg/ml Insulin 1 µM Dexamethason 250 mM Isobutylmethylxanthin (IBMX)
Kulturmedium (KM)	89 ml DMEM Gibco 10 ml hitzeinaktiviertes FKS (<i>Inaktivierung erfolgte bei 56°C für 30 min</i>) 1 ml Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
Kryomedium	4,1 ml DMEM GIBCO 0,5 ml Fetales Kalbserum (FKS)

Laemmli-Ladungspuffer (5x)	0,4 ml DMSO 312,5 mM Tris-HCl pH 6,8 10% SDS 50% Glycerol 10% Mercaptoethanol
Laemmli (10x)	5% Bromphenolblau 30,25 g Tris (250 mM) 144,25 g Glycin (2,5 M) 10 g SDS (1%) <i>1:10 Verdünnung mit H₂O dest.</i>
Ligationsansatz	10 µl 2x Rapid-Ligationspuffer 1 µl T4-DNA-Ligase 1 µl pGEMT-Vektor 8 µl PCR-Produkt
<i>Lysogeny broth</i> (LB)-Medium	10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl Ad 1 l H ₂ O dest. <i>pH- WertEinstellung auf pH7,5 mit 4M NaOH</i>
0,005%ige Ölrot-Lösung	0,5 mg RedOil® 100 ml Isopropanol
PBS	9,55 g PBS-Trockenpulver 1l H ₂ O dest. <i>Autoklavierung</i>
PCR-Reaktion	17,87 µl PCR-Wasser 5 µl 5xPuffer 0,5 µl dNTPs 10 mmol 0,5 µl GAPDH -Primer vorwärts 0,5 µl GAPDH- Primer rückwärts (493) 0,125 µl CrimsonTaq
Ponceau-S-Lösung	2 g Ponceau S 30 g Trichloracetatessigsäure 30 g Sulfosalicylsäure Ad 100 ml H ₂ O dest. <i>Filtern und Arbeitsverdünnung 1:10 herstellen</i>
qRT-PCR-Ansatz	4 µl EvaGreen 0,5 µl Primer vorwärts

	0,5 µl Primer rückwärts
	12 µl PCR-H ₂ O
	757 µl RIPA
<i>radioimmunoprecipitation assay</i> (RIPA)- Ansatz	143 µl Protease 100 µl Phosphatase
<i>radioimmunoprecipitation assay</i> (RIPA)- Puffer	10 ml PBS-Puffer (10x) 100 µl 10 % SDS 500 mg Natrium-Desoxycholat 1 ml Nonident P-40 Ad 100ml H ₂ O dest.
Rapid Ligationspuffer 2x	60 mM Tris-HCl (pH 7,8) 20 mM MgCl ₂ 20 mM DTT 20 mM ATP 10 % Polyethylenglycol
Resuspensionslösung 1	75 ml PBS 10 ml FKS 15 ml H ₂ O dest.
Restriktionsverdauansatz	4,5 µl PCR-H ₂ O 1,5 µl Puffer 0,5 µl Apa I 0,5 µl Sac
Resuspensionslösung 2	75 ml PBS 25 ml H ₂ O dest.
Reverse-Transkriptase-Reaktion	4 µl 5x Puffer 0,5 µl RNase-Inhibitor 2 µl 10 mM dNTPs 1 µl Reverse Transkriptase
RNA-Agarosegel 1,2%	1,2 g Agarose 10 ml 10xTAE Puffer 90 ml DEPC Wasser 0,001 % Ethidiumbromid
Sammelgel 4%	1,4 ml H ₂ O dest. 0,33 ml Acrylamid 0,25 ml 1,0 M Tris (pH 6,8) 0,02 ml 10 % SDS 0,02 ml 10 % APS

<i>Stripping</i> Puffer	10 ml 10x SDS 6,25 ml Tris-HCl pH 6,8 350 µl Mercaptoethanol Ad 50 ml H ₂ O dest.
Transferpuffer 1	36,3 g Tris 250 mM 200 ml Methanol Ad 1 l H ₂ O dest.
Transferpuffer 2	3 g Tris 250 mM 200 ml Methanol Ad 1 l H ₂ O
Transferpuffer 3	3 g Tris 250 mM 200 ml Methanol 5,2 g Aminocarbonsäure Ad 1 l H ₂ O dest.
Trenngel 10 %	2,0 ml H ₂ O dest. 1,7 ml Acrylamid 1,3 ml 1,0 M Tris (pH 8,8) 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS
Trenngel 15 %	1,2 ml H ₂ O dest. 2,5 ml Acrylamid 1,3 ml 1,0 M Tris (pH 8,8) 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS
Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer 10x, pH 8,0	242 g Tris-Base 57,1 ml Eisessig 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) Ad 5 l H ₂ O dest.
<i>TRIS-buffered saline</i> (TBS)	5,8 g Natriumchlorid 10 ml Tris pH 7,5 Ad 1 l H ₂ O dest.
<i>TRIS-buffered saline</i> + Tween [®] 20 (TBST)	5,8 g Natriumchlorid 10 ml Tris pH 7,5 1 ml Tween 20 Ad 1 l H ₂ O dest.
Trypsin	1g Trypsintrockenpulver 50 ml H ₂ O dest.

Zitronensäure (5mM)

Sterilfiltration

105,7 mg Zitronensäure

50 ml H₂O dest.

*Mit 1 M NaOH und pH-Meter auf pH=3 einstellen
steril filtrieren*

3.1.3 Verbrauchsmaterial

Kryokonservierungsröhrchen

Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht

Einmalküvetten

Brand GmbH & Co KG, Wertheim

Falcon-Röhrchen

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Gelschlitten für RNA/PCR

Biozym Scientific GmbH, Oldendorf

Glasreagenzgläser

Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen

Parafilm

Bemis Company, Inc., Brigg, United Kingdom

Pipettenspitzen

Dr. Ilona Schubert-Fachhandel Leipzig

Pipettus®-Pipetten

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Precellys® Reaktionsgefäße

Precellys®24, Keyence GmbH, Neu-Ilseburg

Probenkamm

Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Reaktionsgefäße (safe-Lock-tubes)

Eppendorf AG, Hamburg

6-Well-Platten

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

94-mm-Zellkulturschalen

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.1.4 Oligonukleotide

Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (Tabelle 3)

3.1.5 Geräte

Durchflusszytometer

BD LSR Fortessa, BD Biosciences, Heidelberg

Elektrophoresis Power Supply Consort
EV202

Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen

Gasbrenner

Newell Brands, Hoboken, USA

Gel-Dokumentationsgerät Che-
miDoc™Touch Imaging System

BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA

Gelelektrophoresekammern Novex

Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA

Kühlschränke (4°C)

Liebherr, Bulle, Schweiz

Kühlzentrifuge, Biofuge fresco 17

Haereus GmbH, Hanau

Lab Assistant (Tube-Roller)

Carl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön

Lumineszenzdetektor

BioRad Laboratories, Inc., Hercules, USA

MacsMix (Tube-Roller)	Miltenyi Biotech GmbH, Gladbach
Mikroskop Olympus IX-70	Olympus Optical Co. LTD, Shinyuku, Japan
Mikrozentrifuge Fresco 17	Heraeus GmbH, Hanau
pH-Meter	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Pipettus Pipetboy	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Pipette 1000 Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 100 Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 20	Abimed, Langenfeld
Pipette 10 Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 2 Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg
Precellys ²⁴ Lysis & homogenisation	PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen
Rotations-Vakuumkonzentrator RVC2-18	Christ, Osterode
Semi-Dry-Blotter für Elektrotransfer	Biostep GmbH, Burkhardtshof
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus, Hanau
Spektrometer NanoVue	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Sterilisator	sysTec GmbH, Bergheim-Glessen
Tiefkühlschrank (-20°C, -80°C)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Thermocycler	StepOnePlus®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
UV/Vis-Spektrometer UltroSpec 3300 pro	Amersham Biosciences, Biochrom LTD, Cambridge, Great Britain
Vakuumpumpe	Vacuumbrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vortex-Genie 2 (G560 E)	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage BL3100	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Biometra GmbH, Göttingen
Wasserbad	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Vertikale Gelelektrophoresekammer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Luna-II™ Automated Cell Counter	Haereus GmbH, Hanau
Zellinkubatoren/Brutschränke	Haereus GmbH, Hanau
Zentrifuge	Haereus GmbH, Hanau

3.1.6 Software

DIVA-Software	Biosciences, Heidelberg
Geldokumentationssoftware PCR	VWR International GmbH, Darmstadt
Image Lab®	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

3.2 Kultur der C3H10T1/2-Zellen

In dieser Studie wurde der adipogene Einfluss von MGO und GO auf die mesenchymale Stammzellendifferenzierung untersucht. Dafür wurde die multipotente immortalisierte mesenchymale murine Stammzelllinie C3H10T1/2 (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) genutzt.

3.2.1 Auftauen

Das Auftauen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Nachdem die Probe aufgetaut war, wurde sie sofort in ein neues Falconröhrchen mit 1 ml frischem Kulturmedium überführt. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm für 5 min. Der DMSO-haltige Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1 ml neuem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in neue 94mm-Gewebekulturschalen mit 9 ml MSC-Kulturmedium überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte im Brutschrank, wie im Kapitel 3.2.2 beschrieben.

3.2.2 Kultur

Die C3H10T1/2-Zellen wurden im Kulturmedium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Dafür wurden sie in 94-mm-Zellkulturschalen ausgesät und subkonfluent alle 48 h passagiert.

3.2.3 Passagieren

Für das Passagieren wurde das verbrauchte MSC-Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml warmen PBS gewaschen. Der PBS wurde wieder abgenommen und eine 0,1%-ige Trypsin- und 0,05%-EDTA-Lösung im Verhältnis 1:1 zugegeben. Die Lösung wurde sofort wiederaufgenommen. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen durch leichtes Klopfen gelöst und in 5 ml frischem MSC-Kulturmedium vereinzelt. Die Zellen wurden mit dem Zellzahlgerät gezählt und je 2×10^5 Zellen in neue Zellkulturschalen (94 mm) mit frischem Medium ausgesät. Es wurden nur Zellen bis maximal zur 21. Passage verwendet, um zu gewährleisten, dass die Zellen vergleichbar differenzierungsfähig waren.

3.2.4 Kryokonservierung der C3H10T1/2-Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Zellpopulation entnommen. Dafür wurden die Zellen mithilfe von Trypsin-EDTA-Gemisch vereinzelt. Anschließend wurden 5 ml Kryomedium auf die Zellkulturschale gegeben und je 1 ml in ein Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert. Diese wurden in einer Cryobox (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit Isopropanol für 24 h bei - 80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff bei - 196°C gelagert.

3.2.5 Stimulation/Exposition von C3H10T1/2

Für das Erreichen der gewünschten Konzentration von MGO und GO wurde eine schrittweise Verdünnungsreihe der Stammlösung MGO von 6,5 M zu 0,065 M und 0,0065 M mit PBS hergestellt. Die Stammlösung GO wurde schrittweise von 8,8 M zu 0,088 M und 0,0088 M mit PBS verdünnt.

3.2.6 Exposition von C3H10T1/2-Zellen in der undifferenzierten Wachstumsphase

Um die Sensitivität der C3H10T1/2-Zellen gegenüber MGO und GO zu testen, wurde ein Expositionsversuch mit den Konzentrationen 50, 100 und 250 μM MGO und GO einzeln oder in Kombination durchgeführt. Dafür wurden 4×10^4 Zellen ausgesät (Tag 0) und im Standardmedium (ohne Stimulans) kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen 72 h mit Standardmedium mit MGO und GO kultiviert. In den 72 h wurde das Medium nicht erneuert, jedoch nach 24 h MGO und GO in der jeweiligen Konzentration zugegeben (Abbildung 7).

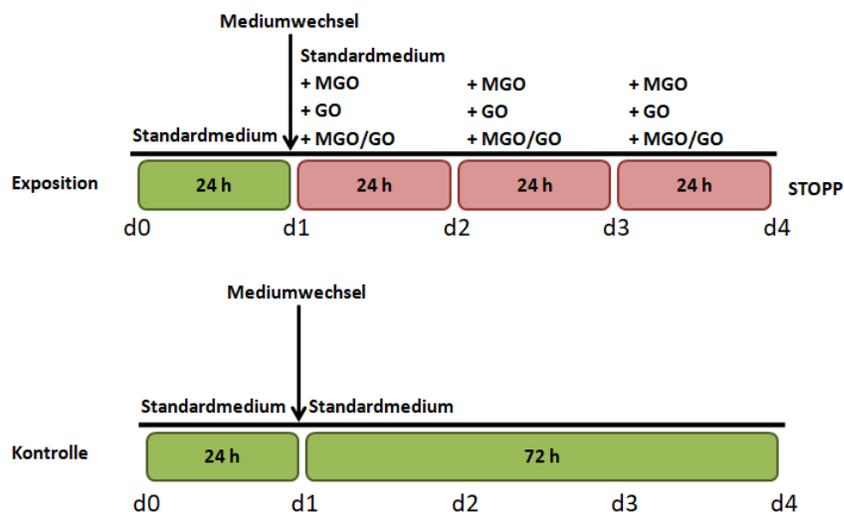


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Exposition der C3H10T1/2 mit MGO und GO. Die Abbildung zeigt den Ablauf der Exposition der Zellen mit MGO und GO im Vergleich zu der Kontrolle, die nicht exponiert wurde. Am Tag 0 wurden die Zellen ausgesät und mit Standardmedium kultiviert, nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen der Expositionsgruppe wurden mit MGO und GO exponiert, nach 24 h wurde erneut MGO und GO hinzugegeben. Anschließend wurde nach 24 h erneut MGO und GO hinzugegeben. Bei der Kontrollgruppe wurde das Standardmedium für 72 h belassen. Die Expositionsdauer ist im Zeitstrahl in Tagen (d) angegeben.

Am Tag 4 erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen.

3.2.7 Adipogene Differenzierung der C3H10T1/2 unter dem Einfluss von MGO und GO

Das adipogene Differenzierungsprotokoll der C3H10T1/2 war bereits in der Arbeitsgruppe von Prof. apl. Dr. Anne Navarrete Santos (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-

Universität Halle-Wittenberg) etabliert. Es wurde modifiziert, um es für eine 72-stündige Behandlungszeit mit MGO und GO vor der Induktionsphase anzupassen (Abbildung 8).

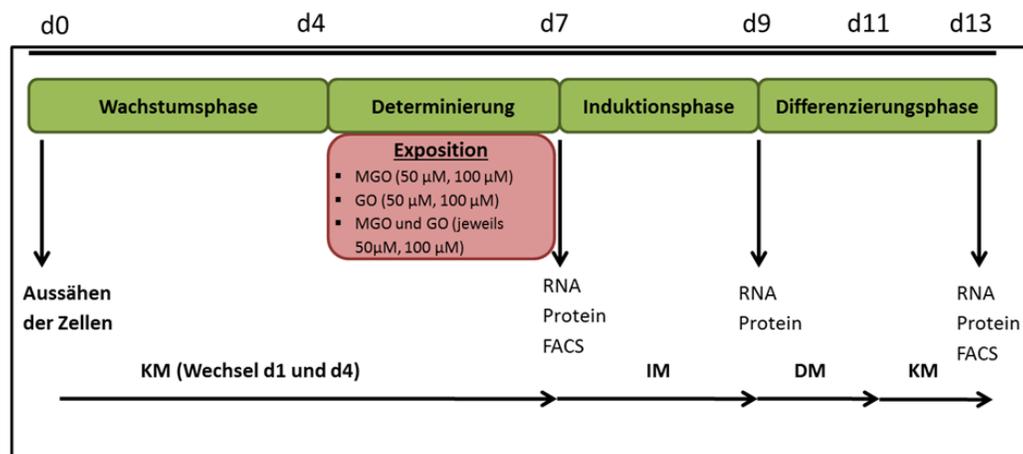


Abbildung 8: Schema des adipogenen Differenzierungsprotokolls der C3H10T1/2. Die verwendeten Medien während der verschiedenen Differenzierungsphasen wurden als Kulturmedium (KM), Induktionsmedium (IM) und Differenzierungsmedium (DM) gekennzeichnet. Die Kulturdauer ist im Zeitstrahl in Tagen (d) angegeben.

Für die adipogene Differenzierung wurden am Tag 0 4×10^5 Zellen mit MSC-Kulturmedium (KM) ausgesät. Nach 48 h wurde das MSC-Kulturmedium erneuert. Am Tag 4 wurde ein postkonfluenter Zustand erreicht. Das Medium wurde erneuert und die Zellen anschließend für 3 Tage im KM mit MGO oder GO stimuliert. Dabei wurden einmal täglich MGO und GO in den jeweiligen Konzentrationen zugegeben ohne das Medium zu wechseln wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben. Als Kontrollgruppe wurden Zellen ohne MGO und GO kultiviert. Nach 72 h erfolgte sowohl in der Expositionskultur als auch in den Kontrollgruppen ein Mediumwechsel von KM zum IM. Die Zellen wurden für 48 h mit dem adipogenen IM kultiviert (Induktionsphase). Nach 2 Tagen erfolgte ein weiterer Mediumwechsel zum DM für 48 h. Ab Tag 11 wurden die Zellen im KM weiterkultiviert.

Für molekularbiologische Untersuchungen der Zellen in den verschiedenen Differenzierungsstufen wurden am Tag 7 und 13 Proben für die Durchflusszytometrie, qRT-PCR und Western Blot genommen. Am Tag 9 wurden zusätzlich Proben für qRT-PCR und Western Blot genommen.

3.2.8 Adipogene Differenzierung der C3H10T1/2 unter Einfluss von BMP4

Um eine höhere adipogene Differenzierungsrate der C3H10T1/2-Zellen zu erreichen, wurde der adipogene Induktor *Bone Morphogenic Protein 4* (BMP4, Peprotech, Rocky Hill, USA) einmalig am Tag 4 dem KM zugegeben. BMP4 induziert die Adipogenese und erhöht so die Differenzierungseffizienz (Abbildung 2). Nachfolgend wird die Adipogenese unter dem Einfluss von BMP4 als induzierte Adipogenese bezeichnet, während die Differenzierung ohne BMP4 als spontan bezeichnet

wird. Für die Kultur von C3H10T1/2 wurde die Konzentration von 50 ng/ml gewählt (Bowers und Lane 2007). Dafür wurden 150 µl BMP4-Lösung in 300 ml KM eingesetzt. Der Differenzierungsansatz erfolgte wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben.

3.3 Analyse der AGE-Modifikationen am Tag 7

3.3.1 Vereinzeln der Zellen

Am Tag 7 wurden die noch undifferenzierten C3H10T1/2 auf AGE-Modifikationen nach der Exposition mit MGO und GO untersucht. Dafür wurde das Medium entfernt und die Zellen mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mithilfe des 0,05 % Trypsin-EDTA-Gemischs (1x) abgelöst. Die Zellen wurden in neuem Medium aufgenommen und mit einer Pipette in ein Falcon-Röhrchen überführt. Es folgte die Zentrifugation bei 1000 rpm und Raumtemperatur (RT) für 5 min. Das Medium wurde entfernt und das Zellpellet vorsichtig in 0,3 ml PBS resuspendiert. Dazu wurden 0,7 ml 99,9 %-iger Ethanol (- 20°C) gegeben und mit der Pipette gemischt.

3.3.2 Durchflusszytometrie

Die sich anschließenden durchflusszytometrischen Analysen wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Alexander Navarrete Santos (Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen wie folgt vorbereitet: Aufnahme in 1 ml TBS-Puffer und Zentrifugieren bei 1000 rpm und RT für 5 min. Anschließend Resuspension des Zellpellets für 10 min in 1 ml kalten TBST zur Permeabilisierung und Rehydratation der Zell- und Kernmembran. Nach der Inkubation folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm.

Es folgte die Resuspension des Zellpellets in 200 µl TBST gelöst mit den jeweiligen Antikörpern (CML, p21 und MG-H1) für 1 h (Siehe Tabelle 1). Nach einem Waschschrift mit 1 ml TBST folgte eine Zentrifugation für weitere 5 min bei 1000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und 200 µl von dem sekundären Antikörpermix auf das Pellet gegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 1 h bei RT im Dunkeln. Der überschüssige Antikörper wurde mit 1 ml TBS abgewaschen und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet in 500 µl TBS mit 1 µg/ml DAPI resuspendiert. Selektive Fluorophore wie DAPI dienen der Quantifizierung des zellulären DNA-Gehalts. Die Messung der Zellmodifikationen und des Zellzyklus von 10⁴ Zellen pro Behandlungsgruppe erfolgte anschließend mit dem FACS LSR II Fortessa (BD Biosciences), im ZMG unter Anleitung von Dr. Alexander Navarrete Santos. Die Expressionen der untersuchten Moleküle und Modifikationen wurden als mittlere Fluoreszenz angegeben.

Tabelle 1: Exzitation und Emission der verwendeten Antikörper zur Analyse der AGE-Modifikationen und des Zellzyklus

1. Antikörper	2. Antikörper	Exzitation	Emission
CML, 1:5000	Alexa-Fluor, 488 Ziege anti Kaninchen, 1:2500	488 nm (blau)	510 nm
MG-H1, 1:5000	Alexa-Fluor 594 Ziege anti-Maus, 1:2500	561 nm (grünelb)	585 nm
p21, 1:500	Esel anti-Ziege IgG-APC, 1:70	633 nm (rot)	660 nm
DAPI, 1 µg/ml		355 nm (UV)	450 nm

3.4 Quantifizierung der Differenzierungseffizienz am Tag 13

3.4.1 Lichtmikroskopischer Vergleich durch die Ölrotfärbung

Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml warmen PBS gewaschen und mit 4 % PFA (Paraformaldehyd, Serva GmbH, Heidelberg) für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml warmen PBS gewaschen. Die Ölrotfärbung erfolgte für 2 h bei RT. Die 0,005%ige Ölrotlösung wurde filtriert und für den Einsatz auf Zellen im Verhältnis von 3:2 mit H₂O dest. verdünnt.

Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und zuletzt abschließend in 3 ml PBS resuspendiert. Die Lipidakkumulation in den Zellen wurde lichtmikroskopisch mithilfe der Digital Sight Series der Firma Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland) dokumentiert.

3.4.2 Vereinzeln der Zellen und Durchführung der Nilrot-Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der adipogenen Differenzierungseffizienz wurde am Tag 13 der Differenzierung das KM abgenommen und die Zellen zweimal mit 3 ml PBS für 1 min gewaschen. 3 ml CDS wurden auf die Zellen gegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen abgelöst und in 1 ml Lösung 1 aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in ein 15ml-Falconröhrchen überführt und anschließend filtriert (Filtergröße 0,45 µm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Nach der Zentrifugation (800 rpm, 10 min) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml Lösung 2 aufgenommen.

Die Einzelzellsuspension wurde mit 0,1 µg/ml Nilrot (Sigma-Aldrich GmbH, Frickenhausen, Deutschland) für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Zentrifugation (800 rpm für 10 min) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen erneut in 1 ml Lösung 2 aufgenommen. Die Durchflusszytometrie wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Alexander Navarrete Santos (ZMG, Mar-

tin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Es wurden 10^4 Zellen von jeder Population analysiert (Abbildung 9).

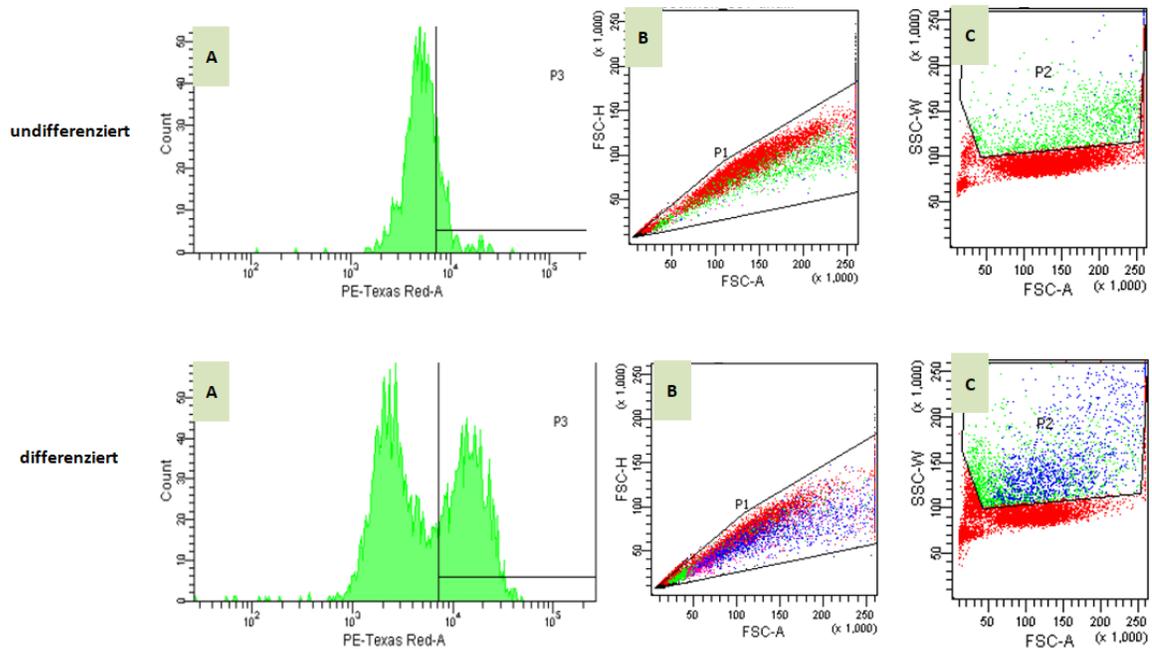


Abbildung 9: Beispielhafte Bestimmung der adipogenen Differenzierungseffizienz in der Durchflusszytometrie. Undifferenzierte und differenzierte Zellen hinsichtlich des Triglyzeridgehalts (A, entspricht der Nilrotakkumulation), Größe (B) und des Verhältnisses von Granularität zur Größe (C, SSC zu FSC) verglichen. Die differenzierten Zellen zeigen eine hohe Anfärbbarkeit mit Nilrot (A), sind größer (B) und besitzen mehr Granula (C).

Durch die Methode können verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden und Zelltrümmer, tote Zellen und Aggregate aus der Analyse ausgeschlossen werden. Zellen können durch das Seitwärtsstreulicht hinsichtlich ihrer Granularität und bezüglich ihrer Größe durch das Vorwärtsstreulicht analysiert werden. Adipozyten weisen eine überdurchschnittlich große Zellgröße auf und erzeugen damit ein erhöhtes Vorwärtsstreulicht. Zudem besitzen sie viele Lipidvesikel (Granularität) und erzeugen ein vermehrtes Seitwärtsstreulicht.

Der zusätzlich verwendete lipophile Farbstoff Nilrot (Exzitation 488 nm, Emission 585 nm) akkumuliert in den Lipidvesikeln und ist dadurch spezifisch für Zellen mit vielen Lipidvesikeln wie Adipozyten. Aus dem Verhältnis der nilrotreichen Zellen zu den nilrotarmen Zellen wurde die Differenzierungseffizienz berechnet.

3.5 Herstellung von cDNA

3.5.1 RNA-Isolation

Für die Probenahme bei den MSC wurde das Medium entfernt und mit 1 ml kalten PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml TRIzol® durch mechanische Manipulation vom Well gelöst und in ein 2 ml Reagenzröhrchen überführt. Gewebeproben wurden nach der Entnahme bei - 80°C in Gewebeskassetten gelagert. Für die Isolation von RNA wurde von den eingefrorenen Gewebestücken eine kleine Menge entnommen. Das Gewebestück wurde mit 1 ml TRIzol® (Sigma-Aldrich GmbH, Frickenhausen, Deutschland) in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben.

Zu den Zell- und Gewebeproben, wurden ca. 5 von den Keramikkügelchen (Durchmesser 1,4 mm, Bertin Technologies, Montigny-le-Brettonneux, Frankreich) zugegeben und mittels Homogenisator (PreCellys®24, Keyence GmbH, Neu-Ilseburg, Deutschland) 2x15 s bei 5000 rpm homogenisiert. Zu der Zellsuspension wurden 200 µl Chloroform (Carl Roth GmbH, Oldendorf, Deutschland) gegeben und die Probe mehrfach invertiert. Nach einer dreiminütigen Inkubation wurde das Substrat für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, um die Phasentrennung zu unterstützen. Die wässrige Phase wurde anschließend pipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. In einem Verhältnis von 1:1 wurde Isopropanol hinzugefügt und für 10 min bei RT inkubiert. Die RNA wurde bei 4°C und 13000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Isopropanol-haltige Überstand wurde verworfen, das RNA-Pellet dreimal mit 1 ml kalten 70%-Ethanol gewaschen und für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der ethanolhaltige Überstand wurde abgenommen, das Pellet in dem SpeedVac (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode im Harz, Deutschland) getrocknet und anschließend in 25 µl DEPC- Wasser resuspendiert.

3.5.2 Quantifizierung und Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA

Die RNA wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm quantifiziert. Die Menge wurde nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz mit einem Extinktionswert für RNA von $A_{260}=40$ µg/ml RNA und für DNA von $A_{260}=50$ µg/l dsDNA ermittelt. Gleichzeitig wurde die Absorption $\lambda=280$ nm bestimmt. Der gebildete Quotient von *optical density* (OD) $\lambda=260$: OD $\lambda= 280$ nm gibt Aufschluss über den Proteingehalt und soll bei reiner RNA bzw. DNA zwischen 1,7 und 2,0 betragen. Eine weitere Qualitätskontrolle erfolgte zusätzlich mithilfe eines 1,2%-RNA-Gels.

3.5.3 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Agarose, destilliertes Wasser und TAE- Puffer wurden unter vorsichtigem Schütteln aufgekocht. 1,5 µl Ethidiumbromid (50 µg/ml) (Carl Roth GmbH, Oldendorf, Deutschland) wurde in die Lösung gegeben und nachdem das Gel etwas abgekühlt war in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde 1 µg jeder Probe mit 1 µl bromphenolhaltigem Ladepuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte mithilfe des UV-Detektionssystems der Firma LTF Labortechnik GmbH & Co. KG (Wasserburg, Deutschland). Es wurden nur Proben weiterverwendet, die ein intaktes Bandenmuster von 28S- und 18S-rRNA aufwiesen.

3.5.4 DNase-Verdau

Reste genomischer DNA wurden mithilfe des Invitrogen *DNase Treatment and Removal Kit* (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) entfernt. Dafür wurden 7 µg der RNA für 30 min in einem 37°C warmen Wasserbad wie vom Hersteller vorgeschrieben mit DNase, DNA-Puffer und RNase-Inhibitor inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit dem Stoppreagenz versetzt und für 2 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde dann für 1 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Proben wurden auf DNA-Anteile überprüft. Die Kontrolle erfolgte durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Diese erfolgte mithilfe des Taq-DNA-Polymerase Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Dafür wurden 0,5 µl der Probe in die PCR-Reaktion gegeben. Der PCR, beginnend mit der Denaturierungsphase bei 94°C für 15 min, folgte die Primerhybridisierung bei 60°C für 15 s und schließlich die Amplifikation bei 72°C für 30 s. Die PCR wurde 40mal im Thermocycler wiederholt.

Nach dem Erstarren des Gels (Siehe Kapitel 3.5.3) wurden 21 µl der PCR-Reaktion mit 4 µl Ladepuffer auf ein 1,8%-PCR-Gel aufgetragen.

3.5.5 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion dient der cDNA-Herstellung. In der Reaktion wurde 1 µg RNA eingesetzt und das Volumen auf 11,5 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 µl Randomprimer erfolgte das Primer-Annealing bei 65°C für 5 min im Thermocycler. Im Anschluss wurden der Probe Puffer, RNase-Inhibitor, dNTPs und Reverse Transkriptase hinzugefügt. Die Probe wurde zuerst bei 25°C für 10 min und dann bei 42°C für 60 min inkubiert. Im letzten Schritt wurde die Reaktion durch eine Hitzeinaktivierung bei 70°C für 10 min gestoppt.

Die cDNA-Lösung wurde mit PCR-H₂O auf 100 µl aufgefüllt und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Effizienz der durchgeführten RT-Reaktion wurde durch eine PCR auf das *house keeping gen* 18S, wie im Kapitel 3.5.4 beschrieben, überprüft.

3.6 Analyse der cDNA

3.6.1 Quantitative Echtzeit-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Mithilfe der qRT-PCR wurde die im Kapitel 3.5 hergestellte cDNA auf verschiedene Gene der adipogenen Differenzierung untersucht. Dafür wurde das Kit EvaGreen (Solis Bio Dyne, Tartu, Estland) verwendet. Sowohl die Proben als auch der im folgenden Kapitel 3.6.4 hergestellte Plasmidstandard wurden mit dem qRT-PCR-Ansatz in Doppelbestimmung untersucht.

Die Auftragung des Standards, der spezifisch für das jeweilige zu untersuchende Genprodukt war, erfolgte nach der im Kapitel 3.6.11 beschriebenen Standardreihe von 10⁷ bis 10³ Molekülen. Um eine Verunreinigung auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle mit PCR-H₂O mitgeführt. Die qRT-PCR basiert auf dem Prinzip der PCR und der Interkalation des zunächst inaktiven Fluoreszenzfarbstoffs SYBRGreen, der durch den Einbau in die DNA-Doppelhelix aktiviert wird und fluoresziert (Tabelle 2). Die Zunahme der Fluoreszenz mit steigenden Zykluszahlen korreliert mit der Zunahme der gefärbten Target-DNA.

Tabelle 2: qRT-PCR-Protokoll

Stadium	Temperatur	Zeit
Initialisierung	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	1 min
Primerhybridisierung	60°C	1 min
Amplifizierung	72°C	1 min

Im Anschluss an diese PCR-Reaktion wurde eine Schmelzpunktanalyse (von 55°C bis 95°C in 0,5°C-Intervallen) erstellt. Diese wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass nur ein PCR-Produkt amplifiziert wurde, um Verunreinigungen auszuschließen.

3.6.2 Primer für die qRT-PCR

Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden mittels Primer3Plus Software (Free Software Foundation, Boston, USA) erstellt (Tabelle 3). Als Grundlage wurden murine mRNA-Sequenzen genutzt, die in der NCBI-Datenbank hinterlegt waren. Als Charakteristika wurden dabei die optimale Annealingtemperatur bei 60°C, Gleichverteilung der CG- und AT-Nukleotide und möglichst eine Intron-Exon-übergreifende Grenze in dem Produkt eingehalten.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide. „V“ steht für die Vorwärts-, „R“ steht für die Rückwärtssequenzen.

Name	Sequenz (5' → 3')	bp	Intron/Exon
mu18S	V: AGA AAC GGC TAC CAC ATC CAA R: CCT GTA TTG TTA TTT TTC GTC ACT ACC T	91	Nein
muPref1	V: AGA AAG GCC AGT ACG AAT GCT CCT R: TTG CGG CTA CGA TCT CAC AGA AGT	198	Ja
muCol2a1	V: CAG AGG TGA TCG TGG TGA CA R: CCT TCT CGT CAT ACC CTC CA	176	Ja
muWnt10b	V: ACG ACA TGG ACT TCG GAG AG R: GTT CCA TGG CAT TTG CAC TT	154	Nein
muSOX9	V: AAG TCG GTG AAG AAC GGA CAA R: GCG CCT TGA AGA TAG CAT TAG G	82	Nein
muRunx2	V: CGC ATT CCT CAT CCC AGT AT R: TGG CTC AGA TAG GAG GGG TA	176	Ja
muPPARy1	V: CGG TGA ACC ACT GAT ATT CAG G R: CAA AGG AAT GCG AGT GGT CT	152	Ja
muPPARy2	V: CTC CTG TTG ACC CAG AGC AT R: AAT GCG AGT GGT CTT CCA TC	153	Ja
muFABP4	V: TGG AAG CTT GTC TCC AGT GA R: TCG ACT TTC CAT CCC ACT TC	283	Ja
mGAPDH	V: ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG R: ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA	660	nein

3.6.3 Auswertung der Transkriptmenge

Zur Quantifizierung der enthaltenen mRNA-Transkriptmengen wurde der *cycle threshold* (CT), der von der StepOnePlus®-Software ausgegeben wurde, verwendet (Applied Biosystems, Foster City, USA). Bei dem CT-Wert handelt es sich um den Zykluspunkt, an dem die Fluoreszenz das erste Mal den Hintergrundwert überschreitet und liefert somit eine quantitative Aussage über die Menge eines spezifischen Genproduktes.

Über die mitgeführte Standardreihe wurde die Effizienz der qRT-PCR bestimmt. Eine Effizienz von 90 bis 100 % wurde als tolerierbar angesehen und für die Auswertung verwendet. Die Auswertung der qRT-PCR in dieser Arbeit erfolgte mit der $\Delta\Delta$ CT-Methode. Diese Methode setzt eine Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, sollte die Effizienz der qRT-PCR des Referenz- und Zielgens eine vergleichbare Effizienz ± 5 % erreichen. Die Zielgene orientierten sich anschließend an der Effizienz der qRT-PCR des Referenzgens 18S von 96,2 %.

3.6.4 Herstellung des Plasmidstandards

Als Nukleinsäure-Standard zur Quantifizierung der Zielgenexpression wurden Verdünnungsreihen von rekombinanten Plasmiden verwendet. Zur Herstellung dieser Plasmide wurden die spezifischen DNA-Sequenzen für jedes einzelne Gen wie folgt kloniert: Die Gene wurden durch die qRT-PCR aus RNA von Mausgeweben oder C3H10T1/2-Zellen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,8%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das DNA-Produkt wurde aus dem Agarosegel unter UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Elution des PCR-Fragments wurde mit dem Gelextraktionskit von Qiagen GmbH (Taufkirchen, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Das aufgereinigte DNA-Fragment wurde in 30 µl Elutionspuffer im Reaktionsgefäß aufgenommen.

3.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten mit dem pGEMT-Vektor

Für die Klonierung wurde der pGEMT-Vektor der Firma Promega GmbH (Mannheim, Deutschland) verwendet. Der Vektor weist einen komplementären 3'-T-Überhang auf, an dem PCR-Produkte der Taq-DNA-Polymerase binden, die einen 3'-A-Überhang besitzen. Der Ligationsansatz (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) und 8 µl des DNA-Fragments wurden in ein RNase- und DNase-freies Reaktionsgefäß gegeben und über Nacht bei 10°C inkubiert.

3.6.6 Transfektion in den kompetenten E. coli-Stamm

Für die Transformation wurden kompetente E. coli des Stamms E. coli XL 1 blue der Firma New England Labs (Ipswich, Massachusetts, USA) verwendet. Dafür wurden die Zellen aufgetaut und vorsichtig mit 20 µl Ligationsansatz gemischt. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 42°C für 30 s einem Hitzeschock unterzogen und wieder für 2 min auf Eis gekühlt. Es wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und für 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Der Ansatz wurde jeweils mit 50 µl und 100 µl auf Agarplatten ausplattiert, die Ampicillin (Carl Roth GmbH, Oldendorf, Deutschland) enthielten. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Das Plasmid pGEMT enthielt das Gen, das die Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin vermittelt. Dadurch wurde gewährleistet, dass auf den Platten nur transformierte Bakterien wuchsen.

Blau-Weiß-Selektion

Die Agarplatten enthielten IPTG (Isopropyl-β-thiogalactosid, Carl Roth GmbH, Oldendorf, Deutschland) und X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranisoid, Carl Roth GmbH, Oldendorf, Deutschland), die der sogenannten Blau-Weiß-Selektion dienten.

Transformierte Bakterien mit dem pGEMT-Vektor können X-Gal enzymatisch umsetzen. Die entsprechenden Kolonien erscheinen durch den Farbstoff 5-Bromo-4-chloro-indol blau. Der Einbau der DNA-Fragmente in die *multiple cloning site* des pGEMT-Vektors zerstört das Leseraster des pGEMT-Vektors, so dass keine funktionsfähige Galaktosidase gebildet werden kann. Bakterienkolonien mit dem DNA-Fragment im Vektor erscheinen weiß. Weiße Kolonien wurden unter sterilen Bedingungen in 5 ml LB-Medium+Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

3.6.7 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem Plasmid-Mini-Prep-Kit (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gemäß der Herstellerangabe ausgehend von 2 ml der E. coli-Lösung. Die Plasmide wurden in 50 µl *Solution*-Puffer aufgenommen und die DNA-Menge quantifiziert.

3.6.8 Restriktionsverdau

Als Nachweis für den Klonierungserfolg und zur Überprüfung der Fragmentgröße des Inserts erfolgte ein Restriktionsverdau mithilfe der Endonukleasen Apa I und Sac I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Innerhalb der *multiple cloning site* des verwendeten pGEMT-Vektors gibt es spezifische Schnittstellen der beiden Enzyme. Das enthaltene DNA-Fragment ist ca. 80 bp größer als das eigentliche PCR-Produkt, dabei dem Restriktionsverdau Teile des Vektors mit ausgeschnitten werden. Nach der Zugabe von 8 µl Plasmid inkubierte der Ansatz für 1 min bei 37°C im Wasserbad. Im Anschluss wurde der Ansatz mit 4 µl bromphenolhaltigen Puffer gemischt, auf ein 1,8%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch mit einer Spannung von 100V aufgetrennt.

3.6.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma SeqLab GmbH (Göttingen, Deutschland). Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mithilfe des *Basic Local Alignment Search Tool* (Blast) über das *National Center Biotechnology Information* (NCBI), Bethesda, USA (Siehe Kapitel 9.1).

3.6.10 Anlegen der Glycerinkultur

Nach der Überprüfung der Identität des Plasmids wurde eine Glycerinkultur der rekombinanten E. coli aus 600 µl Übernachtskultur (Siehe Kapitel 3.6.6) und 400 µl Glycerin angelegt. Diese Mischung wurde für 15 min auf Eis inkubiert und im Anschluss bei -80°C gelagert.

3.6.11 Herstellung einer Verdünnungsreihe des DNA-Plasmidstandards

Nach dem die Sequenz des Inserts der Plasmide überprüft worden war, wurde die Konzentration spektralphotometrisch in Doppelbestimmung ermittelt. Für jedes Plasmid wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten von 10^7 bis 10^3 - Molekülen als DNA-Standard für die qRT-PCR hergestellt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.7 Analyse der Proben auf Proteinebene

3.7.1 Proteinisolation

Die Zellkulturproben der einzelnen Behandlungsgruppen wurden mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen, in 200 μl RIPA-Ansatz aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zu den Proben wurden ungefähr 5 1,4-mm-Keramikkügelchen gegeben und einmal für 15 s bei 5000 rpm im Pre-Celllys®24 homogenisiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 13000 rpm. Der proteinreiche Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß übertragen.

3.7.2 Quantifizierung der gewonnenen Proteinmenge

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des Bradford Protein-Assay Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Dafür wurden 800 μl H_2O dest. mit 200 μl des Bradford Protein-Assay Kit und 1 μl der Probe gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Zur Bestimmung der Eigenabsorption des Wasser-Bradford-Gemischs wurde zum Abgleich eine Kontrolle ohne Probe mitgeführt. Anschließend erfolgte die Messung der Absorptionsrate bei $\lambda=595$ nm mit dem UV-Spektrometer (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Die Bestimmung der Konzentration wurde anhand einer Standardgeraden $y=0,0548x$ (y =gemessene Absorption; x =gesuchte Proteinkonzentration) ermittelt, die vorab bestimmt worden war.

3.7.3 Western Blot

Zur elektiven Quantifizierung der Proteine FABP4 und PPAR γ 1/2 wurde die Methode des Western Blots angewendet. Das Prinzip beruht auf der Detektion von immobilisierten Proteinen durch spezifische Antikörper.

SDS-Polyacrylamidgel

Zur Analyse der Proteine FABP4 und PPAR γ 1/2 wurde ein Tris-/Glycin-SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Dafür wurde das Proteingemisch elektrophoretisch nach seinem Molekulgewicht aufgetrennt. Das verwendete Gel bestand aus einem Sammel- (4 %) und einem Trenngel (10 auf 15 %). Im ersten Schritt wurde das Trenngel als Gradientengel gegossen. Das 10 %- und 15 %-ige Gel wurden gleichzeitig hergestellt. 4,5 ml des 10 %-Gels und 4,5 ml des 15 %-Gels wurden mithilfe einer 10-ml-Pipette aufgenommen und vorsichtig in die Kassette (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gefüllt. Zur Vermeidung von Luftblasen und zur Verhinderung der Austrocknung während der Verfestigung, wurde 1 ml H₂O dest. auf das Gel geschichtet. Nachdem das Gel fest war, wurde das Sammelgel hergestellt. Anschließend wurden das H₂O dest. abgegossen und das Sammelgel aufgeschichtet. Unter Vermeidung von Luftblasen wurde zum Schluss der Probenkamm platziert. Nach der Verfestigung des Sammelgels wurden 25 μ g der Probe aufgetragen. Dafür wurde das Volumen der Probe (entsprechend für 25 μ g) abhängig von der Konzentration mit destilliertem Wasser auf 30 μ l aufgefüllt. Anschließend wurde 6 μ l Laemmli-Ladungspuffer (5-fach konzentriert) zugegeben und für 10 min bei 70°C denaturiert. Das in dem Ladepuffer enthaltene SDS band die Proteine zu negativen Komplexen, wodurch negativ geladene Proteinkomplexe entsprechend der Molekülgröße entstanden. Nach dem Auftragen der Proben und der Proteinleiter, wurde eine Spannung von 120V angelegt, solange sich die Proben im Sammelgel befanden. Sobald die Proben das Sammelgel erreichten, wurde die Spannung auf 180 V erhöht.

Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) mittels Semidry-Blotverfahren übertragen. Um die Proteinbindungsstellen auf der Membran zu aktivieren, wurde den verschiedenen Transferpuffern 20 % Methanol zugesetzt. Filterpapierabschnitte (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) wurden in den 3 verschiedenen Transferpuffern getränkt und übereinander geschichtet. Den Boden bildete die Anode, daraufhin folgten 3 Filterpapierabschnitte getränkt in Transferpuffer 1 und 2 Abschnitte in Transferpuffer 2. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran darauf platziert. Im nächsten Schritt wurde das Gel auf die Membran gelegt. Darauf folgten 3 Filterpapiere getränkt in Transferpuffer 3. Den Deckel bildete die Kathode. Senkrecht zum Polyacrylamidgel wurde ein elektrisches Feld angelegt. Durch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgte die Bindung der Proteine an die Membran. Der Transfer der Proteine von dem SDS-Gel zu der Nitrocellulosemembran erfolgte bei einer Stromstärke von 150 mA über 2 h.

Ponceau-S-Färbung

Nach 2 h wurde die Blotkammer auseinander gebaut und die Membran aufgenommen. Der Transfer auf die Nitrocellulosemembran wurde mittels Ponceau-S-Lösung überprüft. Dafür wurde die Membran für 1 min in der Ponceau-Lösung (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) gefärbt und anschließend 2x mit Wasser gewaschen. Die Membran wurde abhängig von der Größe geschnitten (Abbildung 10), was gewährleistet, dass verschiedene Antikörper auf einer Membran verwendet werden konnten. Die Spezifität der Antikörper wurde vorab in Etablierungsversuchen überprüft.

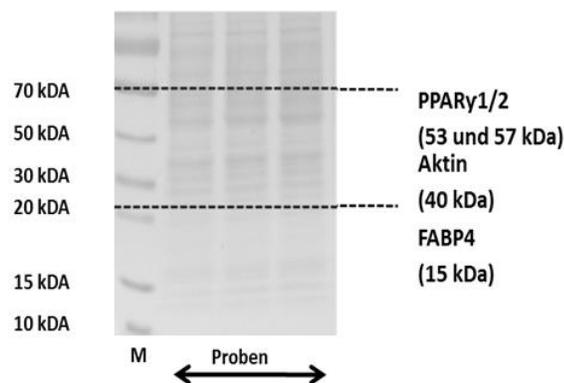


Abbildung 10: Membran nach Ponceau-S-Färbung. "M" kennzeichnet den verwendeten Proteinmarker. Die gestrichelten schwarzen Linien zeigen die Schnittstellen, an denen die Membran mit einem Skalpell geschnitten wurde. Zur Detektion von FABP4 wurde der Bereich zwischen 10 und 25 kDa verwendet. Zur Detektion von PPARy1/2 und Aktin wurde der Bereich zwischen 25 und 75 kDa verwendet.

Antikörperdetektion

Nach dem Schneiden wurde die Membran für die Detektion von FABP4 für 1 h mit einer 3 %-igen BSA-Lösung (Bovine Serum Albumin gelöst in TBST) blockiert. Der Abschnitt zur Detektion von PPARy1/2 wurde in 3 %-igen Milchpulver (gelöst in TBST) geblockt. Im Anschluss wurden die primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Dafür wurde PPARy1/2 in einer Konzentration von 1:125 verdünnt in 3 %-iger Milch in TBST und FABP4 in einer Konzentration von 1:500 verdünnt in 3 %-iger BSA-Lösung verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Darstellung der verwendeten Antikörper.

1. Antikörper	PPARy1 und 2 (#B2415)	FABP4 (#H1210)	Aktin (#A5441)
Firma	Santa Cruz Biotechnologies	Santa Cruz Biotechnologie	Sigma-Aldrich
Spezies	murin	murin	murin
Verdünnung	1:125 in 3 %-igem Milchpulver in TBST	1:500 in 3 %-iger BSA-Lösung	1:20000 in 3 %-igem Milchpulver in TBST
waschen	3 x 5 min in TBST	2 x 5 min in TBST	6 x 5 min in TBST
2. Antikörper	GAM (#62-6820)	GAM (#62-6820)	GAM (#7074)
Firma	Dianova	Dianova	Dianova
Spezies	Ziege-anti-Maus	Ziege-anti-Maus	Ziege-anti-Maus
Verdünnung	1:5000 in 3 %-igem Milchpulver	1:10000 in 3 %-iger BSA-Lösung	1:45000 in 5 %-iger Milch in TBST
waschen	3x 5 min in TBST 2 x 5 min in TBS	2 x 5 min in TBST 3 x 5 min TBS	6 x 5 min TBST 2 x 5 min TBS

Am folgenden Tag wurden die Membranen mit TBST gewaschen (FABP4 2x 5 min, PPARy 3x 5 min). Der sekundäre Antikörper GAM inkubierte für PPARy1 und 2 in einer Konzentration von 1:5000 verdünnt in 3 %-iger Milch bzw. 3 %-iger BSA für 2 h auf der Membran. Der sekundäre Antikörper für FABP4 inkubierte für 2 h bei RT in einer Konzentration von 1:10000 verdünnt in 3 %-iger BSA-Lösung auf der Membran. Anschließend folgte ein Waschschriff mit TBST (FABP4 2x 5 min, PPARy 3x 5 min). Danach wurden die Membranen 2x 5 min mit TBS gewaschen.

Die Detektion erfolgte mittels einer Licht-emittierenden Reaktion. Die *horseradish peroxidase* des zweiten Antikörpers katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz aus. Dies wird mit dem Chemiluminescence Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) detektiert. Über eine photosensitive Kamera und die Aufnahme des Lumineszenzsignals war eine direkte Quantifizierung des emittierenden Lichts möglich. Das ECL wurde hergestellt, auf die Membran gegeben und während der Detektion auf der Membran belassen.

Anschließend wurden die Membranen 2 x 5 min mit TBST und 1 x 5 min mit TBS gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Membranen bei 4°C in TBS gelagert.

Normierung auf das Referenzprotein Aktin

Für einen Abgleich mit dem Referenzprotein Aktin mussten die bereits hybridisierten Antikörper für die Detektion von PPARy1/2 von der Oberfläche der Nitrozellulose-Membran durch *Stripping* entfernt werden. Dafür inkubierte die Membran für 30 min im *Stripping* Puffer bei 70°C auf dem Schüttler. Die im *Stripping*-Puffer enthaltenen Komponenten SDS und Mercaptoethanol denaturie-

ren den gebundenen Antikörper für PPAR γ 1/2. Anschließend wurde die Membran 4x 5 min in TBST gewaschen und in 5 %-iger Milch gelöst in TBST für 1 h blockiert.

Der primäre Antikörper für Aktin wurde über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 6x 5 min mit TBST gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper GAM (1:45000 in 5 %-Milch verdünnt) für 2 h inkubiert. Nach dem Waschschrift mit TBST (6x 5 min) folgte ein 2-maliger Waschschrift für 5 min mit TBS.

Für die Detektion wurde selbst hergestelltes ECL-Reagenz verwendet und bei der Detektion mit dem Chemiluminescence Imaging System für 10 min auf der Membran belassen. Anschließend wurde die Membran wie nach der Antikörperdetektion beschrieben gewaschen und gelagert.

3.8 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden in drei unabhängigen Versuchen (N) in zwei Messungen (n) wiederholt. Für die statistische Auswertung wurde die Software Sigmaplot (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) genutzt. Die Auswertung erfolgte mittels Student t-Test oder Mann Whitney Rank Sum-Test. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Irrtumswahrscheinlichkeiten $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant (# oder *) angegeben. Irrtumswahrscheinlichkeiten $p < 0,01$ wurden als statistisch sehr signifikant (## oder **) angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung geeigneter Expositionskonzentrationen

Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein Expositionsversuch durchgeführt (Siehe Kapitel 3.2.5), um geeignete Konzentrationen an MGO und GO für die Exposition der Zellen zu ermitteln. Eine Beurteilung des Wachstums erfolgte lichtmikroskopisch. Dabei zeigte sich, dass bei 250 μM MGO, GO und MGO/GO weniger Zellen wuchsen. Konzentrationen von 250 μM MGO und GO einzeln und in Kombination wirkten zytotoxisch auf die Zellen, sodass diese Konzentrationen für weitere Versuche ausgeschlossen wurden. Durch den Untergang der Zellen konnte weder der Einfluss auf die AGE-Modifikationen, noch auf die Differenzierungseffizienz analysiert werden (Abbildung 11).

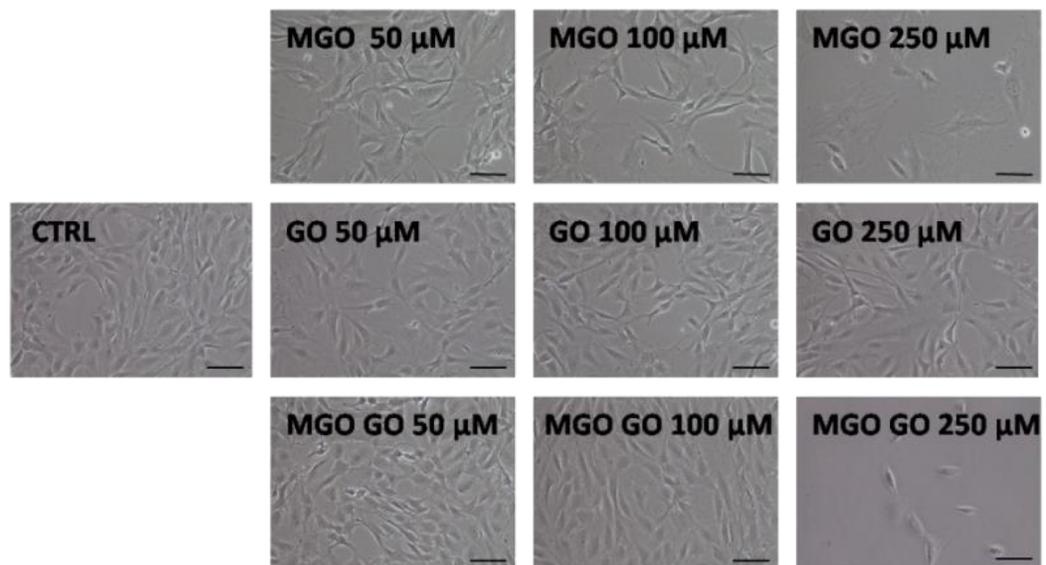


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme der C3H10T1/2 nach MGO- und GO-Exposition. C3H10T1/2-Zellen nach 72 h Exposition mit MGO und GO in Konzentrationen von 50 μM bis 250 μM im Vergleich zur Kontrolle. Bei 250 μM MGO, GO und MGO/GO wuchsen weniger Zellen. Von jeder Behandlungsgruppe wurden zufällig drei Ausschnitte fotografiert. Der schwarze Balken entspricht dem Maßstab von 100 μm . N=1, n=2.

4.2 Einfluss von MGO und GO auf die Modifikation mit AGE und dem Seneszenzmarker

p21

Der Einfluss von MGO und GO auf die AGE-Modifikationen und den Seneszenzmarker p21 in den C3H10T1/2-Zellen wurde am Tag 7 des Differenzierungsprotokolls (Siehe Kapitel 3.2.7) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Da wie im Kapitel 4.3 beschrieben eine Steigerung der Differenzierungseffizienz mit BMP4 parallel zu der Exposition mit MGO und GO notwendig war, wurden die AGE-Modifikationen in C3H10T1/2, die mit und ohne BMP4 kultiviert wurden, analysiert.

4.2.1 Analyse des Seneszenzmarkers p21 und des Zellzyklus

Nach der Exposition mit MGO und GO für 72 h wurde eine tendenziell vermehrte Expression von p21 mit steigender Konzentration nachgewiesen. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Steigerung der mittleren Fluoreszenz um durchschnittlich 10 % in den Behandlungsgruppen mit 100 µM MGO, 50 µM und 100 µM GO und 100 µM MGO und GO. Die von BMP4 stimulierten Zellen zeigten nur bei 100 µM MGO und GO eine Steigerung der p21-Fluoreszenz (Abbildung 12).

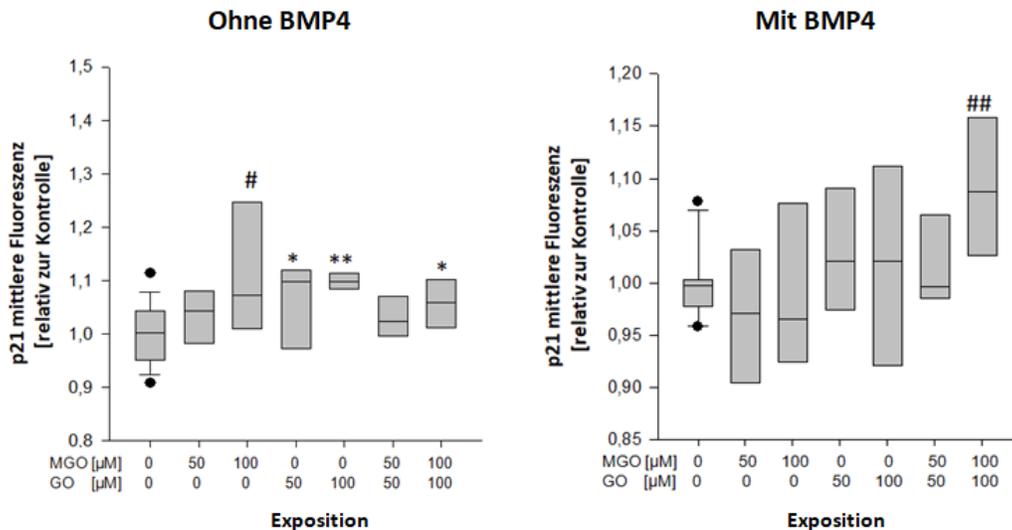


Abbildung 12: Relative mittlere Fluoreszenz von p21 pro Zelle nach der Exposition mit MGO und GO bestimmt mittels Durchflusszytometrie. Die relative mittlere Fluoreszenz von p21 ist als Mittelwert abhängig von den Konzentrationen 50 und 100 µM MGO und GO, einzeln oder in Kombination, relativ zur Kontrolle angegeben. Statistisch signifikante Werte sind bei Normalverteilung (Student T-Test) als * $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$ gekennzeichnet. Nicht normalverteilte Signifikanzen (Mann Whitney Rank Sum-Test) sind als # $p < 0,05$ und ## $p < 0,001$ dargestellt. Es wurden 3 unabhängige Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt (N=3, n=2).

Der Zellzyklus wurde nur in den Zellen der induzierten Adipogenese untersucht. Die Exposition mit MGO und GO hatte keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl der Zellen in der G0/G1-Phase. In der G2-Phase zeigte sich eine Verringerung der Zellen, diese erreichte jedoch kein Signifikanzniveau (Abbildung 13).

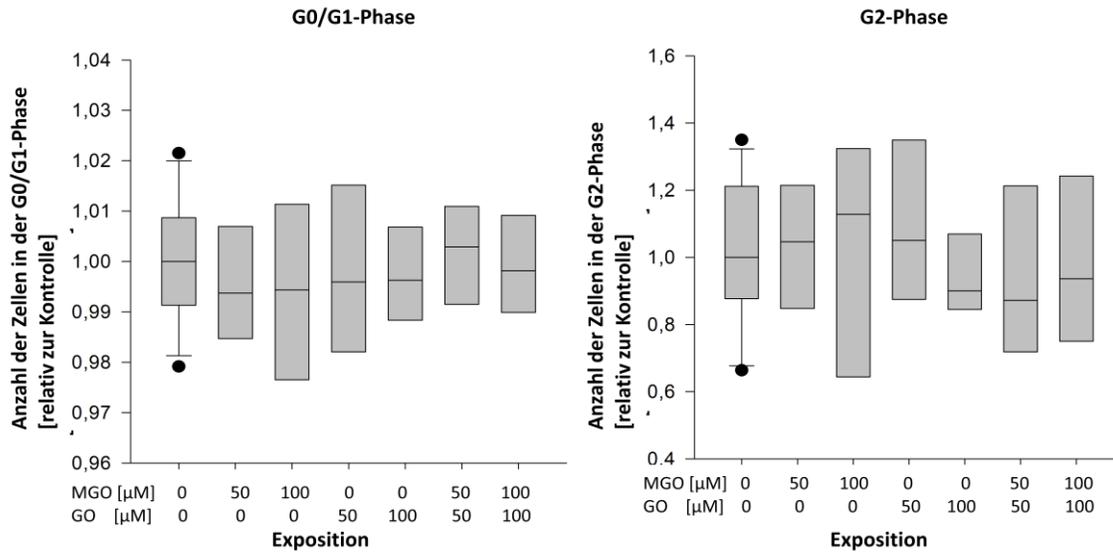


Abbildung 13: Relative Anzahl der Zellen in der G0/G1- und G2-Phase nach der Exposition mit MGO und GO gemessen mittels Durchflusszytometrie. Die Anzahl der Zellen in der G0/G1- und in der G2-Phase im Verhältnis zur Gesamtpopulation abhängig von den Konzentrationen 50 und 100 μM MGO und GO, einzeln oder in Kombination, relativ zur Kontrolle angegeben. Es wurden 3 unabhängige Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt (N=3, n=2).

Auch in der S-Phase zeigte sich kein signifikanter Einfluss der Exposition mit MGO und GO (Abbildung 14).

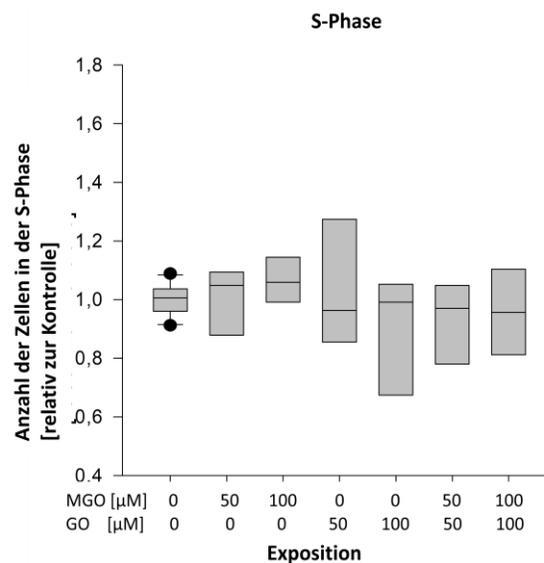


Abbildung 14: Relative Anzahl der Zellen in der S-Phase nach der Exposition mit MGO und GO gemessen mittels Durchflusszytometrie. Die Anzahl der Zellen in der S-Phase im Verhältnis zur Gesamtpopulation abhängig von den Konzentrationen 50 und 100 μM MGO und GO, einzeln oder in Kombination, relativ zur Kontrolle angegeben. Es wurden 3 unabhängige Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt (N=3, n=2).

4.2.2 AGE-Modifikationen

Methylglyoxal-derived hydroimidazolone (MG-H1)

Unter dem Einfluss von MGO und GO kam es zu einer Steigerung der MG-H1-Modifikation. Dabei war die relative mittlere MG-H1-Fluoreszenz in der Behandlungsgruppe mit 100 μM MGO um das 1,5fache der Kontrolle erhöht (Abbildung 15).

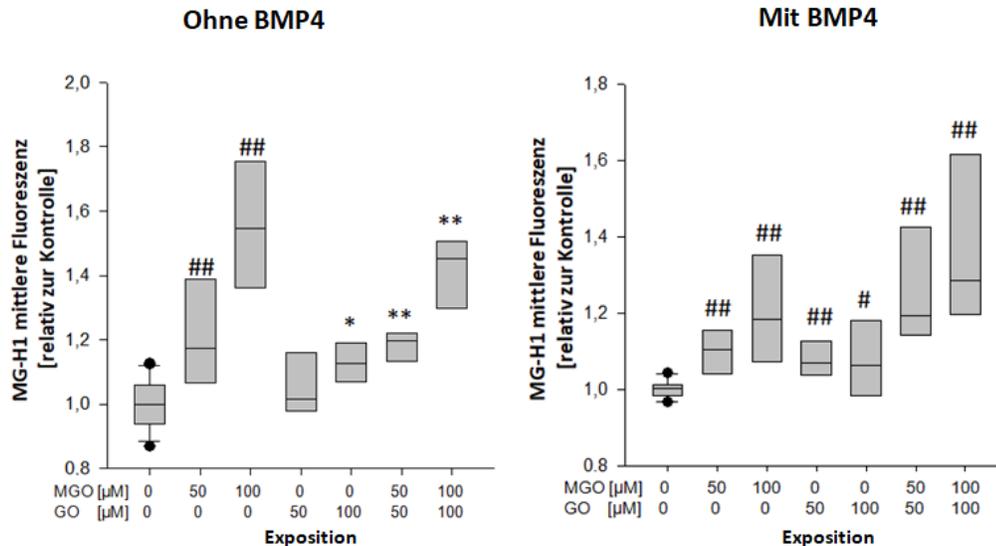


Abbildung 15: Relative mittlere Fluoreszenz von MG-H1 nach der Exposition mit MGO und GO für 72 h gemessen mittels Durchflusszytometrie. In der Grafik wird die gemessene relative mittlere Fluoreszenz von MG-H1 als Mittelwert der einzelnen Behandlungsgruppen relativ zur Kontrolle dargestellt. Statistisch signifikante Werte sind bei Normalverteilung mit dem Student T-Test berechnet und als * $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$ gekennzeichnet. Nicht normalverteilte statistisch signifikante Werte sind mittels Mann Whitney Rank Sum-Test berechnet und als # $p < 0,05$ und ## $p < 0,001$ dargestellt (N=3; n=2).

Carboxymethyllysin (CML)

Eine Steigerung der CML-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle konnte bei einer Exposition mit 50 μM und 100 μM GO und 50 μM und 100 μM MGO und GO in Kombination nachgewiesen werden. Unter dem Einfluss von BMP4 zeigte sich bei der Exposition mit 100 μM GO und 50 μM MGO und GO zusammen eine Erhöhung der CML-Modifikationen (Abbildung 16).

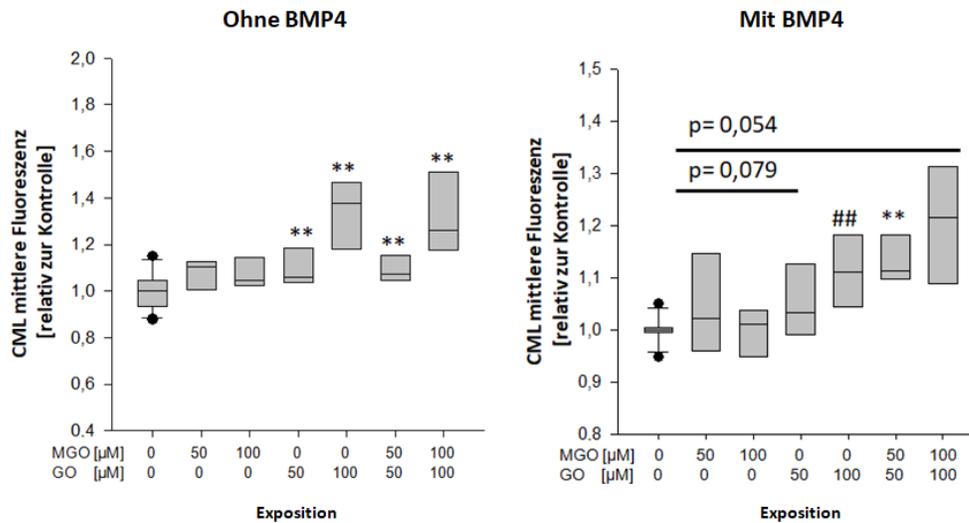


Abbildung 16: Relative mittlere Fluoreszenz von CML nach 72 h-Exposition mit MGO und GO bestimmt mittels Durchflusszytometrie. Die Behandlungsgruppen zeigten die konzentrationsabhängige Zunahme der relativen mittleren CML-Fluoreszenz, diese wurden relativ zur Kontrolle als Mittelwert dargestellt. Statistisch signifikante Werte sind bei Normalverteilung (Student T-Test) als ** $p < 0,001$ gekennzeichnet. Nicht normalverteilte Signifikanzen sind mittels Mann Whitney Rank sum-Test berechnet und als ## $p < 0,001$ dargestellt (N=3, n=2).

4.3 Vergleich der Differenzierungseffizienz der spontanen und der induzierten Adipogenese

Am Ende des Differenzierungsprotokolls am Tag 13 wurde die adipogene Differenzierungseffizienz mittels Durchflusszytometrie und Ölrot-O-Färbung bestimmt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, dass die spontane adipogene Differenzierungseffizienz nur bei $8,68\% \pm 3,9\%$ lag. Durch die einmalige Zugabe von 50 ng/ml BMP4 am Tag 4 konnte die adipogene Differenzierungseffizienz auf $72,9\% \pm 9,14\%$ gesteigert werden.

Sowohl die Proben mit BMP4- als auch die Proben ohne BMP4-Behandlung wurden dem gleichen Protokoll in der Durchflusszytometrie unterzogen. Unabhängig von der Exposition mit MGO und GO waren die Adipozyten der spontanen Differenzierung deutlich kleiner und reicherten deutlich weniger Nilrot an als die Zellen, die mit BMP4 stimuliert worden waren. Bei der Betrachtung der Granularität der Adipozyten zeigten sich keine Unterschiede, sodass sich der Gehalt der Lipidvesikel nicht verändert hat. Die Erhöhung des Nilrot-Gehalts ist auf die Erhöhung der Adipozytenanzahl und somit auf die erhöhte Differenzierungseffizienz zurückzuführen (Abbildung 17).

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Ölrot-Anreicherung zeigten sich ohne den Einfluss von BMP4 deutlich weniger Adipozyten als bei der Stimulation mit BMP4 (Abbildung 18).

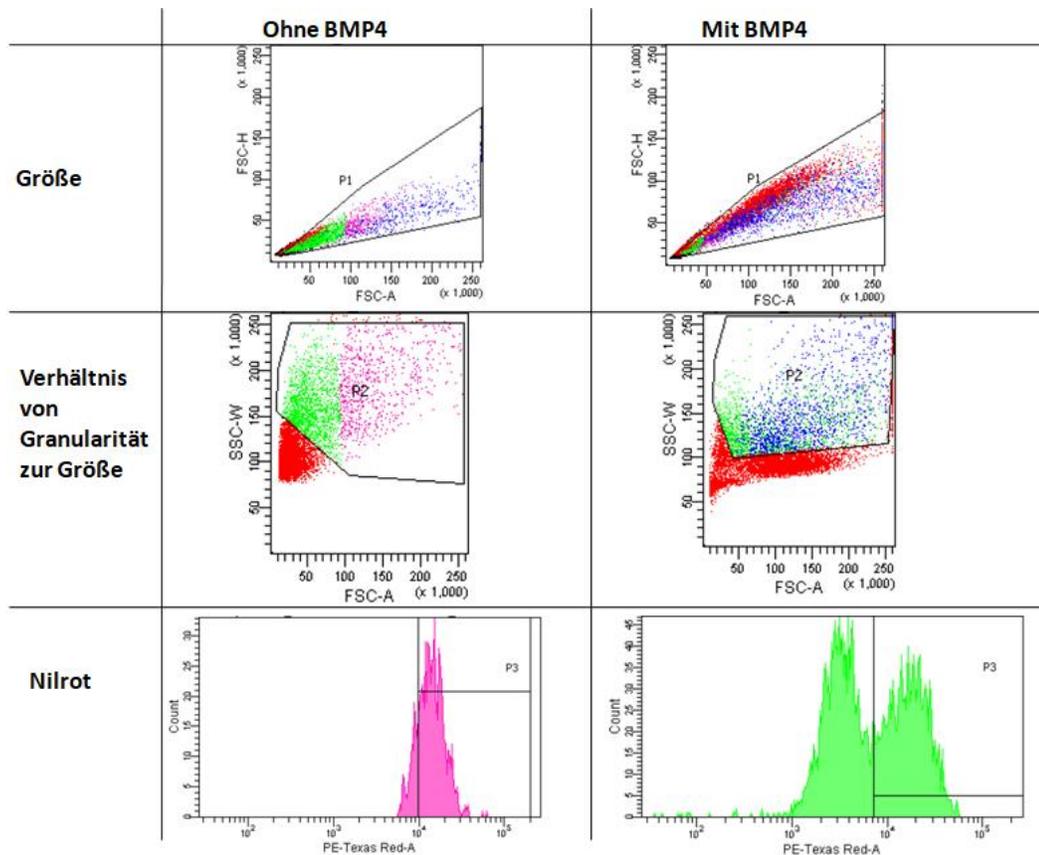


Abbildung 17: Quantitative Bestimmung der Adipozytenanzahl in C3H10T1/2 am Ende des adipogenen Differenzierungsprotokolls mit und ohne BMP4. C3H10T1/2 wurden am Tag 4 einmalig mit BMP4 stimuliert und die adipogene Differenzierungseffizienz am Tag 13 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen wurden nach der Größe (FSC-H zu FSC-A), Verhältnis von Granularität (SSC-W) zur Größe (FSC-A) und Nilrotakkumulation (Anzahl der Zellen zur Farbstoffanreicherung) analysiert. P1, P2 und P3 bezeichnen die *gates*, die zur Analyse der Zellpopulation markiert wurden. Links sind die Messdaten der Kontrollgruppe ohne BMP4 dargestellt. Der Versuch wurde dreimal in Doppelbestimmung durchgeführt (N=3, n=2). Exemplarisch ist hier ein Beispiel dargestellt.

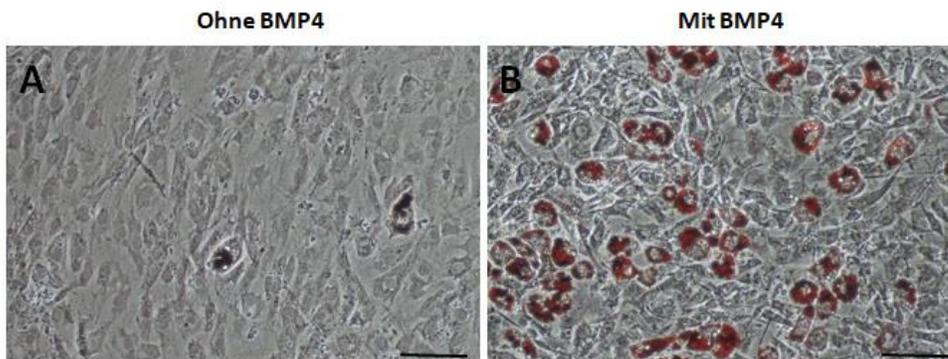


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahme von C3H10T1/2 am Tag 13 der adipogenen Differenzierung, Färbung Ölrot. Der schwarze Balken markiert den Maßstab von 100 μ m. Von jeder Behandlungsgruppe wurden zufällig 10 Bilder fotografiert. Im Bild A sind die Zellen ohne BMP4, in Bild B sind die Zellen mit BMP4 kultiviert worden.

4.4 Einfluss von MGO und GO auf die adipogene Differenzierungseffizienz

Die adipogene Differenzierungseffizienz wurde mithilfe der Durchflusszytometrie am Tag 13, am 6. Tag nach der MGO/GO-Exposition bestimmt. Dafür wurden die C3H10T1/2-Zellen mit Nilrot gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die adipogene Differenzierungseffizienz berechnet sich aus dem Anteil der Nilrot-Akkumulierenden Zellen und der Zellen, die kein Nilrot anreichern.

Sowohl ohne als auch mit dem Einfluss von BMP4 erkennt man die Zunahme der Nilrotfärbung bei der Exposition mit 100 μM MGO und GO in Kombination im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19).

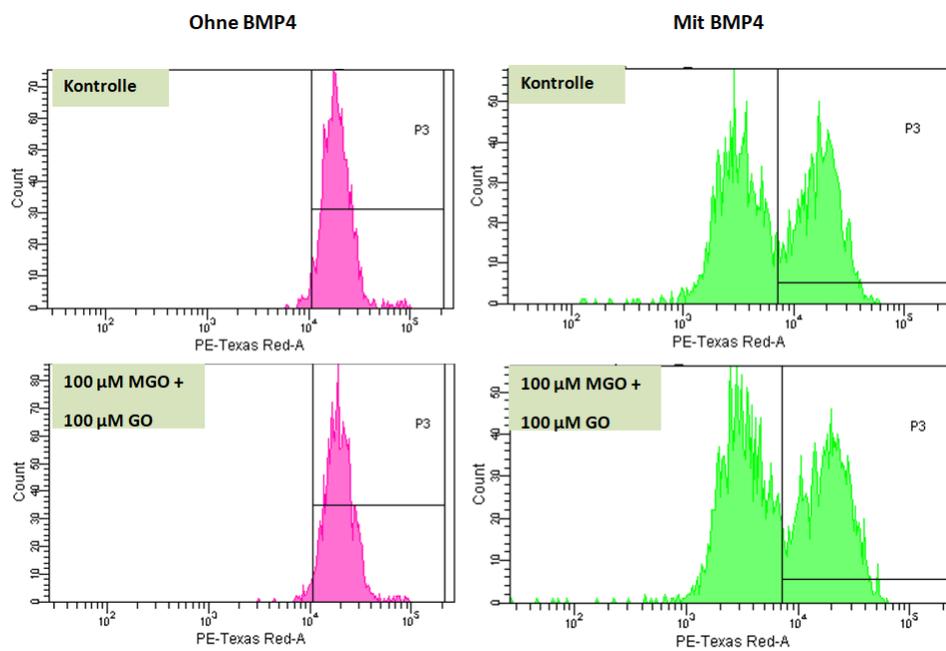


Abbildung 19: Messung der Nilrot Färbung mit der Durchflusszytometrie am Tag 13 des Differenzierungsprotokolls. In den Diagrammen wird die Anzahl der Zellen (*count*) in Abhängigkeit zur Nilrot-Akkumulation (*PE Texas Red-A*) abgebildet. In den Diagrammen auf der linken Seite wird die Nilrot-Färbung der spontanen Adipogenese als Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die mit 100 μM MGO und GO in Kombination behandelt wurde, dargestellt. Auf der rechten Seite wird der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die mit 100 μM MGO und GO in Kombination behandelt wurde, in der induzierten Adipogenese beschrieben. P3 bezeichnet das gesetzte *gate*, das die Zellpopulation zur Analyse der Nilrot-Färbung markiert. Es wurden 3 unabhängige Versuche in Doppelbestimmung (N=3, n=2) durchgeführt.

Bei der Exposition mit 100 μM MGO und GO in Kombination zeigte sich eine Steigerung der Differenzierungseffizienz um $44\% \pm 23,5\%$ im Vergleich zur Kontrolle. Auch bei Zellen, die mit BMP4 stimuliert und dann mit MGO/GO (100 μM) exponiert wurden, zeigte sich eine Erhöhung der adipogenen Differenzierungseffizienz um $17,5\% \pm 9,9\%$ (Abbildung 20).

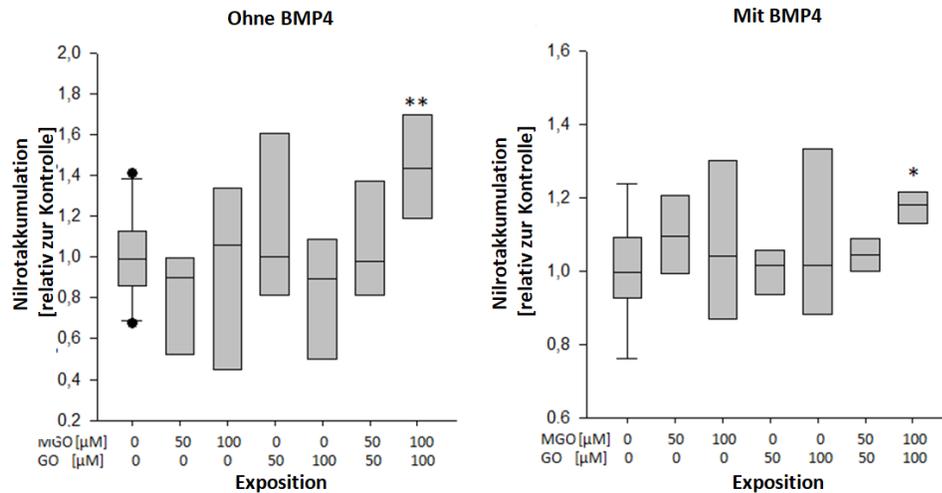


Abbildung 20: Nilrot-Akkumulation nach 72h-Exposition mit MGO und GO gemessen mittels Durchflusszytometrie. In der Grafik wird die mit Durchflusszytometrie gemessene Nilrot-Akkumulation als Mittelwert der einzelnen Behandlungsgruppen relativ zur Kontrolle dargestellt. Sowohl die spontane als auch die induzierte Adipogenese zeigte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Nilrotakkumulation nach der Exposition mit MGO und GO. Normalverteilte statistisch signifikante Ergebnisse sind mit dem Student T-Test berechnet und als * $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$ dargestellt. Die Versuche wurden in 3 unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung durchgeführt (N=3, n=2).

4.5 Einfluss von MGO und GO auf Gene der Adipogenese

Die folgenden molekularbiologischen Methoden wurden an Zellen, die mit BMP4 adipogen induziert wurden, durchgeführt.

4.5.1 Transkription der Markergene der mesenchymalen Zelldeterminierung

Die RNA-Proben der undifferenzierten C3H10T1/2-Zellen wurden am Tag 7 des Differenzierungsprotokolls gewonnen und hinsichtlich der Expression von Markermolekülen der mesenchymalen Determinierung analysiert. Die Exposition der Zellen erfolgte im undifferenzierten Stadium am Tag 4 (d4). Die Markergene der adipogenen Differenzierung Pref1/Dlk1, Wnt10b und Sox9 sowie die Markergene der osteogenen und chondrogenen Differenzierung Runx2 und Col2a1 wurden mittels qRT-PCR quantifiziert. C3H10T1/2-Zellen, die mit 50 μM MGO stimuliert wurden, zeigten eine 1,3fache Steigerung der Wnt10b-RNA-Menge. Bei höheren Konzentrationen und zusammen mit GO war die Abweichung von den Kontrollwerten nicht statistisch signifikant (Abbildung 21).

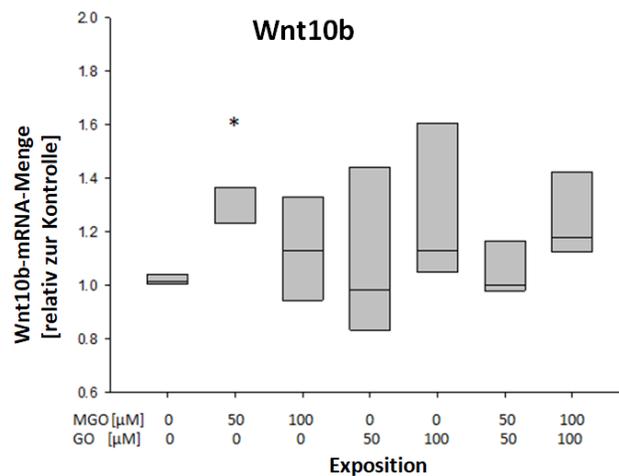


Abbildung 21: Relative Wnt10b-mRNA-Menge nach 72-stündiger Exposition mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 7 (d7). Wnt10b wurde am Tag 7 des Differenzierungsprotokolls mittels qRT-PCR analysiert. Die mRNA-Mengen sind relativ zur Kontrolle und als Mittelwert in den Boxplot-Diagrammen dargestellt. Normalverteilte Signifikanzen sind mit dem Student T-Test als $*p < 0,05$ dargestellt. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt und die Werte in Doppelbestimmung erhoben (N=3, n=2).

Die Faktoren Pref1 und Sox9, die inhibierend auf die Adipogenese wirken, wurden durch die Exposition mit MGO und GO nicht verändert. Für Pref1 lagen alle Mittelwerte niedriger als in den Kontrollgruppen, die Verringerung war nicht statistisch signifikant (Abbildung 22).

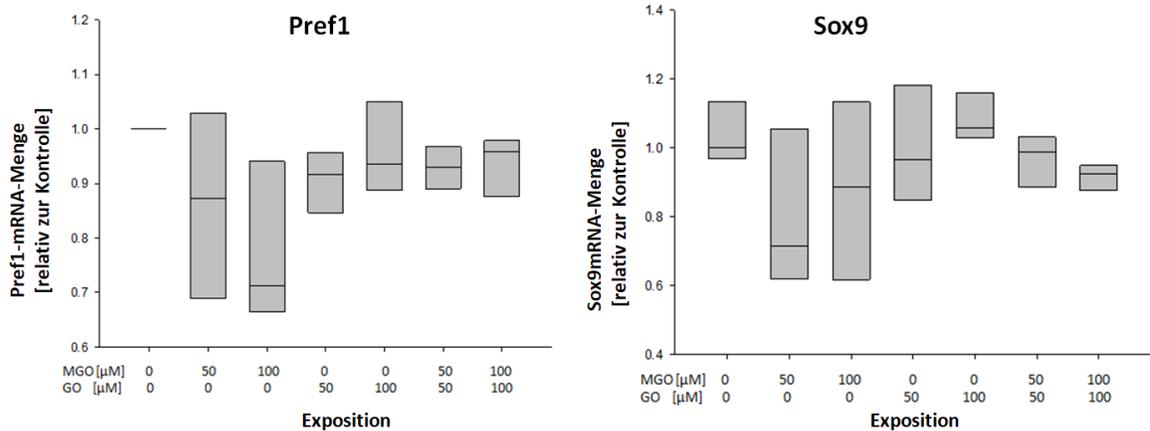


Abbildung 22: Relative Pref1- und Sox9-mRNA-Mengen nach 72-stündiger Exposition mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 7 (d7). Pref1 und Sox9 wurden am Tag 7 des Differenzierungsprotokolls mittels qRT-PCR analysiert. Die mRNA-Mengen sind relativ zur Kontrolle und als Mittelwert in den Boxplot-Diagrammen dargestellt. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt und die Werte in Doppelbestimmung erhoben (N=3, n=2).

Der osteogene Marker Runx2 und der chondrogene Marker Col2a1 wurden durch die MGO- und GO-Exposition unterschiedlich transkribiert. Eine signifikante Verringerung konnte für die Transkriptmenge von Runx2 nach der Exposition mit 100 μM GO auf $89 \% \pm 0,16 \%$ relativ zur Kontrolle gemessen werden. Die Exposition der C3H10T1/2-Zellen mit 100 μM GO bzw. 100 μM MGO und GO in Kombination verringerte die Col2a1-mRNA-Menge auf $86 \% \pm 0,15 \%$ bzw. $70 \% \pm 19,4 \%$ der Kontrolle (Abbildung 23).

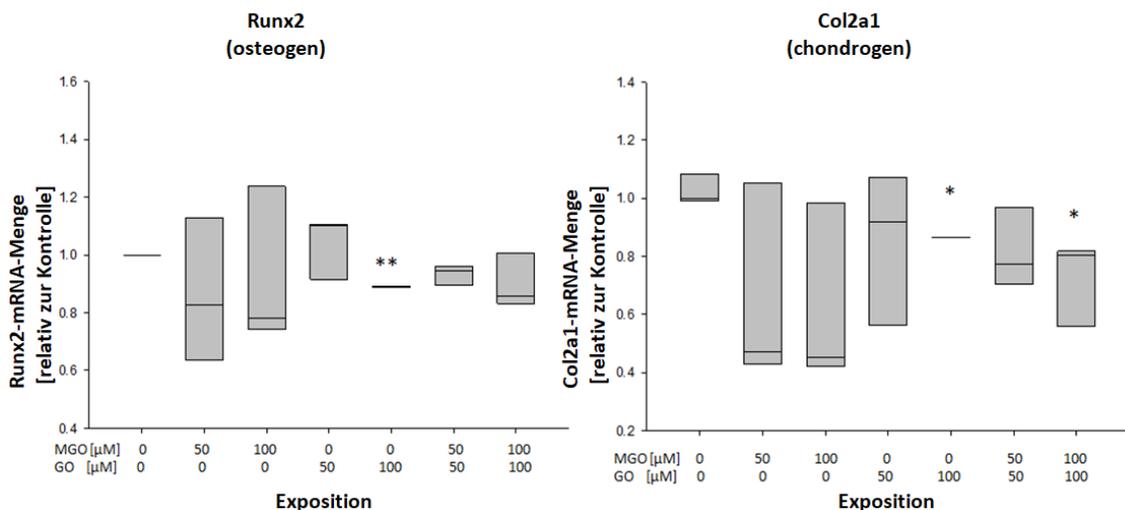


Abbildung 23: Relative Runx2- und Col2a1-mRNA-Mengen nach 72-stündiger Exposition mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 7 (d7). Die relativen mRNA-Mengen von Runx2 und Col2a1 wurden am Tag 7 des Differenzierungsprotokolls nach der Exposition mit MGO und GO mittels qRT-PCR untersucht. Die mRNA-Mengen sind relativ zur Kontrolle und als Mittelwert in den Boxplot-Diagrammen gezeigt. Normalverteilte Signifikanzen sind mit dem Student T-Test als * $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$

dargestellt. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt und die Werte in Doppelbestimmung erhoben (N=3, n=2).

4.5.2 mRNA-Transkription adipogener Markergene der Induktionsphase

Die Transkription der adipogenen Markergene PPAR γ 1 und 2 wurden am Tag 9 (d9) des BMP4-Differenzierungsprotokolls ermittelt. Die Exposition mit MGO und GO hatte keinen statistisch signifikanten Effekt auf die mRNA-Menge von PPAR γ 1. Eine Exposition mit 100 μ M GO führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der PPAR γ 2-mRNA-Menge um 30,3 % \pm 0,08 % im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 24).

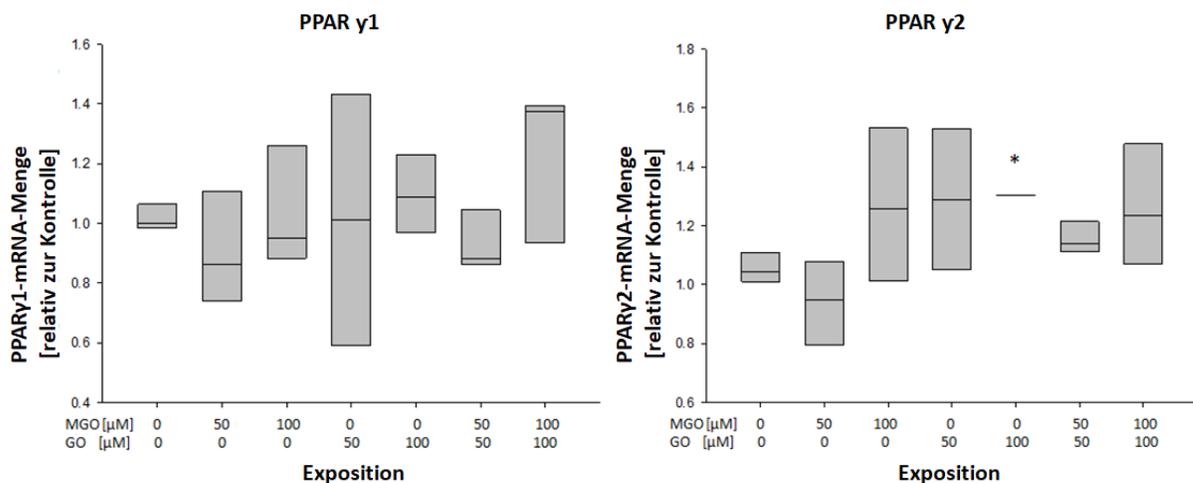


Abbildung 24: Relative PPAR γ 1- und PPAR γ 2-mRNA-Mengen nach 72-stündiger Exposition mit MGO und GO (d4-7) in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 9 (d9). Die Proteinmengen der adipogenen Differenzierungsmarker PPAR γ 1 und 2 wurde am Tag 9 des Differenzierungsprotokolls mittels qRT-PCR ermittelt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert relativ zur Kontrolle dargestellt. Normalverteilte Ergebnisse wurden mittels Student T-Test als * $p < 0,05$ dargestellt. Es wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Alle Messdaten wurden in Doppelbestimmung erhoben (N=3, n=2).

4.5.3 Protein-Expressionsprofil in der Induktionsphase

Für die Analyse des Proteinexpressionsmusters am Tag 9 des Differenzierungsprotokolls wurden PPAR γ 1 und PPAR γ 2 bestimmt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied durch die Exposition mit MGO und GO im Vergleich zur Kontrolle. Die Proteinmenge von PPAR γ 2 konnte nur schwach detektiert werden, trotzdem zeigte sich ein Anstieg der Proteinmenge nach der Exposition mit 100 μ M MGO und GO, der das Signifikanzniveau jedoch nicht erreichte (Abbildung 25).

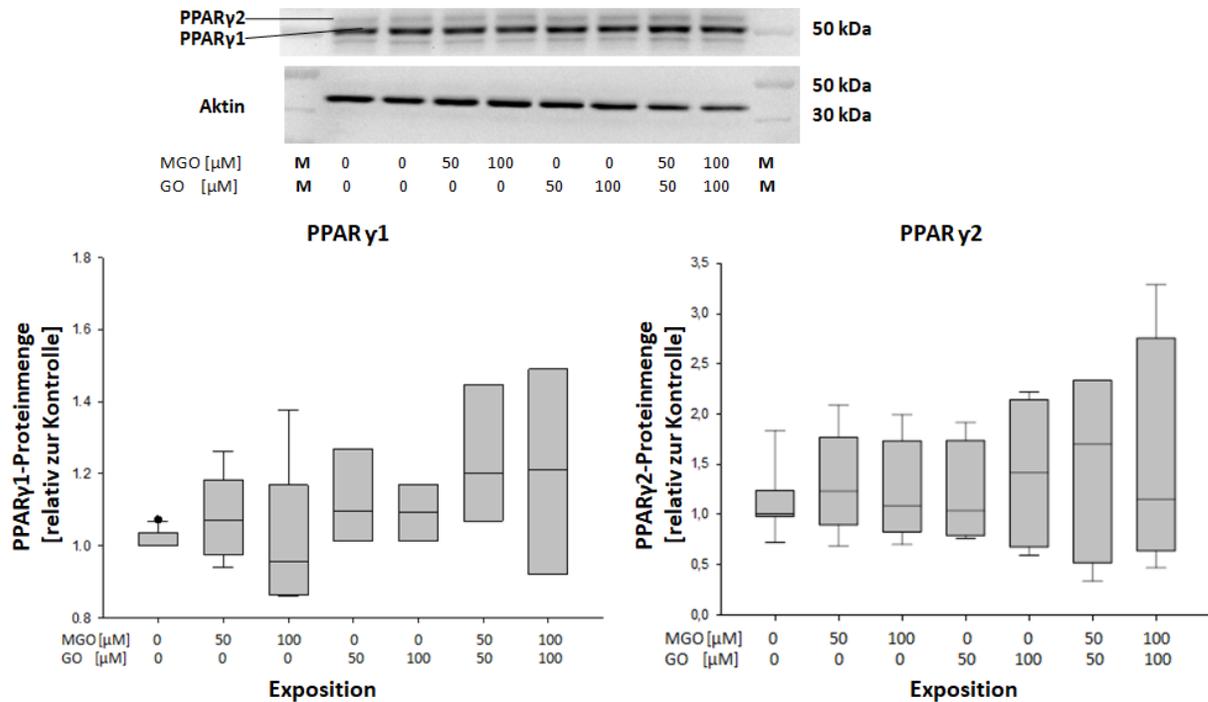


Abbildung 25: Relative PPAR γ 1- und PPAR γ 2-Proteinmengen nach 72-stündiger Exposition mit MGO und GO (d4-7) in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 9 (d9). Der Nachweis von PPAR γ 1 und 2 erfolgte mit Western Blot und anschließender densitometrischer Auswertung der relativen Proteinmenge nach Abgleich gegen β -Aktin am Tag 9 der Differenzierung. In den Boxplot-Diagrammen ist die relative Proteinmenge des adipogenen Differenzierungsmarkers PPAR γ 1 als Mittelwert dargestellt. Es wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Alle Messdaten wurden in Doppelbestimmung erhoben (N=3, n=2).

4.5.4 Expression adipogener Markergene in der terminalen Differenzierung

Die adipogenen Markergene PPAR γ 1, PPAR γ 2 und FABP4 wurden am Tag 13 des Differenzierungsprotokolls gemessen. Der Differenzierungstag 13 entspricht der terminalen Differenzierungsphase von C3H10T1/2 (Siehe Kapitel 3.2.7). Die PPAR γ 2-mRNA-Menge war in exponierten Zellen statistisch signifikant verringert, während PPAR γ 1 unverändert blieb (Abbildung 26).

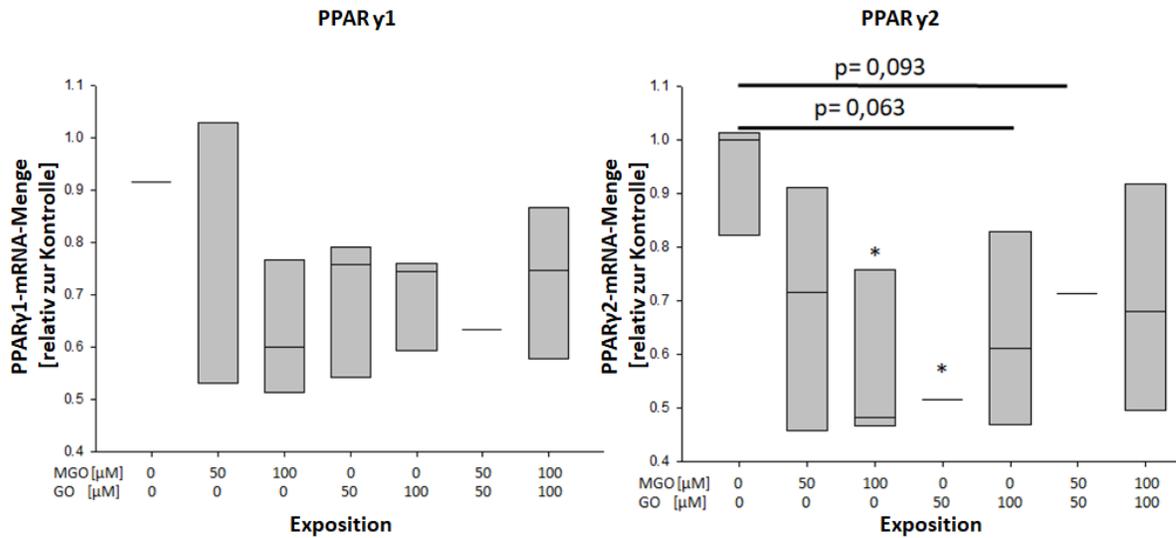


Abbildung 26: Relative PPAR γ 1- und PPAR γ 2-mRNA-Mengen nach 72-stündiger Exposition (d4-d7) mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2. Die Boxplot-Diagramme zeigen die mRNA-Menge der adipogenen Markergene PPAR γ 1 und 2 am Tag 13 des Differenzierungsprotokolls nach einer 72-stündigen Exposition mit MGO und GO gemessen mittels qRT-PCR. Die Ergebnisse stellen sich als Mittelwert relativ zur Kontrolle dar. Normalverteilte statistisch signifikante Werte wurden mit dem Student T-Test als * $p < 0,05$ dargestellt. Es wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Alle Daten wurden als Doppelbestimmung erhoben (N=2, n=3).

Die mRNA-Menge von FABP4 war in fast allen Behandlungsgruppen verringert. Bei 100 μ M MGO wurde eine Reduktion der FABP4-Transkriptmenge auf 58 % \pm 17 % gemessen (Abbildung 27).

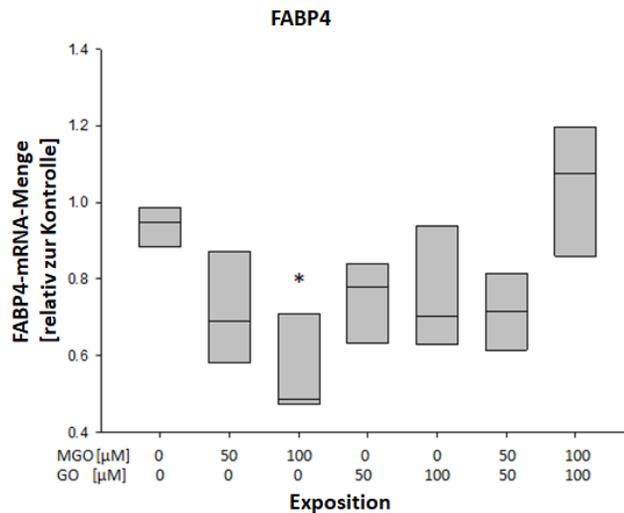


Abbildung 27: Relative FABP4-mRNA-Menge nach 72-stündiger Exposition (d4-7) mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 13 (d13). Die Boxplot-Diagramme zeigen die mRNA-Menge von FABP4 am Tag 13 nach einer 72-stündigen Exposition mit MGO und GO. Die Ergebnisse stellen sich als Mittelwert relativ zur Kontrolle dar. Normalverteilte statistisch signifikante Werte wurden mit dem Student T-Test als * $p < 0,05$ dargestellt. Es wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Alle Daten wurden als Doppelbestimmung erhoben (N=2, n=3).

4.5.5 Proteinmenge der adipogenen Markergene in der terminalen Differenzierung

Die Exposition mit 100 μM MGO und GO führte zu einer Verringerung der Proteinexpression des Transkriptionsmarkers PPAR γ 2 auf $69,1 \pm 15 \%$ (Abbildung 28).

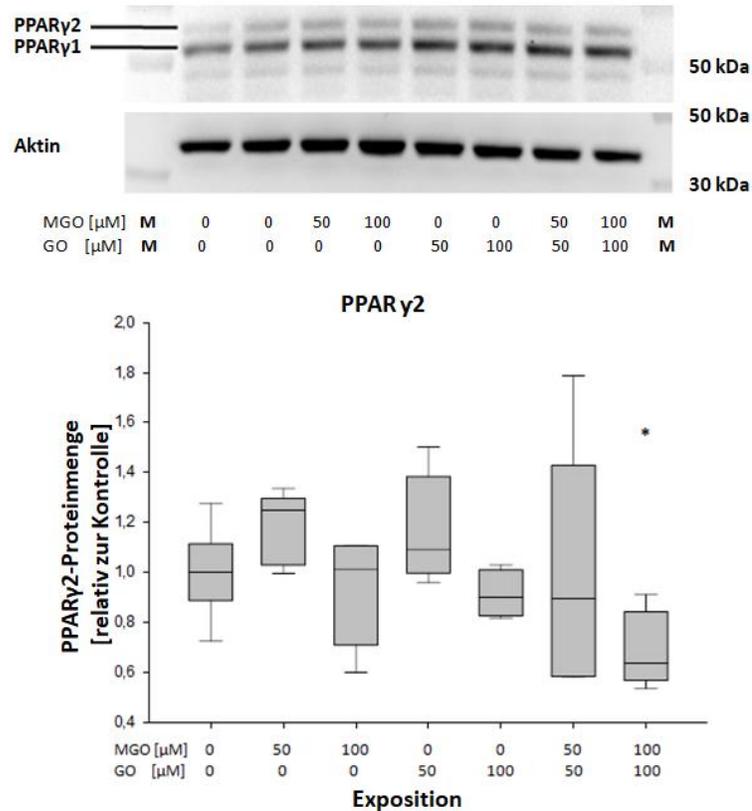


Abbildung 28: Relative PPAR γ 2-Proteinmenge nach 72-stündiger Exposition (d4-7) mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 13. Der Nachweis von PPAR γ 2 erfolgte mit Western Blot und anschließender densitometrischer Auswertung der relativen Proteinmenge nach Abgleich gegen β -Aktin am Tag 13 (d13). In den Boxplot-Diagrammen ist die Proteinmenge als Mittelwert dargestellt. Normalverteilte statistisch signifikante Werte wurden mittels Student T-Test als $*p < 0,05$ ermittelt. Es wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Alle Messdaten wurden in Doppelbestimmung erhoben (N=3, n=2).

Die Exposition der MSC mit MGO und GO zeigte auf die PPAR γ 1- und FABP4-Proteinexpression keinen signifikanten Einfluss (Abbildung 29).

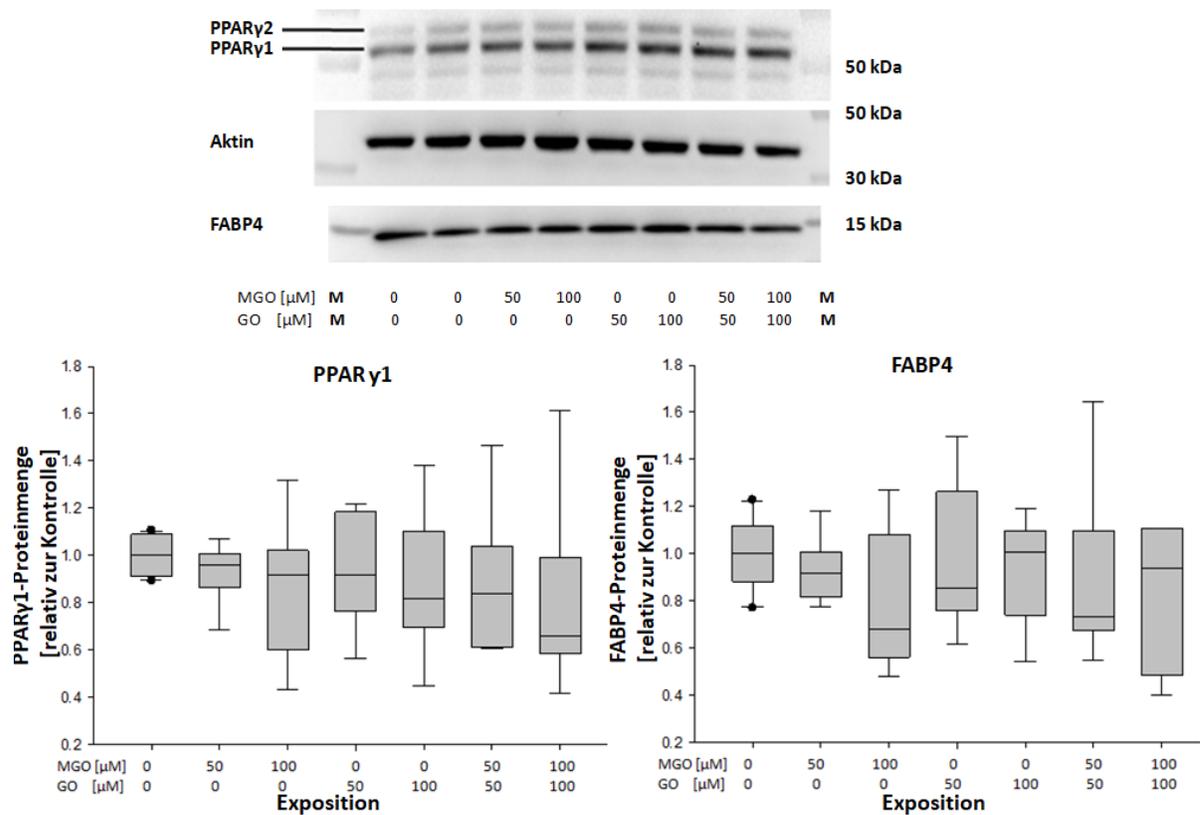


Abbildung 29: Relative PPAR γ 1- und FABP4-Proteinmengen nach 72-stündiger Exposition (d4-7) mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 13. Der Nachweis von PPAR γ 1 und FABP4 erfolgte mit Western Blot und anschließender densitometrischer Auswertung der relativen Proteinmenge am Tag 13 (d13) nach Abgleich gegen β -Aktin. In den Boxplot-Diagrammen ist die Proteinmenge als Mittelwert dargestellt. Es wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Alle Messdaten wurden in Doppelbestimmung erhoben (N=3, n=2).

5. Diskussion

Die Adipositasprävention rückt in den Fokus des Gesundheitssystems. Neben den bekannten ernährungsphysiologischen Ursachen wird nach weiteren wissenschaftlichen Erklärungen für das „Massenphänomen“ Adipositas gesucht. Seit der Entwicklung der DOHaD (*Developmental Origins of Health and Disease*)-Hypothese durch Barker (Barker 2007) wird auch die metabolische Prägung in der Fetalentwicklung als eine Ursache für die Entstehung der Adipositas im Alter betrachtet (Gluckman et al. 2016). Die Hypothese von DOHaD beschäftigt sich mit dem Einfluss der mütterlichen Stoffwechsellage auf den Embryo bzw. den Fötus und geht von einer metabolischen Prägung des Kindes während der uterinen und der frühen postnatalen Entwicklungszeit aus (Tomar et al. 2015). Der Metabolismus der Mutter ist eng mit dem des Embryos und Fötus verbunden. Eine hyperglykämische Stoffwechsellage der Mutter erhöht das Risiko für makrosome Neugeborene (Boyle et al. 2016). In einer Studie des Deutschen Ärzteblattes International konnte in einer Kohorte von 567191 schwangeren Frauen bei 13,2 % Gestationsdiabetes nachgewiesen werden (Eades et al. 2017; Melchior et al. 2017). Die Prävalenz des Schwangerschaftsdiabetes stieg mit zunehmendem Alter von weniger als 8 % bis über 26 % (Alter \geq 45 Jahre) (Melchior et al. 2017).

Die Plazenta ist das Organ, das die Ernährung des Embryos über den mütterlichen Blutkreislauf ermöglicht (Gude et al. 2004). Nach der vollständigen Ausbildung der Plazenta werden Glukose und Glukosemetabolite wie MGO plazentar übertragen, Insulin jedoch nicht (Yang et al. 2016). Eine Hyperglykämie der Mutter steigert die Insulinsekretion des Kindes pathophysiologisch. Der fetale Hyperinsulinismus und ein hohes Glukoseangebot können zu Makrosomie, neonataler Hypoglykämie, Hypokalzämie, Polyglobulie, Hyperbilirubinämie und zum Atemnotsyndrom führen. Im schlimmsten Fall droht ein intrauteriner Fruchttod (Harrisons Innere Medizin).

Bei einem Gestationsdiabetes sind neben der Blutglukosekonzentration weitere Metabolite im Blutplasma verändert. Dazu gehören auch die reaktionsfreudigen Dicarbonyle MGO und GO, die bei Diabetikern 2-3fach erhöht sind (Thornalley et al. 1999; Lapolla et al. 2003). Diese Arbeit untersucht den Einfluss von MGO und GO auf die metabolische Prägung von MSC und potentielle Konsequenzen auf die Adipogenese. Es konnten erstmalig direkte Effekte von MGO und GO auf die zelluläre Seneszenz und die adipogene Differenzierung der multipotenten mesenchymalen Stammzelllinie C3H10T1/2 in vitro nachgewiesen werden. Bereits eine 72-stündige Exposition von C3H10T1/2-Zellen mit MGO und GO induziert konzentrationsabhängig die Bildung von AGEs und führt zu einer gesteigerten zellulären Seneszenz. Gleichzeitig weisen MGO und GO exponierte mesenchymale Stammzellen eine signifikante Erhöhung der adipogenen Differenzierungseffizienz

und eine Reduktion der PPAR γ 2-Proteinexpression auf. Die mRNA-Menge von Col2a1, einem Strukturprotein chondrogener Zellen, wurde ebenfalls verringert nachgewiesen werden. Der Einfluss von MGO und GO auf die mRNA-Menge anderer Transkriptionsfaktoren- wie Runx2 und Sox9- zeigte sich lediglich in den Zellen ohne eine signifikante p21-Expressionsveränderung oder ließ sich nur tendenziell ohne statistische Signifikanz nachvollziehen.

5.1 MGO und GO induzieren Seneszenz und regulieren den Zellzyklus in MSC

Da die aktuelle Literatur keine Hinweise gibt, in welchen Konzentrationen sich MGO und GO im Fötus anreichern, wurde ein Expositionsversuch durchgeführt, der zum Ziel hatte geeignete Konzentrationen auszuwählen. In einer Studie von Navarrete Santos und Koautoren zeigten sich die ersten Effekte von MGO und GO auf die Endothelzellen HVECs (*human vascular endothelial cells*) bei der Exposition mit 100 μ M MGO und GO (Navarrete Santos et al. 2017).

Die weiteren Konzentrationen wurden auf 50 μ M und 250 μ M MGO und GO festgesetzt. Dabei zeigte sich ein toxischer Einfluss auf die MSC bei der Exposition mit 250 μ M MGO und GO in Kombination. Da für den Differenzierungsversuch ein konfluenter Zellverband nötig ist, wurde die toxische Konzentration aus dem Differenzierungsversuch ausgeschlossen. Da in den verwendeten Medien Fetales Kalbserum (FKS) enthalten war, wurde das Medium in der Zeit der Exposition nicht gewechselt und die jeweiligen Konzentrationen von MGO und GO täglich hinzugegeben. FKS ist sehr proteinreich, wodurch MGO und GO verstärkt eine AGE-Anreicherung im Medium und weniger der AGE-Bildung in den Stammzellen bewirkt hätten.

Eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob MGO und GO bei MSC eine zelluläre Seneszenz induzieren. Seneszenten Zellen sind durch einen Zellarrest, Telomerdysfunktion, direkte DNA-Schäden, onkogene Aktivierung und oxidativen Stress gekennzeichnet (Matjusaitis et al. 2016). Der Eintritt der seneszenten Zelle in den Zellzyklusarrest wird von verschiedenen Zellzyklusinhibitoren reguliert. Dazu gehören p16, p21 und p53 (Matjusaitis et al. 2016). Der Tumorsuppressor und Seneszenzmarker p21 hat vielfältige Funktionen im Zellzyklus und auch Einfluss auf die Tumorzellbiologie (Romanov und Rudolph 2016). Das Protein ist ein cyclinabhängiger Kinasehemmer, der die pRB(Retinoblastomprotein)-Dephosphorylierung beeinflusst (Matjusaitis et al. 2016). Die Entwicklung zwischen der S- und der G1-Phase des Zellzyklus wird von p21 reguliert (Navarrete Santos et al. 2017). Der Seneszenzmarker p21 wird bei DNA-Schäden induziert und verhindert die Replikation bis zur Reparatur der Schäden (Arand 2009). Der Cdk-(*cyclin dependent kinase*)-Inhibitor hemmt dabei den Eintritt in die S-Phase durch die Phosphorylierung von pRB. Die

p21-Überexpression fördert die zelluläre Seneszenz durch Steuerung der β -Galactosidase-Aktivität, Telomerverkürzung und DNA-Schäden (Matjusaitis et al. 2016). Es konnte nachgewiesen werden, dass bei der Herunterregulation von p21 die replikative Kapazität wiederhergestellt werden konnte (Schnabl et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Exposition von MSC mit MGO und GO zu einer erhöhten Bildung der AGEs CML und MG-H1 in den Zellen führt und p21 als Seneszenzmarker induziert (Abbildung 30).

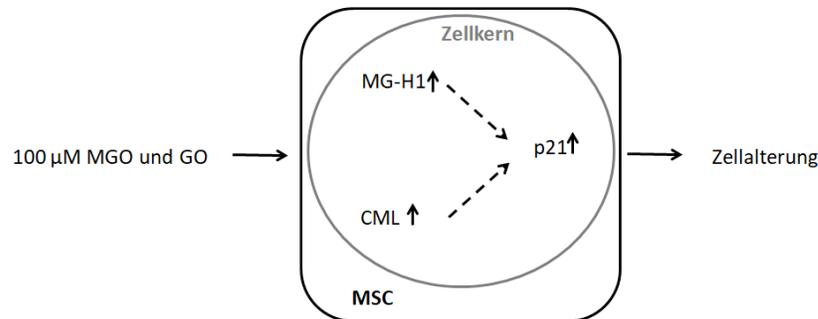


Abbildung 30: Postulierter Mechanismus der Bildung von AGEs und der Induktion von zellulärer Seneszenz in Mesenchymalen Stammzellen (MSC).

In einer chemischen Reaktion bilden MGO und GO mit freien oder Protein-gebundenen Aminosäuren *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs). Die Reaktion von MGO mit Arginin führt zur Bildung von Methylglyoxal-abgeleitetem N δ -(5-Hydro-5-methyl-4-imidazol-2-yl)-Ornithin (MG-H1) und Glyoxal mit Lysin führt zur Bildung von N ϵ -(1-Carboxymethyl)-lysin (CML). Diese AGEs können zu irreversiblen Quervernetzungen von Proteinen z.B. Histonen und zur Inaktivierung von Enzymen der DNA-Reparatur führen. Infolgedessen kommt es zu DNA-Schäden und der (p53-abhängigen) Induktion des *Cyclin dependent kinase inhibitors* p21 (p21). Die Funktion von p21 beruht auf der Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Tumorsuppressors pRB. Das niedrige Phosphorylierungsniveau der pRB-ähnlichen p130- und p107-Proteine löst die Bildung des DREAM (DP, RB-like, E2F4 und MuvB)-Proteinkomplexes aus (Fischer et al. 2016). Dieser fungiert als transkriptioneller Repressor in der G0- und G1-Phase. Daher kann p21 bei vermehrter Expression den Zellzyklus inhibieren und Zellen in der G1-Phase arretieren. Der p53-p21-DREAM-Weg steuert durch die Umschaltung der Proteinbindung an den zellzyklusabhängigen Elementen (CDE) und der Zellzyklusgen-Homologregion (CHR) die transkriptionelle Herabregulation. Insgesamt konnten ungefähr 210 Gene nachgewiesen werden, die höchstwahrscheinlich durch den p53-p21-DREAM-CDE/CHR-Signalweg reguliert werden (Fischer et al. 2016). Dazu gehören die Fox-Proteine, die vielfältige Funktionen in der Zellzyklusregulation, im Metabolismus und im Alterungsprozess übernehmen (Sengupta et al. 2013).

Nach der Exposition mit 100 μ M MGO und GO zeigten die C3H10T1/2-Zellen eine erhöhte p21-Expression bei 9,1 % \pm 6,8 %. Bei gleichzeitiger Analyse des Zellzyklus zeigten sich jedoch keine signifikanten Veränderungen. Daraus lässt sich schließen, dass ca. 10 % der Zellen seneszent waren und sich damit im Zellzyklusarrest befanden, der Ablauf des Zellzyklus jedoch nicht signifikant inhibiert wurde.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in der Studie von Navarrete Santos und Koautoren (Navarrete Santos et al. 2017), in der die Wirkung von MGO und GO auf HVECs untersucht wurde. Die Endothelzellen wurden mit Konzentrationen von 50- 300 μM MGO und GO einzeln und in Kombination über 72 h stimuliert. Konzentrationsabhängig bildeten sich die AGEs CML und MG-H1 und die Expression des Seneszenzmarkers p21 wurde erhöht. Dabei wirkten vor allem Konzentrationen von 150 μM und 300 μM MGO und GO Seneszenz-stimulierend, während Konzentrationen unter 100 μM MGO und GO die Zellen bei einer Exposition für 72 h nicht beeinflussten (Navarrete Santos et al. 2017). Anders als bei Navarrete Santos und Koautoren wurde in der vorliegenden Studie als maximale Konzentration 100 μM (vs. 300 μM bei Navarrete und Koautoren) gewählt. Während in HVECs die p21-Expression erst bei einer alleinigen Exposition mit 150 μM GO induziert wurde, zeigte sich bei den C3H10T1/2-Zellen eine Steigerung von p21 bereits bei 50 μM GO (Navarrete Santos et al. 2017). Das spricht für die erhöhte Sensitivität in C3H10T1/2-Zellen. So wurde bereits von Lee et al. im Zusammenhang mit anderen toxischen Substanzen beschrieben, dass Stammzellen sensibler auf Noxen reagieren als terminal differenzierte somatische Zellen (Lee et al. 2018).

Die Wirkung von MGO und GO auf die Zellalterung wurde in einer Studie von Sejersen und Rattan an der Zelllinie AFS-2, humanen adulten Hautfibroblasten, beleuchtet (Sejersen und Rattan 2009). Die Exposition der Zellen mit 1 mM GO oder 400 μM MGO induzierte ein vorzeitiges Altern und einen seneszenten Phänotyp. Die Zellen entwickelten eine entsprechende Zellmorphologie und einen irreversiblen Wachstumsarrest sowie eine erhöhte SABG(*senescence associated β -galactosidase*, seneszenzassoziierter β -Galaktosidase)-Aktivität. Es wurden erhöhte H_2O_2 -Level, eine reaktive Sauerstoffspezies (ROS), und Modifikationen von Proteinen festgestellt. MGO und GO induzieren DNA-Schäden, die zu einem G2-Wachstumsarrest führen. Der Hauptgrund für den G2-Wachstumsarrest liegt wahrscheinlich in den Telomer-unabhängigen Proteinschäden des Zytoskeletts (Sejersen und Rattan 2009). Die Erhöhung von H_2O_2 wurde damit begründet, dass MGO und GO die Elektronentransportkette in den Mitochondrien durch direkte Modifizierung der Komplexe I und III inhibieren können. Die Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette führt zur vermehrten Ansammlung von ROS in der Zelle. Der Anstieg von ROS korreliert mit dem GSH(Gluthathion)-Abbau. GO inhibiert die GSH-Reduktase, reduziert die GSH-Menge in Zellen und damit die GO- und MGO-Detoxifizierung in Zellen durch das zytosolische Glyoxalase-System. Die Bildung von CML und anderen AGEs sind molekulare Marker für das zelluläre Altern. Sie akkumulieren während des physiologischen Alterns in vivo. Während MGO in einer erhöhten Aktivität der Katalase und der Superoxiddismutase als Zeichen für oxidativen Stress resultierte, zeigte sich keine

Veränderung dieser Enzyme in der Behandlung mit GO. Sejersen und Rattan et al. entwickelten ein molekulares Modell für die stressinduzierte zelluläre Alterung, in dem die Wirkung der hochreaktiven Dicarbonyle MGO und GO gezeigt wird. Die SABG stellt einen Seneszenzmarker dar, der nicht spezifisch für seneszente Zellen ist sondern auch in ruhenden Zellen vorkommt (Yang und Hu 2005), die jedoch den seneszenzinduzierenden Mechanismus von MGO und GO bei gleichzeitiger Bestimmung von p21 hätte bestätigen können. Für die Marker von Seneszenz gibt es aktuell noch keinen Goldstandard (Dodig et al. 2019).

Die Expression von p21 und p16 (einem weiteren Seneszenzmarker) kann zu einem *senescence-associated secretory phenotype* (SASP) führen. Der Phänotyp führt zur Sezernation von Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Zytokinen, Proteasen und extrazelluläre Matrixkomponenten, bevor die Zelle in die „tiefe Seneszenz“ eingeht. Eine erhöhte p21-Expression führt zu einem Zellzyklusarrest, der eine Voraussetzung für die terminale Differenzierung und Seneszenz ist. Dabei werden sowohl positive als auch negative Funktionen des p21 in der Differenzierung diskutiert (Kreis et al. 2019). Diese widersprüchliche Funktion des p21 zeigt sich insbesondere in der murinen Adipozytendifferenzierung. Eine verringerte Expression von p21 führt in 3T3-L1-Zellen zur verminderten Differenzierung zu Adipozyten. Im Gegensatz dazu weisen Mäuse ohne eine p21-Expression eine Adipozytenhyperplasie und Adipositas auf (Kreis et al. 2019). Die Lokalisation entscheidet über die Funktion von p21. Murines stabilisiertes nukleäres p21 hemmt durch Phosphorylierung an Thr-55 die murine Protein-Serin-Threonin-Kinase 38 (MPK38) und die Adipozytendifferenzierung. Die zytoplasmatische Lokalisation von p21 führte in reifen menschlichen Monozyten und Rattenneuronen zur Hemmung der Apoptose, bei der murinen Myoblastendifferenzierung korrelierte die Apoptoseresistenz mit der Phosphorylierung an Ser-153. Neben der Zellmikroumgebung hatten auch das Expressionsniveau, die Postmodifikation, der Zelltyp und das Differenzierungsstadium Einfluss auf die Funktion von p21 (Kreis et al. 2019). Die ambivalente Funktion des p21 in murinen Präadipozytenlinien ist bereits beschrieben, in murinen mesenchymalen Stammzellen ist die Funktion von p21 noch unklar (Kreis et al. 2019).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse von p21 nach der Permeabilisierung der Zell- und Kernmembran, so dass die Zellmikroumgebung nicht berücksichtigt werden kann. Als alternative Methode zur genauen Lokalisation des p21 im Zellkompartiment besteht die Möglichkeit einer immunhistochemischen Färbung und Detektion durch die Fluoreszenzmikroskopie (Herrmann et al. 2020).

5.1.1 BMP4 und das Glyoxalasesystem modulieren die Wirkung von MGO und GO

Im Zellmodell der induzierten Adipogenese (Kultur von C3H10T1/2 mit BMP4) waren die Zellen weniger empfindlich und stressresistenter. Die AGE-Bildung und p21-Induktion in C3H10T1/2-Zellen fiel geringer aus. Insbesondere bei der Messung der CML-Modifikation bei der Exposition mit 100 µM MGO und GO zeigten die Zellen eine höhere Resilienz. BMP4 ist ein Protein, das zur Wachstumsfaktorfamilie TGFβ gehört und sowohl in dem murinen als auch im humanen Genom auf dem Chromosom 14 lokalisiert ist (Modica und Wolfrum 2017). BMP4 wird in embryonalem und in adultem Gewebe wie dem Gehirn und der Niere exprimiert (Modica und Wolfrum 2017). BMP4 forciert die Differenzierung von MSC in die adipogene Zelllinie, in dem es die Dissoziation eines intrazellulären Komplexes vermittelt (Gustafson et al. 2015). Dieser Komplex besteht aus dem PPARγ-Transkriptionsaktivator Zinkfingerprotein-423 (ZNF423) und dem kanonischen WNT1-induzierbaren Signalwegprotein-2 (WISP2). Die Dissoziation ermöglicht den Eintritt von ZNF423 in den Zellkern und die PPARγ-Induktion, so dass die Adipogenese induziert wird (Gustafson et al. 2015).

Neben der Induktion der Adipogenese wurde die autokrine und parakrine Funktion von BMP4 in der Selbsterneuerung der Zelle diskutiert (Modica und Wolfrum 2017). So konnte gezeigt werden, dass durch die Expression von BMP4 die mitochondriale Biogenese induziert wurde, woraus ein verbesserter Sauerstoffverbrauch des Organismus resultierte (Qian et al. 2013). In Bezug auf diese Arbeit könnte dies die geringere Bildung von CML und p21 durch Verringerung des Dicarboxylstresses erklären. Die fundierte Bewertung der Wirkung von BMP4 benötigt jedoch weitere Analysen.

Eine Reduktion des Dicarboxylstress kann auch durch eine GLO1-Überexpression erreicht werden (Masania et al. 2016). Das Glyoxalasesystem spielt in der Embryogenese und Zellreifung bis hin zum Zelltod eine wichtige Rolle in der Detoxifizierung von den hochreaktiven Dicarboxylen MGO und GO (Thornalley 1990). Die Studie von Yang beschäftigte sich mit dem Einfluss des metabolischen Status auf die Stammzellbiologie insbesondere der NPC (*neural precursor cells*, neuronale Vorgängerzellen) (Yang et al. 2016). Basierend auf den Beobachtungen, dass sich neurologische Krankheiten des Kindes vermehrt bei Müttern mit Gestationsdiabetes finden, wurde der Einfluss der Hyperglykämie und der damit verbundenen erhöhten Produktion von MGO untersucht. Dabei ist der pathogenetische Mechanismus auf die intrazelluläre Aufnahme des MGO und die damit verbundene Überforderung des detoxifizierenden GLO1 zurückgeführt worden (Yang et al. 2016). In der Studie konnte gezeigt werden, dass GLO1 insbesondere in der undifferenzierten Wachs-

tumsphase eine sehr wichtige Rolle spielt. Durch die Applikation von 500 µg/kg MGO 2x pro Tag in das Peritoneum von schwangeren Mäusen konnten erhöhte Level von MGO und erniedrigte Level von GLO1 gemessen werden, die in vorzeitiger „Alterung“ der Neurogenese und Verringerung von embryonalen NPCs resultierte (Yang et al. 2016). Die Exposition mit MGO führte zur Reduzierung der Zellzahl von adulten NPCs und der Neurogenese, Störung der kortikalen Neuronen und veränderten Verhalten der Zellen (Yang et al. 2016). In der vorliegenden Studie ließ sich eine im Vergleich zu terminal differenzierten adulten Zellen empfindlichere Reaktion der d4-MSC auf die Exposition mit MGO und GO beobachten (Navarrete Santos et al. 2017; Rosenstock et al. 2019). Die Auslastung des GLO1-Systems könnte in den C3H10T1/2-Zellen die Ursache für die erhöhte Sensitivität im undifferenzierten Stadium sein. Das Glyoxalasesystem ist auch im Menschen vulnerabel und kann von verschiedenen Faktoren wie Adipositas, Insulinresistenz und Altern beeinflusst werden (Masania et al. 2016; Xue et al. 2011; Rabbani und Thornalley 2018).

5.2 MGO und GO verändern die Differenzierungsvorgänge in MSC

Sowohl in adulten Zellen als auch in embryonalen Zellen konnte eine Veränderung der Zellfunktion durch MGO und GO nachgewiesen werden (Rosenstock et al. 2019; Navarrete Santos et al. 2017; Yang et al. 2016). Insbesondere die Veränderung des Phänotyps und der Zelldifferenzierung und –funktion von embryonalen neuronalen Zellen durch MGO zeigt, wie vulnerabel Stammzellen auf Dicarbonylstress reagieren (Yang et al. 2016).

In dieser Studie konnte nach der 72-stündigen Exposition mit 100 µM MGO und GO und der zeitgleichen einmaligen Gabe von BMP4 eine Steigerung der adipogenen Differenzierungseffizienz in MSC gezeigt werden. Dabei weist eine Konzentration von 100 µM MGO und GO den stärksten Effekt auf. Die Steigerung der Differenzierungseffizienz beruht wahrscheinlich auf einer Hypertrophie der Adipozyten bedingt durch größere Lipidvesikel, denn die Zellen zeigten eine höhere Granularität. Nicht verändert waren die Anzahl der Fettzellen oder die der Lipidvesikel pro Zelle. Für die Wirkung von MGO und GO auf MSC finden sich in der aktuellen Literatur kaum vergleichbare Studien, was die Relevanz der vorliegenden Studie hervorhebt. In der Studie von Yang zeigte sich, dass MGO zu einer vorzeitigen Differenzierung und einer daraus resultierenden Veränderung der Zellfunktion von NPCs führte und damit Einfluss auf embryonale Stammzellen hat (Yang et al. 2016).

Biemann et al. beschäftigten sich mit dem Einfluss von potentiell obesogenen Metaboliten auf die MSC-Linie C3H10T1/2 (Biemann et al. 2012). Dabei wurden die Zellen mit verschiedenen Konzent-

rationen von den endokrinen Disruptoren BPA (Bisphenol A), DEHP (bis(2-Ethylhexyl-)Phthalat) und TBT (Tributylzinn) exponiert. BPA, DEHP und TBT beeinflussten die adipogene Differenzierung der MSC konzentrations-, zusammensetzungs- und stadienspezifisch (Biemann et al. 2012). Die C3H10T1/2-Zellen sind anders als andere Stammzelllinien noch keiner Differenzierungslinie zugeordnet und können dadurch in verschiedene Zelllinien differenzieren. Des Weiteren kann man die verschiedenen ontogenetischen Phasen der Differenzierung wie die Determination und terminale Differenzierung betrachten (Biemann et al. 2012). Die Exposition der MSC mit BPA führte zur Verringerung der adipogenen Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu steigerte DEHP durch die Beeinflussung des PPAR-Signalwegs die adipogene Differenzierung der C3H10 (Biemann et al. 2012). TBT steigerte die adipogene Differenzierung in der Studie von Biemann in den MSC am stärksten. Die Effekte von TBT waren über den PPAR γ -Signalweg vermittelt (Biemann et al. 2012). Eine Exposition mit TBT erhöhte die Expression von adipogenen Differenzierungsmarkern und verringerte die der osteogenen Differenzierung (Biemann et al. 2012).

Biemann et al beschrieben den zugrundeliegenden Mechanismus für die Erhöhung der adipogenen Differenzierungseffizienz durch endokrine Disruptoren (Biemann et al. 2014a). Dabei berücksichtigten die Autoren genau wie in der vorliegenden Arbeit die Besonderheiten der verschiedenen Stadien der mesenchymalen Stammzelldifferenzierung in C3H10T1/2. Der folgende Abschnitt vergleicht die Ergebnisse der Untersuchung von Biemann et al. mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Abhängigkeit von den Differenzierungsphasen.

5.2.1 Der obesogene Effekt von MGO und GO wird nicht über Gene des undifferenzierten Wachstums vermittelt

Als Gene des undifferenzierten Wachstums wurden in dieser Studie Wnt10b, Pref1/Dlk1, Runx2, Col2a1 und Sox9 betrachtet. Die folgende Abbildung zeigt die Regulation der Transkriptionsfaktoren bei der Festlegung des Zellschicksals während der Determination (Abbildung 31).

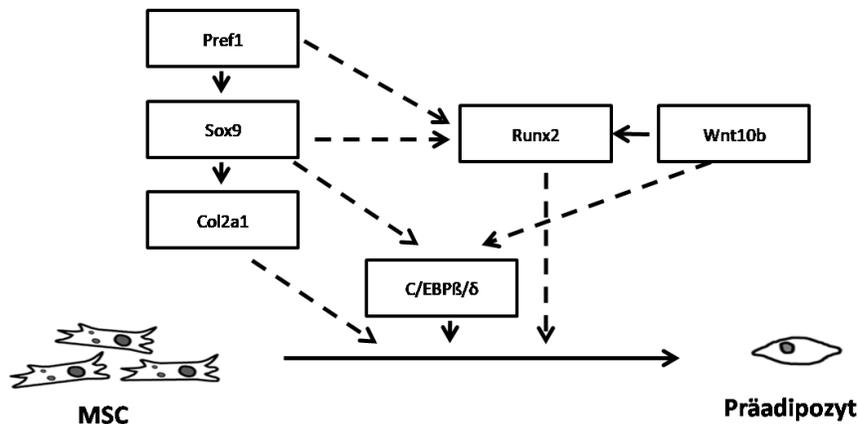


Abbildung 31: Regulation der Transkriptionsfaktoren während der Determination (Abbildung modifiziert nach Biemann et al. (Biemann et al. 2014a)). Die vorliegende Abbildung zeigt schematisch die Regulation von Sox9, Col2a1, Runx2 und Wnt10b. Dabei nimmt Pref1 die Rolle des übergeordneten Regulators in der undifferenzierten Wachstumsphase ein. Die schwarzen Pfeile zwischen den Transkriptionsfaktoren zeigen die Stimulation zwischen den MSC und den Präadipozyten die Stammzellendifferenzierung. Die gestrichelten Pfeile zeigen die Inhibierung der Transkriptionsfaktoren.

Pref1 ist ein Hauptregulator in der Determination der C3H10T1/2 (Biemann et al. 2014a). Pref1 inhibiert die Differenzierung der MSC, indem es die Promotorregion von C/EBP β / δ blockiert. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach der Exposition mit MGO und GO kein statistisch signifikanter Effekt auf die mRNA-Menge von Pref1. Die Expression von Pref1 war zwar insbesondere nach der Exposition mit 100 μ M MGO deutlich verringert, zeigte jedoch eine hohe Standardabweichung und erreichte das Signifikanzniveau dadurch nicht. In der Behandlungsgruppe mit 100 μ M MGO und GO, in der eine statistisch signifikante Steigerung der Adipogenese nachgewiesen werden konnte, war die Menge der Pref1-mRNA vergleichbar mit der aus der Kontrollgruppe. In der aktuellen Literatur lagen noch keine Analysen zum Verhalten der Pref1-Expression unter Exposition mit hochreaktiven Dicarbonylen vor.

Sox9 reguliert zusammen mit Sox5 und Sox6 die Expression von Col2a1, inhibiert C/EBP β / δ direkt und inhibiert Runx2 (Biemann et al. 2014a). Durch Herunterregulation von Sox9 wird die Aktivierung von C/EBP β / δ möglich und die adipogene Differenzierung wird eingeleitet (Biemann et al. 2014a). In der vorliegenden Arbeit änderte sich die mRNA-Menge von Sox9 durch die Exposition mit MGO und GO nicht. Abweichungen erreichten keine statistische Signifikanz und können so die obesogene Wirkung von MGO und GO nicht erklären.

Col2a1 wird von Sox9 reguliert und ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die chondrogene Differenzierung, da es als Hauptträger für die Vernetzung von Kollagen-II-Fibrillen essentiell für den Knorpelaufbau ist (Biemann et al. 2014a; Sobotta 2003). Der Transkriptionsfaktor

hemmt die Determination der MSC zur adipogenen Zelllinie (Biemann et al. 2014a). In der vorliegenden Arbeit konnte eine statistisch signifikante Verringerung der Col2a1-mRNA-Menge bei der Exposition mit 100 μ M GO und eine noch stärkere Verringerung bei Exposition mit 100 μ M MGO und GO in Kombination nachgewiesen werden. Eine Verringerung der Col2a1-Menge durch die Exposition mit 100 μ M MGO und GO führte dabei zu einer Erhöhung der adipogenen Differenzierungseffizienz. Ein ähnlicher Effekt konnte in einer Studie an *mesenchymal progenitor cells* (MPCs, mesenchymale Vorläuferzellen) beobachtet werden (Masson et al. 2015). Eine vermehrte Expression von p21 führte zu einem reduzierten chondrogenen Differenzierungspotential (Masson et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei einer verstärkten p21-Expression nach der Exposition mit MGO und GO eine verringerte Transkriptmenge von Col2a1, was mit den Ergebnissen von Masson et al. übereinstimmt. Da in der vorliegenden Arbeit die Sox9-mRNA-Transkriptmenge nicht verringert war, erfolgte die Verringerung der Col2a1-mRNA-Menge in den C3H10T1/2-Zellen nicht Sox9 vermittelt.

Wnt10b hemmt die Adipogenese und stimuliert die Osteoblastogenese durch einen β -cateninabhängigen Mechanismus (Cawthorn et al. 2012). Epigenetische Mechanismen können den Wnt-Signalweg inhibieren und so die osteogene Differenzierung in BMSCs (*Bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) hemmen (Jing et al. 2018). Eine Veränderung der Differenzierung in osteogenen Vorläuferzellen wurde durch Histonmodifikationen wie Acetylierung vermutet (Jing et al. 2018). Die Abnahme der Histonacetylierung führte zu einer persistierenden Unterdrückung des Wnt-Signalwegs. Durch Histonacetylierung wurden das kondensierte Chromatin und die Gentranskription verringert. Die Acetylierung wird von Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen kontrolliert. Histonacetyltransferasen können so einen Angriffspunkt in der Verstärkung des Wnt-Signalwegs bilden (Jing et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit war die Menge der Wnt10b-mRNA konzentrationsabhängig verändert. Am Tag 7 war bei allen Behandlungsgruppen tendenziell eine erhöhte Wnt10b-Transkriptmenge nachweisbar. Nach der Exposition mit 50 μ M MGO zeigte sich die Transkriptmenge erhöht. Nach der Exposition mit 100 μ M MGO und GO sank die mRNA-Menge von Wnt10b im Vergleich zu der Behandlungsgruppe von 50 μ M MGO, lag jedoch über 1 und kann die vermehrte adipogene Differenzierung in dieser Behandlungsgruppe nicht erklären. Da der Nachweis von Wnt10b nur auf Transkriptebe Ebene erfolgte, kann keine finale Aussage gemacht werden, ob die Wnt10b-Menge auch auf Proteinebene verändert ist. In dieser Studie wurden posttranslationale Modifikationen durch MGO und GO nicht untersucht. In der Studie von Galligan konnte gezeigt werden, dass MGO zu Histonmodifikationen in Zellen führt. Der Nachweis, dass die

Behandlung von HEK293-Zellen mit 50 μM MGO zur Abnahme der Transkriptmenge in 164 Genen und zur Zunahme der Transkriptmenge in 140 Genen führte, zeigt den wichtigen Einfluss des zellulären Metabolismus auf die Chromatindynamik (Galligan et al. 2018).

Runx2 spielt eine essentielle Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten. Runx2 interagiert durch Histondeacetylase mit p53, wird in seneszenten Zellen verändert exprimiert und nimmt eine Rolle in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden ein (Wysokinski et al. 2015). In der Studie von Chen et al. konnte die Beobachtung von Wysokinski et al. ebenfalls beschrieben werden. Chen et al. betrachteten den Einfluss von mütterlicher Adipositas auf Seneszenzmarker und den Glucosemetabolismus in EOCCs (*embryonic rat osteogenic calvarial cells*, embryonale Schädelknochenzellen der Ratte) (Chen et al. 2016). Dabei konnte gezeigt werden, dass erhöhte Seneszenzsignale in den EOCCs zu einer geringeren Differenzierung zu osteogenen Vorläuferzellen und zu einer vermehrten Differenzierung zu Adipozyten führte. Dadurch lieferten Chen et al. neue Erkenntnisse zur maternalen Programmierung von MSCs. So wurde der Einfluss von epigenetischen Mechanismen und Seneszenzmarkern auf die unbalancierte Differenzierung von Adipozyten und Osteoblasten untersucht (Chen et al. 2016). Vor allem die erhöhte PPAR γ -Expression in Adipositas und die damit verbundene erhöhte p53/p21-medierte Seneszenz wurde als ein Mechanismus für die Beobachtung diskutiert (Chen et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit konnte dies in Bezug auf den osteogenen Transkriptionsfaktor Runx2 nicht reproduziert werden. Die Runx2-mRNA-Menge war zwar bei der Exposition mit 100 μM GO statistisch signifikant verringert, in der Behandlungsgruppe 100 μM MGO und GO, in der die Expression des p53-abhängigen p21 erhöht war, konnte keine statistisch signifikante Verringerung von Runx2 gezeigt werden.

5.2.2 MGO und GO reduzieren die Expression von PPAR γ 2

Die folgende Abbildung stellt die Regulation der Adipogenese in der präterminalen und terminalen Differenzierungsphase in C3H10T1/2 dar (Abbildung 32).

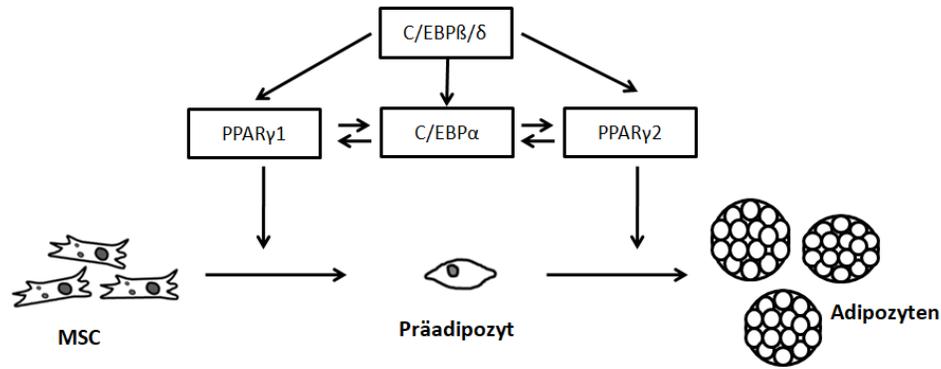


Abbildung 32: Regulation der Transkriptionsfaktoren in der Induktion. Die Abbildung zeigt die Interaktion der Transkriptionsfaktoren C/EBPβ/δ, PPARγ1 und 2 sowie C/EBPα und die gegenseitige Regulation der Faktoren (Abbildung modifiziert nach Biemann et al. (Biemann et al. 2014a)). Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Induktion der Transkriptionsfaktoren.

PPARγ ist ein Masterregulator der adipogenen Geninduktion (Biemann et al. 2014a). In den Zelllinien hATECs (*human adipose tissue endothelial cells*, humane Endothelzellen aus dem Fettgewebe) und hPROG (*human progenitor*, humane Progenitorzellen) korrelierte ein seneszenten Phänotyp und eine Dysfunktion von Fettgewebe mit einer verringerten PPARγ-Expression (Briot et al. 2018). In den Endothelzellen führte die Abnahme des PPARγ-Levels zu einer Phänotypänderung von aktiven Fettsäure-transportierenden Zellen zu proentzündlich aktivierten Zellen. Die N-terminale Domäne von dem Adipozyten-spezifischen PPARγ2 könnte im Vergleich zu PPARγ1 für diesen Effekt prädisponieren (Briot et al. 2018).

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die mRNA-Transkriptmenge als auch die Proteinexpression zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten der adipogenen Differenzierung betrachtet. Es wurde getrennt voneinander die PPARγ1- und PPARγ2-Expression betrachtet. Dabei zeigte sich in der Induktionsphase sowohl bei den mRNA- als auch bei den Proteindaten von PPARγ1 und PPARγ2 ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Transkriptmenge. In der terminalen Differenzierung zeigte sich der von Briot et al. erläuterte Einfluss der Seneszenz insbesondere auf die PPARγ2-Expression. Die Exposition von C3H10T1/2-Zellen mit 100 μM MGO und GO steigerte die p21-Expression und reduzierte die Proteinexpression von PPARγ2. Das PPARγ2-Transkriptlevel war nach der Exposition mit 100 μM MGO und mit 50 μM GO verringert. Mit dem Anstieg der Konzentration von MGO und GO zeigte sich eine Reduktion des PPARγ2-Transkriptlevels, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau.

In der Studie von Latella et al. wurden die Signale, die bei DNA-Schäden entstehen, in der replikativen Seneszenz und in der terminalen Differenzierung analysiert (Latella et al. 2017). In den

MuSCs (*muscle stem cells*, Muskelstammzellen) konnte gezeigt werden, dass der myogene Faktor 3 als Regulator des funktionellen Antagonismus zwischen replikativer Seneszenz und Aktivierung der myogenen Differenzierung fungiert. Dieses Signal inhibiert die terminale Differenzierung in Zellen, die genotoxischen Stress erlitten haben, bis die DNA-Schäden repariert sind und ermöglicht erst dann die weitere Differenzierung. Als potentiellen Mechanismus beschrieb Latella den Histonabbau in seneszenten Zellen, der die Muskelgenexpression inhibiert (Latella et al. 2017). Ein solcher Mechanismus könnte auch in den C3H10T1/2-Zellen vorliegen, der jedoch als Angriffspunkt den adipogenen Hauptregulator PPAR γ nutzt und ebenfalls in der terminalen Differenzierung greift.

Die Arbeit von Chen et al. an EOCCs hingegen zeigte, dass in osteogenen Progenitorzellen eine Aktivierung von Seneszenzmarkern zur H3K27-Acetylierung führte und so die Expression von PPAR γ steigerte (Chen et al. 2016). Die H3K-Histone sind assoziiert mit der fetalen Programmierung von Geweben und werden so als Ursache für Differenzierungsveränderungen diskutiert. Ein Grund für die abweichenden Ergebnisse zwischen der Studie von Chen et al. und der vorliegenden Arbeit kann sein, dass die hochkalorische Diät zwar wahrscheinlich MGO und GO erhöhte, jedoch nicht in dem Maß, wie in der vorliegenden Arbeit. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die PPAR γ -Expression getrennt in PPAR γ 1 und PPAR γ 2 betrachtet und die PPAR γ -Proteinexpression sowohl nach der Induktion als auch in der terminalen Differenzierung analysiert. Nach der Induktionsphase konnte man einen Anstieg der Proteinexpression von PPAR γ 1 und 2 nachvollziehen, während die Proteindaten sich in der terminalen Differenzierung verringert zeigten. Doch auch das abweichende Differenzierungsverhalten von osteogenen Vorläuferzellen und MSC ist möglich.

Die Rolle von PPAR γ und der Zusammenhang mit Seneszenz ist insbesondere in Endothelzellen beschrieben worden (Briot et al. 2018; Silva et al. 2018). Die Rolle von PPAR γ als aktiver Metabolit scheint zellspezifisch zu sein (Silva et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte im Vergleich zu Silva et al. und Briot et al. eine ähnliche Wirkung des Transkriptionsfaktors gezeigt werden. Mit Zunahme der Seneszenz der Zellen, in der vorliegenden Studie durch die Akkumulation der AGEs und des Seneszenzmarkers p21 gezeigt, führte insbesondere bei PPAR γ 2 zu einer Reduktion in der terminalen Differenzierung. Durch die Abnahme des PPAR γ 2-Levels ist eine Fettstoffwechselstörung in den seneszenten Zellen wahrscheinlich.

Um die Fettstoffwechsellkapazität in den C3H10T1/2 abzuschätzen wurde in der vorliegenden Arbeit FABP4 analysiert. Bei einem Anstieg der adipogenen Differenzierungseffizienz wird auch ein Anstieg von FABP4-Protein und –mRNA erwartet. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich weder ein Anstieg bei der mRNA-Transkript- und noch bei der Proteinmenge. Die Expression von FABP4 wird von PPAR γ reguliert (Briot et al. 2018). Ein fehlender Anstieg von FABP4 bei konzentrationsabhängigem Anstieg der Nilrotakkumulation spricht für eine fehlende Aufnahme von Fettsäuren in die Adipozyten und wurde von Briot et al. beschrieben (Briot et al. 2018). Die Fehlspeicherung von Fettsäuren und die fehlende Umwandlung in neutrale Triglyzeride führt zur Lipotoxizität und Dyslipoproteinämie (Briot et al. 2018).

5.3 Induktion der Seneszenz durch MGO und GO hat Auswirkungen auf die Lipohomöostase

Als Marker für die zelluläre Seneszenz wurden die Formationen der AGEs CML und MG-H1 und die Induktion von p21 genutzt. Dabei zeigte sich, dass die seneszenten MSC vermehrt zu Adipozyten differenzierten (Abbildung 33).

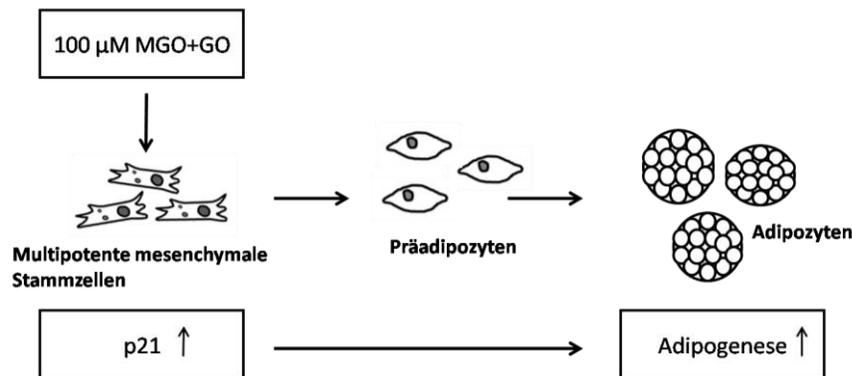


Abbildung 33: Schematische Darstellung der vermehrten Expression von p21 nach Exposition der MSC mit MGO und GO und die daraus resultierende gesteigerte Adipogenese. In dieser Studie konnte mithilfe der Durchflusszytometrie eine gesteigerte Adipogenese in Zellen, die mit 100 μM MGO und GO in Kombination behandelt worden sind, nachgewiesen werden. In der gleichen Behandlungsgruppe wurde dabei eine signifikant erhöhte p21-Expression in den undifferenzierten Zellen gemessen.

Um den zugrundeliegenden Mechanismus für die Steigerung der Adipogenese in MSC zu eruieren, wurde die Regulation der Adipogenese durch Transkriptionsfaktoren im undifferenzierten Zellwachstum, in der Induktion und in der terminalen Differenzierung analysiert. Die Abnahme von PPAR γ 2 und der fehlende Anstieg von FABP4 zeigen die veränderte Zellfunktion der Adipozyten, die mit MGO und GO exponiert waren. Die Verringerung der Fettsäureaufnahme in Adipozyten kann zur ektopen Ablagerung von Fettsäuren in Geweben, die durch die Lipotoxizität geschädigt werden, führen (Briot et al. 2018). In der genomweiten Assoziationsstudie von Claussnitzer et al.

wurde die Rolle von PPAR γ bei der Entwicklung von Diabetes mellitus beleuchtet (Claussnitzer et al. 2014). Zur Analyse des genauen Mechanismus folgte eine Analyse der verschiedenen Genvarianten und –loci. Dabei wurde der Polymorphismus rs4684847 als Regulator der PPAR γ 2-Expression identifiziert. Die Regulation von PPAR γ 2 erfolgt durch das Gen PRRX1 (*paired related homeobox 1*). Mit der Zunahme von PRRX1 konnte eine starke Abnahme von PEPCCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) beobachtet werden. PEPCCK ist ein Enzym, das den ersten Schritt der Glyceroneogenese, der die Reesterifizierung von freien Fettsäuren in Triglyzeride stimuliert, in Adipozyten reguliert.

Der Angriffspunkt von MGO und GO an dem Einzelnukleotidpolymorphismus rs4684847 des PRRX1 durch AGE-Modifikationen und p21 ist möglich. Insbesondere die Regulation von PEPCCK durch das „Altersgen“ FoxO6 unterstützt die These, dass PEPCCK durch AGE-Modifikationen und p21 beeinflusst werden kann (Lee und Dong 2017).

PPAR γ -Agonisten spielen in der Medizin bereits eine wichtige Rolle in der Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 (Briot et al. 2018). Durch eine Agonisierung von PPAR γ könnte eine Verbesserung der Adipozytenfunktion erreicht werden, das einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt bieten könnte. Glycotoxin-Inhibitoren könnten die zytotoxische Wirkung der Dicarbonyle MGO und GO mindern (Afridi et al. 2016). Afridi et al. konnten zeigen, dass der neue Glycotoxin-Inhibitor URM-II-81 die intrazelluläre AGE-Formation und ROS-Level durch MGO in Fett- und Leberzellen verminderte. Des Weiteren konnte eine verbesserte Glukoseaufnahme in die Zellen und eine verbesserte Insulinsensitivität in den murinen 3T3-L1-Fettzellen nachgewiesen werden (Afridi et al. 2016). Verglichen mit der Wirkung von MGO und GO in der vorliegenden Arbeit könnte so eine Herunterregulation von PPAR γ 2 mit positiven Auswirkungen auf die Lipohomöostase in seneszenten Zellen verhindert werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Weltweit lässt sich eine starke Zunahme der Prävalenz von Adipositas beobachten, so dass der Analyse und Vermeidung von auslösenden Faktoren eine wichtige Bedeutung zukommt. Neben den bekannten Ursachen wie Überernährung und Bewegungsmangel werden genetische Faktoren und Umweltkontaminanten diskutiert. Nach Formulierung der *Developmental Origin of Health and Disease* (DOHaD)-Hypothese durch Barker, in dem der Zusammenhang zwischen ungünstigen Einflüssen in der embryonalen Entwicklung und dem Auftreten von Erkrankungen im Erwachsenenalter gestellt wurde, ist die metabolische Prägung von Stammzellen als weitere mögliche Ursache zu nennen. In der vorliegenden Arbeit wurde die metabolische Prägung von Stammzellen durch Methylglyoxal (MGO) und Glyoxal (GO) als eine mögliche Ursache für die Veranlagung von Adipositas untersucht. MGO und GO sind toxische Metabolite des Glukose- und Fettstoffwechsels und werden unter physiologischen Bedingungen im Körper abgebaut und ausgeschieden. Durch Erkrankungen wie Diabetes mellitus erhöht sich ihre Konzentration im Blut und innerhalb der Zelle, was dazu führt, dass die hochreaktiven Dicarbonyl chemische Verbindungen mit Makromolekülen eingehen. Beide Metabolite reagieren mit basischen Biomolekülen wie Lysin und Arginin zu *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs). Dadurch werden Proteine irreversibel modifiziert, das in Stammzellen zur Seneszenz und zur Modifikation der Zellplastizität führen kann.

Entsprechend der aktuellen Literatur konnte in der vorliegenden Arbeit die Seneszenzinduktion nach einer Exposition von MSC mit MGO und GO beobachtet und mittels FACS-Analyse gemessen werden. Die hochreaktiven Metabolite führten dazu, dass die seneszenten C3H10T1/2-Zellen vermehrt zu Adipozyten differenzierten (gemessen durch die Nilrotfärbung und Analyse durch die FACS). Eine generelle Beeinträchtigung der Lipohomöostase kann man aufgrund der verringerten Induktion von FABP4 annehmen. PPAR γ 2 ist der adipozytenspezifische Hauptregulator der Adipogenese und Lipohomöostase. Eine veränderte Expression von PPAR γ 2 in MSC wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Als ein potentieller Mechanismus der Wirkung von MGO und GO auf die PPAR γ 2-Expression legen die Ergebnisse aus dieser Arbeit eine Veränderung von PRRX1 durch die Induktion von p21 und die daraus resultierende Reduktion von PPAR γ 2 nahe. Bereits bei undifferenzierten MSC verringert sich die mRNA-Expression von Col2a1 in den seneszenten Zellen, was zusätzlich eine Affektion der chondrogenen Differenzierung vermuten lässt.

Um die obesogene und seneszenzinduktive Wirkung von MGO und GO auf MSC zu verringern, könnten Glycotoxin-Inhibitoren als potentieller therapeutischer Ansatz dienen. Die MSC-in vitro-Kultur ist ein geeignetes Zellmodell, um diese Frage weiter zu untersuchen.

7. Literaturverzeichnis

Abarca-Gómez, Leandra; Abdeen, Ziad A.; Hamid, Zargar Abdul; Abu-Rmeileh, Niveen M.; Acosta-Cazares, Benjamin; Acuin, Cecilia et al. (2017): Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. In: *The Lancet* 390 (10113), S. 2627–2642. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32129-3.

Afridi, Shabbir Khan; Aftab, Meha Fatima; Murtaza, Munazza; Ghaffar, Safina; Karim, Aneela; Mughal, Uzma Rasool et al. (2016): A new glycotoxins inhibitor attenuates insulin resistance in liver and fat cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 476 (4), S. 188–195. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.05.085.

Almario, R. U.; Karakas, S. E. (2015): Roles of circulating WNT-signaling proteins and WNT-inhibitors in human adiposity, insulin resistance, insulin secretion, and inflammation. In: *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 47 (2), S. 152–157. DOI: 10.1055/s-0034-1384521.

Arand, Michael (2009): Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. Mit über 1000 Abbildungen ; große Falttafel mit Stoffwechselübersicht. 1. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.

Aravinthan, Aloysious (2015): Cellular senescence: a hitchhiker's guide. In: *Human cell* 28 (2), S. 51–64. DOI: 10.1007/s13577-015-0110-x.

Barker, D. J. P. (2007): The origins of the developmental origins theory. In: *Journal of internal medicine* 261 (5), S. 412–417. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x.

Biemann, Ronald; Fischer, Bernd; Blüher, Matthias; Navarrete Santos, Anne (2014a): Tributyltin affects adipogenic cell fate commitment in mesenchymal stem cells by a PPAR γ independent mechanism. In: *Chemico-biological interactions* 214, S. 1–9. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.01.021.

Biemann, Ronald; Fischer, Bernd; Navarrete Santos, Anne (2014b): Adipogenic effects of a combination of the endocrine-disrupting compounds bisphenol A, diethylhexylphthalate, and tributyltin. In: *Obesity facts* 7 (1), S. 48–56. DOI: 10.1159/000358913.

Biemann, Ronald; Navarrete Santos, Anne; Navarrete Santos, Alexander; Riemann, Dagmar; Kne-langen, Julia; Blüher, Matthias et al. (2012): Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows. In: *Biochemical and biophysical research communications* 417 (2), S. 747–752. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.028.

Blüher, Matthias (2019): Obesity: global epidemiology and pathogenesis. In: *Nature reviews. Endocrinology* 15 (5), S. 288–298. DOI: 10.1038/s41574-019-0176-8.

Bowers, Robert R.; Lane, M. Daniel (2007): A role for bone morphogenetic protein-4 in adipocyte development. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (4), S. 385–389. DOI: 10.4161/cc.6.4.3804.

Boyle, Kristen E.; Patinkin, Zachary W.; Shapiro, Allison L. B.; Baker, Peter R.; Dabelea, Dana; Friedman, Jacob E. (2016): Mesenchymal Stem Cells From Infants Born to Obese Mothers Exhibit Greater Potential for Adipogenesis: The Healthy Start BabyBUMP Project. In: *Diabetes* 65 (3), S. 647–659. DOI: 10.2337/db15-0849.

Branca, Francesco (Hg.) (2007): Die Herausforderung Adipositas und Strategien zu ihrer Bekämpfung in der Europäischen Region der WHO. Zusammenfassung. Weltgesundheitsorganisation. Kopenhagen: WHO Regionalbüro für Europa.

Briot, Anaïs; Decaunes, Pauline; Volat, Fanny; Belles, Chloé; Coupaye, Muriel; Ledoux, Séverine; Bouloumié, Anne (2018): Senescence Alters PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma)-Dependent Fatty Acid Handling in Human Adipose Tissue Microvascular Endothelial Cells and Favors Inflammation. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38 (5), S. 1134–1146. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.310797.

Bruderer, M.; Richards, R. G.; Alini, M.; Stoddart, M. J. (2014): Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. In: *European cells & materials* 28, S. 269–286. DOI: 10.22203/ecm.v028a19.

Cawthorn, William P.; Bree, Adam J.; Yao, Yao; Du, Baowen; Hemati, Nahid; Martinez-Santibañez, Gabriel; MacDougald, Ormond A. (2012): Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a β -catenin-dependent mechanism. In: *Bone* 50 (2), S. 477–489. DOI: 10.1016/j.bone.2011.08.010.

Chen, Jin-Ran; Lazarenko, Oxana P.; Blackburn, Michael L.; Rose, Shannon; Frye, Richard E.; Badger, Thomas M. et al. (2016): Maternal Obesity Programs Senescence Signaling and Glucose Metabolism in Osteo-Progenitors From Rat and Human. In: *Endocrinology* 157 (11), S. 4172–4183. DOI: 10.1210/en.2016-1408.

Claussnitzer, M.; Dankel, S. N.; Klocke, B.; Grallert, H.; Glunk, V.; Berulava, T. et al. (2014): Leveraging Cross-Species Transcription Factor Binding Site Patterns: From Diabetes Risk Loci to Disease Mechanisms. In: *Cell* 156 (1-2). DOI: 10.1016/j.cell.2013.10.058.

Cui, Xianwei; Xiao, Wen; You, Lianghai; Zhang, Fan; Cao, Xinguo; Feng, Jie et al. (2019): Age-induced oxidative stress impairs adipogenesis and thermogenesis in brown fat. In: *The FEBS journal* 286 (14), S. 2753–2768. DOI: 10.1111/febs.14838.

Curtis, Elizabeth; Litwic, Anna; Cooper, Cyrus; Dennison, Elaine (2015): Determinants of Muscle and Bone Aging. In: *Journal of cellular physiology* 230 (11), S. 2618–2625. DOI: 10.1002/jcp.25001.

Degen, Julia; Vogel, Maria; Richter, Doreen; Hellwig, Michael; Henle, Thomas (2013): Metabolic transit of dietary methylglyoxal. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (43), S. 10253–10260. DOI: 10.1021/jf304946p.

Dodig, Slavica; Čepelak, Ivana; Pavić, Ivan (2019): Hallmarks of senescence and aging. In: *Biochemia medica* 29 (3), S. 30501. DOI: 10.11613/BM.2019.030501.

Eades, Claire E.; Cameron, Dawn M.; Evans, Josie M. M. (2017): Prevalence of gestational diabetes mellitus in Europe: A meta-analysis. In: *Diabetes research and clinical practice* 129, S. 173–181. DOI: 10.1016/j.diabres.2017.03.030.

Fischer, Martin; Quaas, Marianne; Steiner, Lydia; Engeland, Kurt (2016): The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. In: *Nucleic acids research* 44 (1), S. 164–174. DOI: 10.1093/nar/gkv927.

Flegal, Katherine M.; Kit, Brian K.; Orpana, Heather; Graubard, Barry I. (2013): Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. In: *JAMA* 309 (1), S. 71–82. DOI: 10.1001/jama.2012.113905.

Galligan, James J.; Wepy, James A.; Streeter, Matthew D.; Kingsley, Philip J.; Mitchener, Michelle M.; Wauchope, Orrette R. et al. (2018): Methylglyoxal-derived posttranslational arginine modifications are abundant histone marks. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (37), S. 9228–9233. DOI: 10.1073/pnas.1802901115.

Georg Thieme Verlag KG (2017): Biochemie 2. 4., aktualisierte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (Endspurt Vorklinik, sicher und effizient zum Physikum mit 50 Lernpaketen in 14 Skripten).

Gluckman, Peter D.; Buklijas, Tatjana; Hanson, Mark A. (2016): The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) Concept. In: Cheryl S. Rosenfeld (Hg.): *The epigenome and developmental origins of health and disease*. London: Academic Press an imprint of Elsevier, S. 1–15.

Gude, Neil M.; Roberts, Claire T.; Kalionis, Bill; King, Roger G. (2004): Growth and function of the normal human placenta. In: *Thrombosis research* 114 (5-6), S. 397–407. DOI: 10.1016/j.thromres.2004.06.038.

Gustafson, Birgit; Hammarstedt, Ann; Hedjazifar, Shahram; Hoffmann, Jenny M.; Svensson, Per-Arne; Grimsby, Joseph et al. (2015): BMP4 and BMP Antagonists Regulate Human White and Beige Adipogenesis. In: *Diabetes* 64 (5), S. 1670–1681. DOI: 10.2337/db14-1127.

Hansen, Werner (Hg.) (2007, c 2007): *Medizin des Alterns und des alten Menschen*. Mit 20 Tabellen. Stuttgart, New York: Schattauer (Querschnitt konkret).

Harrisons Innere Medizin. [Berlin]: Lehmanns Media LOB.de.

Helmert, U.; Strube, Helga (2004): Die Entwicklung der Adipositas in Deutschland im Zeitraum von 1985 bis 2002. In: *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* 66 (7), S. 409–415. DOI: 10.1055/s-2004-813324.

Henning, Christian; Glomb, Marcus A. (2016): Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions. In: *Glycoconjugate journal* 33 (4), S. 499–512. DOI: 10.1007/s10719-016-9694-y.

Herrmann, Jaqueline; Babic, Milen; Tölle, Markus; Eckardt, Kai-Uwe; van der Giet, Markus; Schuchardt, Mirjam (2020): A Novel Protocol for Detection of Senescence and Calcification Markers by Fluorescence Microscopy. In: *IJMS* 21 (10). DOI: 10.3390/ijms21103475.

Jing, Huan; Su, Xiaoxia; Gao, Bo; Shuai, Yi; Chen, Ji; Deng, Zhihong et al. (2018): Epigenetic inhibition of Wnt pathway suppresses osteogenic differentiation of BMSCs during osteoporosis. In: *Cell death & disease* 9 (2), S. 176. DOI: 10.1038/s41419-017-0231-0.

Jung, J. S.; Volk, C.; Marga, C.; Navarrete, Santos A.; Jung, M.; Rujescu, D. (2019): Adipose-Derived Stem/Stromal Cells Recapitulate Aging Biomarkers and Show Reduced Stem Cell Plasticity Affecting Their Adipogenic Differentiation Capacity. In: *Cellular reprogramming* 21 (4). DOI: 10.1089/cell.2019.0010.

Keele, Gregory R.; Prokop, Jeremy W.; He, Hong; Holl, Katie; Littrell, John; Deal, Aaron et al. (2018): Genetic Fine-Mapping and Identification of Candidate Genes and Variants for Adiposity Traits in Outbred Rats. In: *Obesity (Silver Spring, Md.)* 26 (1), S. 213–222. DOI: 10.1002/oby.22075.

Kreis, Nina-Naomi; Louwen, Frank; Yuan, Juping (2019): The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. In: *Cancers* 11 (9). DOI: 10.3390/cancers11091220.

Lapolla, Annunziata; Flamini, Riccardo; Dalla Vedova, Antonio; Senesi, Antonella; Reitano, Rachele; Fedele, Domenico et al. (2003): Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 41 (9), S. 1166–1173. DOI: 10.1515/CCLM.2003.180.

Latella, Lucia; Dall'Agnese, Alessandra; Boscolo, Francesca Sesillo; Nardoni, Chiara; Cosentino, Marianna; Lahm, Armin et al. (2017): DNA damage signaling mediates the functional antagonism between replicative senescence and terminal muscle differentiation. In: *Genes & Development* 31 (7), S. 648–659. DOI: 10.1101/gad.293266.116.

Lee, Na-Hee; Cho, Ara; Park, Se-Ra; Lee, Jin Woo; Sung Taek, Park; Park, Chan Hum et al. (2018): SERPINB2 is a novel indicator of stem cell toxicity. In: *Cell death & disease* 9 (7), S. 724. DOI: 10.1038/s41419-018-0748-x.

Lee, Sojin; Dong, H. Henry (2017): FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. In: *The Journal of endocrinology* 233 (2), R67-R79. DOI: 10.1530/JOE-17-0002.

Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2015): Taschenbuch Histologie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

M. Wabitsch; P. Fischer-Posovszky (2008): Grundlagen der Fettgewebeforschung und Adipozytokine. In: *Gynäkologische Endokrinologie* 6 (1), S. 6–13. DOI: 10.1007/s10304-007-0226-5.

- Maessen, Dionne E. M.; Stehouwer, Coen D. A.; Schalkwijk, Casper G. (2015): The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 128 (12), S. 839–861. DOI: 10.1042/CS20140683.
- Masania, Jinit; Malczewska-Malec, Malgorzata; Razny, Urszula; Goralska, Joanna; Zdzienicka, Anna; Kiec-Wilk, Beata et al. (2016): Dicarbonyl stress in clinical obesity. In: *Glycoconjugate journal* 33 (4), S. 581–589. DOI: 10.1007/s10719-016-9692-0.
- Masson, Anand Oliveira; Hess, Ricarda; O'Brien, Kate; Bertram, Karri L.; Tailor, Pankaj; Irvine, Edward et al. (2015): Increased levels of p21((CIP1/WAF1)) correlate with decreased chondrogenic differentiation potential in synovial membrane progenitor cells. In: *Mechanisms of ageing and development* 149, S. 31–40. DOI: 10.1016/j.mad.2015.05.005.
- Matjusaitis, Mantas; Chin, Greg; Sarnoski, Ethan Anders; Stolzing, Alexandra (2016): Biomarkers to identify and isolate senescent cells. In: *Ageing research reviews* 29, S. 1–12. DOI: 10.1016/j.arr.2016.05.003.
- McLellan, A. C.; Thornalley, P. J.; Benn, J.; Sonksen, P. H. (1994): Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 87 (1), S. 21–29.
- Melchior, Hanne; Kurch-Bek, Diana; Mund, Monika (2017): The Prevalence of Gestational Diabetes. In: *Deutsches Arzteblatt international* 114 (24), S. 412–418. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0412.
- Mey, Jacob T.; Haus, Jacob M. (2018): Dicarbonyl Stress and Glyoxalase-1 in Skeletal Muscle: Implications for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. In: *Frontiers in cardiovascular medicine* 5, S. 117. DOI: 10.3389/fcvm.2018.00117.
- Modica, Salvatore; Wolfrum, Christian (2017): The dual role of BMP4 in adipogenesis and metabolism. In: *Adipocyte* 6 (2), S. 141–146. DOI: 10.1080/21623945.2017.1287637.
- Navarrete Santos, Alexander; Jacobs, Kathleen; Simm, Andreas; Glaubitz, Nicole; Horstkorte, Rüdiger; Hofmann, Britt (2017): Dicarbonyls induce senescence of human vascular endothelial cells. In: *Mechanisms of ageing and development* 166, S. 24–32. DOI: 10.1016/j.mad.2017.07.009.
- Ng, Marie; Fleming, Tom; Robinson, Margaret; Thomson, Blake; Graetz, Nicholas; Margono, Christopher et al. (2014): Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. In: *The Lancet* 384 (9945), S. 766–781. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8.
- Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation (2000). In: *World Health Organization technical report series* 894, i-xii, 1-253.
- Otto, Tamara C.; Lane, M. Daniel (2005): Adipose development: from stem cell to adipocyte. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 40 (4), S. 229–242. DOI: 10.1080/10409230591008189.

- Qian, Shu-Wen; Tang, Yan; Li, Xi; Liu, Yuan; Zhang, You-You; Huang, Hai-Yan et al. (2013): BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (9), E798–807. DOI: 10.1073/pnas.1215236110.
- Rabbani, Naila; Thornalley, Paul J. (2018): Glyoxalase 1 Modulation in Obesity and Diabetes. In: *Antioxidants & redox signaling*. DOI: 10.1089/ars.2017.7424.
- Rabbani, Naila; Xue, Mingzhan; Thornalley, Paul J. (2016): Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. In: *Glycoconjugate journal* 33 (4), S. 513–525. DOI: 10.1007/s10719-016-9705-z.
- Rainer Radtke (2018): Anteil von Übergewichtigen* in Deutschland nach Bundesländern in den Jahren 1999 bis 2017. Hg. v. statista.com. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/256599/umfrage/bmi--anteil-der-uebergewichtigen-in-deutschland-nach-bundeslaendern/>, zuletzt geprüft am 26.11.2020.
- Reznikoff; Brankow; Heidelberger (1973): Establishment and Characterization of a Cloned Line of C3H Mouse Embryo Cells Sensitive to Postconfluence Inhibition of Division.
- Romanov, Vasily S.; Rudolph, K. Lenhard (2016): p21 shapes cancer evolution. In: *Nature cell biology* 18 (7), S. 722–724. DOI: 10.1038/ncb3382.
- Rosen, Evan D.; MacDougald, Ormond A. (2006): Adipocyte differentiation from the inside out. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 7 (12), S. 885–896. DOI: 10.1038/nrm2066.
- Rosenstock, Philip; Bezold, Veronika; Bork, Kaya; Scheffler, Jonas; Horstkorte, Rüdiger (2019): Glycation interferes with natural killer cell function. In: *Mechanisms of ageing and development* 178, S. 64–71. DOI: 10.1016/j.mad.2019.01.006.
- Saklayen, Mohammad G. (2018): The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. In: *Current hypertension reports* 20 (2), S. 12. DOI: 10.1007/s11906-018-0812-z.
- Sarparanta, Jaakko; García-Macia, Marina; Singh, Rajat (2017): Autophagy and Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes. In: *Current diabetes reviews* 13 (4), S. 352–369. DOI: 10.2174/1573399812666160217122530.
- Schnabl, Bernd; Purbeck, Carrie A.; Choi, Youkyung Hwang; Hagedorn, Curt H.; Brenner, David (2003): Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 37 (3), S. 653–664. DOI: 10.1053/jhep.2003.50097.
- Sejersen, Henrik; Rattan, Suresh I. S. (2009): Dicarbonyl-induced accelerated aging in vitro in human skin fibroblasts. In: *Biogerontology* 10 (2), S. 203–211. DOI: 10.1007/s10522-008-9172-4.

Semba, Richard D.; Nicklett, Emily J.; Ferrucci, Luigi (2010): Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 65 (9), S. 963–975. DOI: 10.1093/gerona/glq074.

Sengupta, Arunima; Kalinichenko, Vladimir V.; Yutzey, Katherine E. (2013): FoxO1 and FoxM1 transcription factors have antagonistic functions in neonatal cardiomyocyte cell-cycle withdrawal and IGF1 gene regulation. In: *Circulation research* 112 (2), S. 267–277. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.277442.

Silva, T. Michael de; Li, Ying; Kinzenbaw, Dale A.; Sigmund, Curt D.; Faraci, Frank M. (2018): Endothelial PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ) Is Essential for Preventing Endothelial Dysfunction With Aging. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 72 (1), S. 227–234. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10799.

Sobotta, Johannes (2003): Lehrbuch Histologie. Mit 21 Tabellen ; Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 1. Aufl. Hg. v. Ulrich Welsch. München, Jena: Urban und Fischer.

Spiegelman, Bruce M.: Obesity and the regulation of energy balance.

Spiegelman, Bruce M.; Flier, Jeffrey S. (2001): Obesity and the Regulation of Energy Balance. In: *Cell* 104 (4), S. 531–543. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00240-9.

Stöckl, Sabine; Bauer, Richard J.; Bosserhoff, Anja K.; Göttl, Claudia; Grifka, Joachim; Grässel, Susanne (2013): Sox9 modulates cell survival and adipogenic differentiation of multipotent adult rat mesenchymal stem cells. In: *Journal of cell science* 126 (Pt 13), S. 2890–2902. DOI: 10.1242/jcs.124305.

Takenaka, Yasuhiro; Inoue, Ikuo; Nakano, Takanari; Shinoda, Yuichi; Ikeda, Masaaki; Awata, Takuya; Katayama, Shigehiro (2013): A Novel Splicing Variant of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (Ppar γ 1sv) Cooperatively Regulates Adipocyte Differentiation with Ppar γ 2. In: *PloS one* 8 (6), e65583. DOI: 10.1371/journal.pone.0065583.

Tang; Lane (2012): Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte.

Thornalley, P. J. (1990): The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. In: *Biochemical Journal* 269 (1), S. 1–11.

Thornalley, P. J.; Langborg, A.; Minhas, H. S. (1999): Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. In: *Biochemical Journal* 344 (Pt 1), S. 109–116.

Thornalley, Paul J. (2008): Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - role in ageing and disease. In: *Drug metabolism and drug interactions* 23 (1-2), S. 125–150.

Tomar, Ashutosh Singh; Tallapragada, Divya Sri Priyanka; Nongmaithem, Suraj Singh; Shrestha, Smeeta; Yajnik, Chittaranjan S.; Chandak, Giriraj Ratan (2015): Intrauterine Programming of Diabetes and Adiposity. In: *Current obesity reports* 4 (4), S. 418–428. DOI: 10.1007/s13679-015-0175-6.

Weschenfelder, Friederike; Groten, Tanja (2019): Aspekte der Ernährung rund um die Schwangerschaft bei Adipositas. In: *Ernährung & Medizin* 34 (01), S. 26–31. DOI: 10.1055/a-0854-4753.

Wirth, Alfred; Wabitsch, Martin; Hauner, Hans (2014): The prevention and treatment of obesity. In: *Deutsches Arzteblatt international* 111 (42), S. 705–713. DOI: 10.3238/arztebl.2014.0705.

Wysokinski, Daniel; Pawlowska, Elzbieta; Blasiak, Janusz (2015): RUNX2: A Master Bone Growth Regulator That May Be Involved in the DNA Damage Response. In: *DNA and cell biology* 34 (5), S. 305–315. DOI: 10.1089/dna.2014.2688.

Xue, Mingzhan; Rabbani, Naila; Thornalley, Paul J. (2011): Glyoxalase in ageing. In: *Seminars in cell & developmental biology* 22 (3), S. 293–301. DOI: 10.1016/j.semcd.2011.02.013.

Yang, Guang; Cancino, Gonzalo I.; Zahr, Siraj K.; Guskjolen, Axel; Voronova, Anastassia; Gallagher, Denis et al. (2016): A Glo1-Methylglyoxal Pathway that Is Perturbed in Maternal Diabetes Regulates Embryonic and Adult Neural Stem Cell Pools in Murine Offspring. In: *Cell reports* 17 (4), S. 1022–1036. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.09.067.

Yang, N. C.; Hu, M. L. (2005): The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. In: *Experimental gerontology* 40 (10). DOI: 10.1016/j.exger.2005.07.011.

Zebisch, Katja; Voigt, Valerie; Wabitsch, Martin; Brandsch, Matthias (2012): Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. In: *Analytical biochemistry* 425 (1), S. 88–90. DOI: 10.1016/j.ab.2012.03.005.

8. Thesen

1. Die Exposition von mesenchymalen Stammzellen mit MGO und GO führt zur konzentrationsabhängigen Formation von *Advanced Glycation Endproducts*.
2. Methylglyoxal (MGO) und Glyoxal (GO) induzieren in undifferenzierten MSC die Expression von p21. Die Induktion von p21 korreliert mit einer veränderten Differenzierungskapazität und Expression von Markergenen bei MSC.
3. Die Stimulation von C3H10T1/2 mit BMP4 zur Erhöhung der adipogenen Differenzierungseffizienz führt zu einer Abschwächung der Effekte von MGO und GO.
4. MGO und GO verändern die Zellfunktion von mesenchymalen Stammzellen, indem diese vermehrt zu Adipozyten differenzieren und vermehrt Triglyzeride akkumulieren.
5. Die Wirkung von MGO und GO auf die mesenchymale Stammzellendifferenzierung ist abhängig von der Differenzierungsphase.
6. In der Determinierungsphase vermindern MGO und GO die Expression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Col2a1.
7. In der terminalen Differenzierung wird die Proteinexpression von PPAR γ 2 durch MGO und GO mit Auswirkungen auf die Lipohomöostase reduziert. Trotz Anstieg der Differenzierungseffizienz und des Triglyzeridgehaltes ändert sich die Expression von FABP4 nicht.

9. Anlagen

9.1 Sequenzierung der PCR-Produkte

9.1.1 Runx2

Das PCR-Produkt der verwendeten Runx2-Primer wurde sequenziert.

PCR-Produkt	42	CGCATTCCCTCATCCCAGTATGAGAGTAGGTGTCCCGCCTCAGAACCCACGGCCCTCCCTG	101
Runx2	1149	<u>CGCATTCCCTCATCCCAGTATGAGAGTAGGTGTCCCGCCTCAGAACCCACGGCCCTCCCTG</u>	
PCR-Produkt	102	AACTCTGCACCAAGTCCTTTTAAATCCACAAGGACAGAGTCAGATTACAGATCCCAGGCAG	161
Runx2	1209	AACTCTGCACCAAGTCCTTTTAAATCCACAAGGACAGAGTCAGATTACAGATCCCAGGCAG	
PCR-Produkt	162	GCACAGTCTTCCCCACCGTGGTCCTATGACCAGTCTTACCCTCCTATCTGAGCCA	217
Runx2	1269	GCACAGTCTTCCCCACCGTGGTCCTATGACCAGTCTTACCCTCCTATCTGAGCCA	1324

Abbildung 34: Vergleich der Sequenz des Runx2-PCR-Produkts mit der Runx2-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No.: XR_385272.3. Die verwendeten Primer wurden unterstrichen. | kennzeichnet die identischen Nukleotide.

9.1.2 Col2a1

Das PCR-Produkt der verwendeten Col2a1-Primer wurde sequenziert.

PCR-Produkt	39	CCTTCTCGTCATACCCTCCAGCCATCTGAGCCGCGAAGTTTCCTGCACTAagggccagggg	98
Col2a1	1020	<u>CCTTCTCGTCATACCCTCCAGCCATCTGAGCCGCGAAGTTTCCTGCACTAAGGCCAGGGG</u>	961
PCR-Produkt	99	gaccagggggacacctggagggccagcggggccaggattccaggggtaccaggtTCTCCAT	158
Col2a1	960	GACCAGGGGGACCTGGAGGGCCAGCGGGCCAGGATTTCCAGGGGTACCAGGTTCTCCAT	901
PCR-Produkt	159	CTCTGCCACGGGGTCCAGGGCCACCCTTTTCTCCCTTGTACCACGATCACCTCTG	214
Col2a1	900	CTCTGCCACGGGGTCCAGGGCCACCCTTTTCTCCCTTGTACCACGATCACCTCTG	845

Abbildung 35: Vergleich der Sequenz des Col2a1-PCR-Produkts mit der Col2a1-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No.: XM_006520386.3. Die verwendeten Primer wurden unterstrichen. | kennzeichnet die identischen Nukleotide.

9.1.3 18s

Das PCR-Produkt der verwendeten 18S-Primer wurde sequenziert.

PCR-Produkt	1	<u>AGAAACGGCTACCACATCCAA</u> GGAAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGACCCG	
18S RNA	446	AGAAACGGCTACCACATCCAAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGACCCG	
PCR-Produkt	61	GGG <u>AGGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGG</u>	91
18S RNA	506	GGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGG	536

Abbildung 36: Vergleich der Sequenz des 18S-PCR-Produkts mit der 18S-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No. NM_003278.3. Die verwendeten Primer wurden unterstrichen und fett markiert. I kennzeichnet die identischen Nukleotide.

9.1.4 FABP4

Das PCR-Produkt der verwendeten FABP4-Primer wurde bereits in Vorarbeiten von Juliane-Susanne Jung (AG Navarrete Santos) sequenziert.

PCR-Produkt	41	TCGACTTTCATCCCACCTTCTGCACCTGCACCAGGGCCCCGCCATCTAGGGTTATGATGC	100
FABP4	372	<u>TCGACTTTCATCCCACCTTCTGCACCTGCACCAGGGCCCCGCCATCTAGGGTTATGATGC</u>	313
PCR-Produkt	101	TCTTCACCTTCCGTGTCGTCTGCGGTGATTTCATCGAATTCACGCCAGTTTGAAGGAAA	160
FABP4	312	TCTTCACCTTCCGTGTCGTCTGCGGTGATTTCATCGAATTCACGCCAGTTTGAAGGAAA	253
PCR-Produkt	161	TCTCGGTGTTTTAAAGTACTCTCTGACCCGGATGGTGACCAAATCCCATTACGCTGA	220
FABP4	252	TCTCGGTGTTTTAAAGTACTCTCTGACCCGGATGGTGACCAAATCCCATTACGCTGA	193
PCR-Produkt	221	TGATCATGTTGGGCTTGGCCATGCCTGCCACTTTCCTTGTGGCAAAGCCCACTCCCACTT	280
FABP4	192	TGATCATGTTGGGCTTGGCCATGCCTGCCACTTTCCTTGTGGCAAAGCCCACTCCCACTT	133
PCR-Produkt	281	CTTTCATGTAATCATCGAAGTTTTCCTGAGAGACAAGCTTCCA	323
FABP4	132	CTTTCATGTAATCATCGAAGTTTTCCTGAGAGACAAGCTTCCA	90

Abbildung 37: Vergleich der Sequenz des FABP4-PCR-Produkts mit der FABP4-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No.: NM_024406.2. Die verwendeten Primer wurden unterstrichen. I kennzeichnet die identischen Nukleotide.

9.1.5 Wnt10b

Das PCR-Produkt der verwendeten Wnt10b-Primer wurde bereits in Vorarbeiten von Maria Schindler (AG Navarrete Santos) sequenziert.

PCR-Produkt	37	CTGACGTTCCATGGCATTGCACTTCCGCTTCAGGTTTTCCGTTACCACCTGGCGTCCCA	96
Wnt10b	881	<u>CTGACGTTCCATGGCATTGCACTTCCGCTTCAGGTTTTCCGTTACCACCTGGCGTCCCA</u>	822
PCR-Produkt	97	CCCTGTTGTTGTGGATCCGCATTCTCGCCTGGATGTCCCGGGAGCCTCCCTGGAATCCA	156
Wnt10b	821	CCCTGTTGTTGTGGATCCGCATTCTCGCCTGGATGTCCCGGGAGCCTCCCTGGAATCCA	762
PCR-Produkt	157	AGAAATCCCGAGAGAAGTCTCTCCGAAGTCCATGTCGTGGTTACAGCCA	206
Wnt10b	761	AGAAATCCCGAGAGAAGTCTCTCCGAAGTCCATGTCGTGGTTACAGCCA	712

Abbildung 38: Vergleich der Sequenz des Wnt10b-PCR-Produkts mit der Wnt10b-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No. XM_006520891.3. Die verwendeten Primer wurden unterstrichen. I kennzeichnet die identischen Nukleotide.

9.1.6 PPARy1

Das PCR-Produkt der verwendeten PPARy1-Primer wurde bereits in Vorarbeiten von Ronald Biemann (Martin-Luther-Universität, Institut für Anatomie und Zellbiologie, AG Navarrete Santos) sequenziert.

Anhang

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Person) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle (Saale), den

Danksagung

Die Doktorarbeit wurde am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt. Durch die fachliche und finanzielle Unterstützung durch das Graduiertenkolleg GRK 2155 ProMoAge und die Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG) konnte meine Doktorarbeit ermöglicht werden. Aufgrund von zahlreichen Kursen und Workshops konnte ich an einem lebhaften Austausch über verschiedene Forschungsgebiete teilnehmen und das nationale und internationale Netzwerk der Altersforschung kennenlernen.

Bei apl. Prof. Dr. Anne Navarrete Santos möchte ich mich für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses spannenden Themas und für die stets ausgezeichnete Betreuung danken. Durch ihre unermüdliche Unterstützung konnte ich meine Ergebnisse auf Kongressen mit Postern und Vorträgen vorstellen. Mein besonderer Dank gilt Dr. Maria Schindler für die Festlegung des strukturierten Ablaufs und die stets hervorragende Unterstützung. Sie hatte zur jeder Tageszeit bis hin zu Wochenenden stets ein offenes Ohr bei Problemen und Fragen. Ohne ihre Hilfe wäre die Weiterführung der Doktorarbeit nach dem Ende des Stipendiums und neben dem Studium nur schwer durchführbar gewesen.

Dr. Alexander Navarrete Santos möchte ich danken für seine Expertise und Unterstützung bei der Durchführung der Durchflusszytometrie und für das Teilen seiner wissenschaftlichen Erkenntnisse. Seine fachlichen Fähigkeiten haben mich bei der Anfertigung der Arbeit und in meinem Studium sehr beeinflusst.

Ein weiterer großer Dank gebührt Sabine Schrötter und Michaela Kirstein für die unendliche Motivation bei einzelnen Fehlschlägen, die unermüdliche Unterstützung im Labor und für das kritische Auge bei der Durchführung meiner Laborarbeit. Durch ihre großartige Unterstützung gelang die notwendige Sorgfalt bei meinen Experimenten.

Danke auch an die anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe- Tom Seeling, Dr. Mareike Pendzialek und Katarzyna Grybel- für die Unterstützung im Labor und die zahlreichen Verbesserungsvorschläge.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die Verbesserungsvorschläge danke ich Antonia Brylok und Angelika Gröll.

Vielen Dank an Patrick Weber für die Motivation und die Unterstützung im Studium und bei der Doktorarbeit. Meinen Eltern gebührt Dank für die mentale und finanzielle Unterstützung und meinen Freunden für die unvergessliche Studienzeit.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Trends des altersstandardisierten mittleren BMI nach Geschlecht zwischen 1975 und 2016 weltweit (Abarca-Gómez et al. 2017).....	1
Abbildung 2: Modifizierte schematische Darstellung der Signalkaskade in der Adipogenese (Takenaka et al. 2013; Tang und Lane 2012).	4
Abbildung 3: Schema zur Bildung von MGO..	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Maillard-Reaktion.....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Rolle der AGEs in der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder (Semba et al. 2010)..	9
Abbildung 6: Induktion der zellulären Seneszenz durch Telomerdysfunktion, oxidativen Stress und DNA-Schäden über den p53-p21-Signalweg (Aravintan 2015).....	10
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Exposition der C3H10T1/2 mit MGO und GO.	21
Abbildung 8: Schema des adipogenen Differenzierungsprotokolls der C3H10T1/2.....	22
Abbildung 9: Beispielhafte Bestimmung der adipogenen Differenzierungseffizienz in der Durchflusszytometrie..	25
Abbildung 10: Membran nach Ponceau-S-Färbung.	34
Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme der C3H10T1/2 nach MGO- und GO-Exposition.....	37
Abbildung 12: Relative mittlere Fluoreszenz von p21 pro Zelle nach der Exposition mit MGO und GO bestimmt mittels Durchflusszytometrie.....	38
Abbildung 13: Relative mittlere Fluoreszenz von MG-H1 nach der Exposition mit MGO und GO für 72 h gemessen mittels Durchflusszytometrie.....	40
Abbildung 14: Relative mittlere Fluoreszenz von CML nach 72 h-Exposition mit MGO und GO bestimmt mittels Durchflusszytometrie..	41
Abbildung 15: Quantitative Bestimmung der Adipozytenzahl in C3H10T1/2 am Ende des adipogenen Differenzierungsprotokolls mit und ohne BMP4.....	42
Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahme von C3H10T1/2 am Tag 13 der adipogenen Differenzierung, Färbung Ölrot..	42
Abbildung 17: Messung der Nilrotfärbung mit der Durchflusszytometrie am Tag 13 des Differenzierungsprotokolls.....	43
Abbildung 18: Nilrotakkumulation nach 72h-Exposition mit MGO und GO gemessen mittels Durchflusszytometrie.	44
Abbildung 19: Relative Wnt10b-mRNA-Menge nach 72-stündiger Exposition mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 7 (d7).....	45
Abbildung 20: Relative Pref1- und Sox9-mRNA-Mengen nach 72-stündiger Exposition mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 7 (d7).	46
Abbildung 21: Relative Runx2- und Col2a1-mRNA-Mengen nach 72-stündiger Exposition mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 7 (d7).	46
Abbildung 22: Relative PPAR γ 1- und PPAR γ 2-mRNA-Mengen nach 72-stündiger Exposition mit MGO und GO (d4-7) in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 9 (d9).	47
Abbildung 23: Relative PPAR γ 1- und PPAR γ 2-Proteinmengen nach 72-stündiger Exposition mit MGO und GO (d4-7) in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 9 (d9).	48

Abbildung 24: Relative PPARy1- und PPARy2-mRNA-Mengen nach 72-stündiger Exposition (d4-d7) mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2.	49
Abbildung 25: Relative FABP4-mRNA-Menge nach 72-stündiger Exposition (d4-7) mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 13 (d13).	49
Abbildung 26: Relative PPARy2-Proteinmenge nach 72-stündiger Exposition (d4-7) mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 13.	50
Abbildung 27: Relative PPARy1- und FABP4-Proteinmengen nach 72-stündiger Exposition (d4-7) mit MGO und GO in adipogen-induzierten C3H10T1/2 am Tag 13.	51
Abbildung 28: Die Exposition von MSC mit 100 µM MGO und GO in Kombination führt zur vermehrten Bildung von AGEs und induziert zelluläre Seneszenz.	54
Abbildung 29: Regulation der Transkriptionsfaktoren während der Determination.	60
Abbildung 30: Regulation der Transkriptionsfaktoren in der Induktion.	63
Abbildung 31: Nach der verstärkten Expression von p21 zeigt sich eine signifikant erhöhte Adipogenese.	65
Abbildung 32: Vergleich der Sequenz des Runx2-PCR-Produkts mit der Runx2-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No.: XR_385272.3.	VII
Abbildung 33: Vergleich der Sequenz des Col2a1-PCR-Produkts mit der Col2a1-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No.: XM_006520386.3.	VII
Abbildung 34: Vergleich der Sequenz des 18S-PCR-Produkts mit der 18S-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No.: NM_003278.3.	VIII
Abbildung 35: Vergleich der Sequenz des FABP4-PCR-Produkts mit der FABP4-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No.: NM_024406.2.	VIII
Abbildung 36: Vergleich der Sequenz des Wnt10b-PCR-Produkts mit der Wnt10b-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No.: XM_006520891.3.	VIII
Abbildung 37: Vergleich der Sequenz des PPARy1-PCR-Produkts mit der PPARy1-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No.: NM_009605.4.	IX
Abbildung 38: Vergleich der Sequenz des PPARy2-PCR-Produkts mit der PPARy2-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No.: NM_011146.3.	IX
Abbildung 39: Vergleich der Sequenz des Pref1-PCR-Produkts mit der Pref1-rRNA-Sequenz der Maus. Acc. No.: NM_010052.5.	IX

Tabellenverzeichnis

Tabelle 5: Exzitation und Emission der verwendeten Antikörper zur Analyse der AGE-Modifikationen und des Zellzyklus.....	24
Tabelle 15: RT-PCR-Protokoll.....	28
Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.....	29
Tabelle 26: Darstellung der verwendeten Antikörper.....	35