

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
(Dekan: Prof. Dr. P. Wycisk)
der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



Metabolische Prägung embryonaler Zellen

Dissertation

angefertigt am Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

vorgelegt von
Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
Julia Miriam Knelangen
geboren am 05.05.1982 in Bad Friedrichshall

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer
2. Prof. Dr. Gabriele Stangl
3. PD Dr. Robert Ringseis

Datum der Verteidigung: 22. Oktober 2012

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	2
2.	Einleitung	4
2.1	Embryonale Zellen und Zelldifferenzierung	5
2.1.1	Adipogene Differenzierung von embryonalen Stammzellen in vitro.....	8
2.1.2	Kardiomyogene Differenzierung von embryonalen Karzinomzellen in vitro.....	10
2.2	Mechanismen der Prägung embryonaler Zellen	11
2.2.1.	Funktion und Biogenese von microRNAs	13
2.2.2.	MicroRNAs in embryonalen Stammzellen und Adipozyten	14
3.	Zielstellungen der Arbeit	18
4.	Originalarbeiten.....	20
4.1	Julia Knelangen, Randy Kurz, Undraga Schagdarsurengin, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos (2012). " <i>Short-time glucose exposure of embryonic carcinoma cells impairs their function as terminally differentiated cardiomyocytes.</i> " Biochemical and Biophysical Research Communications 420: 230-235	21
4.2	Julia Knelangen, Mark van der Hoek, Wee-Ching Kong, Julie Owens, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos (2011). " <i>MicroRNA expression profile during adipogenic differentiation in mouse embryonic stem cells.</i> " Physiological Genomics 43(10): 611-620...	22
4.3	Kristina Schädlich und Julia Knelangen, Alexander Navarrete Santos, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos (2010). " <i>A simple method to sort ESC-derived adipocytes.</i> " Cytometry A 77(10): 990-995.	23
4.4	Ronald Biemann und Anne Navarrete Santos, Alexander Navarrete Santos, Dagmar Riemann, Julia Knelangen, Matthias Blüher, Holger Koch und Bernd Fischer (2012). " <i>Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows.</i> " Biochemical and Biophysical Research Communications 417(2): 747-752.	24
5.	Ergebnisse und Diskussion.....	25
5.1	Metabolische Prägung embryonaler Zellen.....	25
5.1.1	Bestimmung der adipogenen Differenzierungseffizienz.....	29
5.1.2	Embryonale Stammzelldifferenzierung als Modell für die Untersuchung einer metabolischen Prägung.....	30
5.2	Mechanismen einer metabolischen Prägung	31
5.2.1	Das Insulin-/IGF-Rezeptor-System	31
5.2.2	DNA-Methylierung	32
5.2.3	MicroRNAs.....	33
5.2.4	Histonmodifikationen	36
5.3	Auswirkungen einer metabolischen Prägung embryonaler Zellen	39

6.	Zusammenfassung.....	42
7.	Summary.....	44
8.	Literaturverzeichnis.....	45
9.	Abkürzungsverzeichnis.....	58
10.	Abbildungsverzeichnis.....	60
11.	Tabellenverzeichnis.....	61

2. Einleitung

Der Embryo verfügt über eine hohe Kapazität, sich kurzfristig an metabolische Veränderungen, wie z.B. an einen Wechsel in der mütterlichen Ernährung oder im Hormonstatus, anzupassen. Sein Wachstum ist von auto-, parakrinen und endokrinen Faktoren und der Verfügbarkeit von Nährstoffen abhängig. Metabolische Veränderungen während der Embryonalentwicklung können kompensiert werden oder in Adaptationen des fetalen Organismus resultieren, die dauerhafte Umstellungen in der Morphologie, Physiologie und im Metabolismus mit sich bringen und die Veranlagungen für bestimmte Erkrankungen im späteren Leben schaffen (Mcmillen und Robinson 2005). Dieses Phänomen wird als metabolische Prägung (*metabolic programming*) bezeichnet.

Von Prof. David Barker und seinen Kollegen wurde bereits in den 1980er Jahren die Hypothese aufgestellt, dass das Risiko für das spätere Auftreten chronischer Erkrankungen nicht nur durch eine genetische Disposition und die Lebensführung beeinflusst wird, sondern auch über eine metabolische Prägung während früher, kritischer Entwicklungsphasen von Embryo, Fötus und Säugling (Barker und Osmond 1986; Barker 1990). Diese Hypothese von den entwicklungsbedingten Ursachen von metabolischen Erkrankungen im Erwachsenenalter (*Developmental origin of health and disease*; DOHaD-Hypothese) wird inzwischen von einer Vielzahl an epidemiologischen Beobachtungen und experimentellen Untersuchungen gestützt (Barker et al. 1993; Mcmillen und Robinson 2005; Fleming et al. 2012). Eine bemerkenswerte Erkenntnis ist, dass eine metabolische Programmierung sehr früh, bereits vor der Implantation des Embryos, auftreten kann (Fleming et al. 2012). Bei Ratten führt eine maternale Proteinunterversorgung während der Präimplantationsphase zu verändertem Wachstum und zu erhöhtem systolischem Blutdruck bei den Nachkommen (Kwong et al. 2000). Auch bei Mäusen zeigt sich, dass eine maternale Unterversorgung mit Proteinen bei ansonsten isokalorischer Diät während dieses kurzen Zeitraums mit Veränderungen beim postnatalen Phänotyp einhergeht und unter anderem das Wachstum, das kardiovaskuläre System und das Verhalten der Tiere betrifft (Watkins et al. 2010b). Eine Infektion zum Zeitpunkt der Befruchtung hat bei Ratten sowohl einen kurzfristigen Einfluss auf die Blastozystenentwicklung als auch langfristige Auswirkungen auf das angeborene

Immunsystem, das Verhalten und die Entwicklung einer Adipositas bei den erwachsenen Nachkommen (Williams et al. 2011).

2.1 Embryonale Zellen und Zelldifferenzierung

Um die metabolische Prägung in den frühen Phasen der Embryonalentwicklung zu untersuchen und nachzuvollziehen, bietet sich besonders gut die *in vitro* Differenzierung embryonaler Zellen, insbesondere embryonaler Stammzellen, an.

Es gibt mehrere Arten von embryonalen Stammzellen (Abb.1): die pluripotenten embryonalen Stammzellen (ESC), die pluripotenten embryonalen Keimzellen (EGC) sowie die pluripotenten embryonalen Karzinomzellen (ECC). Inzwischen ist es auch gelungen, murine pluripotente Stammzellen aus dem Epiblasten implantierter Embryonen zu gewinnen, sogenannte Epiblast-Stammzellen (EpiSC) (Tesar et al. 2007). Die Charakteristika von murinen embryonalen Stammzellen (mESC) können wie folgt zusammengefasst werden (Wobus 1997):

- mESC besitzen die Fähigkeit, sich *in vivo* wie auch *in vitro* in alle Zellen der drei Keimblätter Entoderm, Ektoderm und Mesoderm zu differenzieren. Sie stammen von pluripotenten Zellen aus Prä- oder Periimplantationsembryonen ab.
- Sie verfügen über die Eigenschaften zur nahezu unbegrenzten Selbsterneuerung und Proliferation (Smith 2001).
- Es liegt ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis vor, und die Aktivität der alkalischen Phosphatase und Telomerase ist hoch (Jäkel et al. 1983).
- Wichtige Marker für undifferenzierte ESC sind der Pluripotenzmarker Oct-4 (Schöler et al. 1989), das Homeodomänenprotein Nanog (Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003) und das Stadien-spezifische embryonale Antigen SSEA-1 (Solter und Knowles 1978).
- Die DNA ist hypomethyliert (Schöler et al. 1989) und die G1-Phasen im Zellzyklus und die Generationszeiten sind im Vergleich zu differenzierten Zellen relativ kurz (Rohwedel et al. 1996).

Embryonalen Zellen können durch standardisierte Kultivierungsmethoden in Derivate aller drei Keimblätter differenziert werden. Embryonale Zellen können sich zu

Kardiomyozyten (Wobus et al. 1991; Maltsev et al. 1994), Chondrozyten (Kramer et al. 2000), hämatopoetische (Schmitt et al. 1991) und neuronale Zellen (Strübing et al. 1996), Fett- (Dani et al. 1997), Epithel- (Bagutti et al. 1996) und Endothelzellen (Vittet et al. 1996) sowie in pankreatische (Schroeder et al. 2006), hepatische (Jones et al. 2002) und Skelettmuskelzellen (Rohwedel et al. 1994) entwickeln. Um die Differenzierung zu initiieren, werden die embryonalen Zellen zur Bildung dreidimensionaler Aggregate angeregt. Die kompakten Zellaggregate bezeichnet man als *embryoid bodies* (EBs) und sie entstehen durch die Kultur ohne differenzierungshemmende Faktoren und/oder im „hängenden Tropfen“. Dabei exprimiert ein EB entwicklungspezifische Gene und Proteine und durchläuft verschiedene Stadien, die mit der Entwicklung im Embryo vergleichbar sind. Zu Beginn ist die äußere Schicht des EBs endodermal, während die undifferenzierten Zellen im Inneren liegen. Nach ein paar Tagen entwickelt sich eine ektodermale Schicht und es folgt eine Differenzierung in mesodermale Zellen (Wobus und Boheler 2005). Dadurch sind EBs ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen auf zellulärer Ebene in relativ kurzer Zeit (Rohwedel et al. 2001). Sie stellen auch eine gute Möglichkeit dar, um *in vitro* reproduktionsbiologische Toxizitätsstudien durchzuführen (Scholz et al. 1999; Rolletschek et al. 2004).

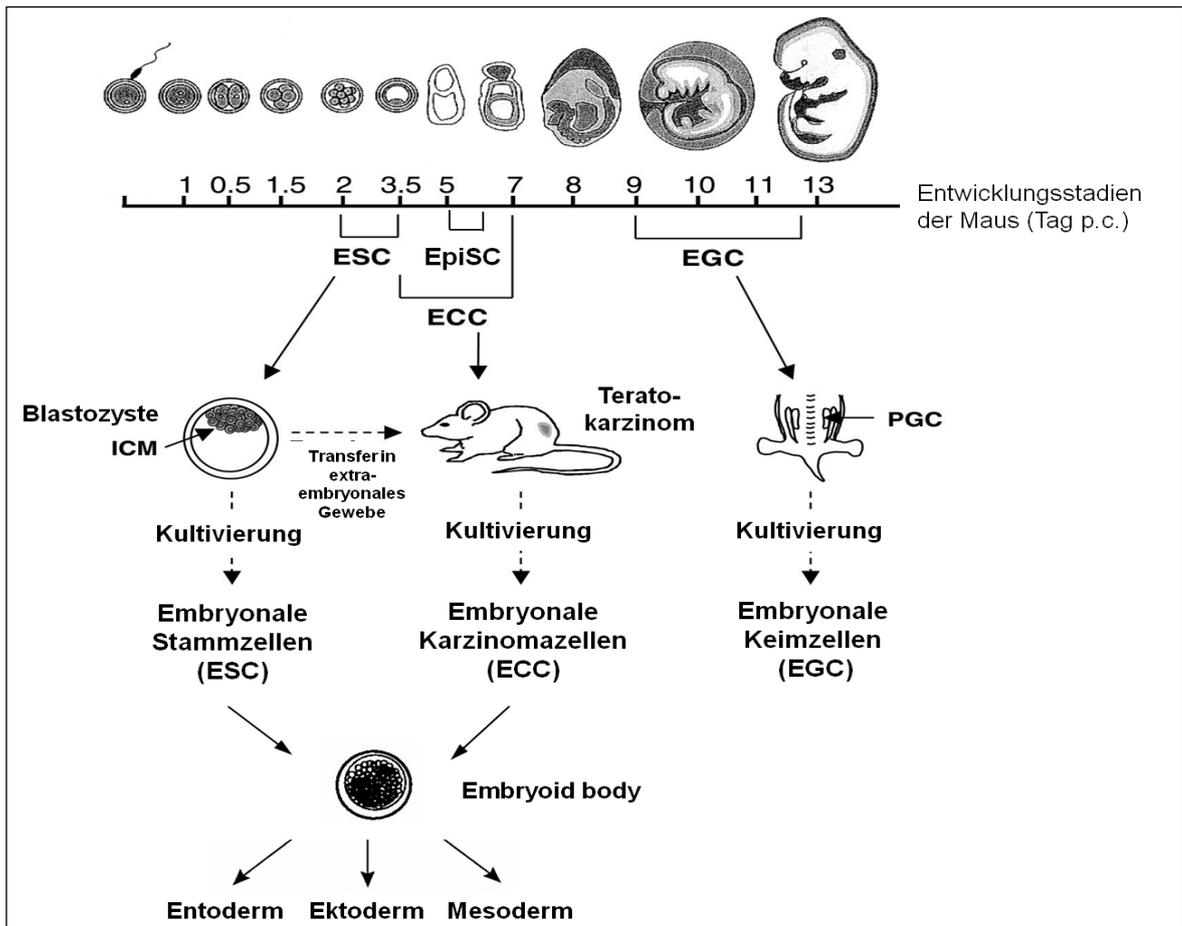


Abb.1 Herkunft und Differenzierungspotential embryonaler Zellen der Maus (Wobus und Boheler 2005). Embryonale Stammzellen (ESC) werden aus dem Embryoblasten, der sogenannten inneren Zellmasse (ICM), von Mausblastozysten gewonnen. Embryonale Karzinomzellen (ECC) stammen aus Teratokarzinomen, die durch die Transplantation embryonaler Zellen in extrauterines Gewebe entstanden sind. Embryonale Epiblastzellen (EpiSC) werden aus dem Epiblasten von Embryonen am Tag 5,5 isoliert. Embryonale Keimzellen (EGC) leiten sich aus den primordialen Keimzellen (PGC) ab, welche aus der Genitalleiste von Embryonen isoliert werden. Durch die *in vitro* Differenzierung von ESC und ECC im *embryoid body* entstehen Zellen aller drei Keimblätter.

2.1.1 Adipogene Differenzierung von embryonalen Stammzellen in vitro

Adipozyten entwickeln sich wie auch Chondrozyten, Osteozyten und Myozyten aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen (Gesta et al. 2007). Dabei geht man bei der Adipogenese von zwei Phasen der Differenzierung aus: Der erste Teil führt von multipotenten Stammzellen zu Präadipozyten (*commitment phase*), während man bei der darauffolgenden Reifung vom Präadipozyten zum adulten Adipozyten von terminaler Differenzierung spricht (Cristancho und Lazar 2011; Otto und Lane 2005). Bei den molekularen Abläufen gelten der *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) und Mitglieder der *CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP)*-Familie, allen voran das C/EBP α , als Schlüsselmoleküle der Adipogenese (Farmer 2006; Rosen und MacDougald 2006). C/EBP β und C/EBP δ aktivieren PPAR γ am Anfang der terminalen Differenzierung. Im weiteren Verlauf hält C/EBP α die PPAR γ -Expression über einen positiven *feedback*-Mechanismus aufrecht (Rosen und Spiegelman 2006). PPAR γ ist der sogenannte *master regulator*, da in Abwesenheit von PPAR γ C/EBP α nicht in der Lage ist, die adipogene Differenzierung auszulösen (Rosen et al. 2002). Auf der anderen Seite können Zellen, denen C/EBP α fehlt, sich zu Adipozyten entwickeln, auch wenn diese insulinresistent sind (El-Jack et al. 1999; Wu et al. 1999).

Die in dieser Arbeit verwendete embryonale Stammzelllinie CGR8 wurde 1994 von Prof. Austin Smith aus Embryonen des Mausstammes 129 etabliert (Mountford et al. 1994). Die Zelllinie ist in der Lage, in Adipozyten zu differenzieren. In murinen ESZ werden alle stammzellspezifischen Charakteristika von dem Zytokin *leukaemia inhibitory factor (LIF)* aufrechterhalten. Eine Entfernung von LIF führt zur sofortigen Differenzierung der Zellen (Hirai et al. 2011). Durch die routinemäßige Zugabe von LIF können mESC ohne eine Kokultur mit embryonalen Fibroblasten (*feeder layer*) kultiviert werden. Eine EB-Formation der murinen CGR8-ESC sowie eine kurzzeitige Behandlung der EBs mit Retinsäure, eine anschließende Plattierung auf Gelatine-beschichteten Schalen und eine Kultur in Anwesenheit von Insulin und Trijodthyronin (T₃) führt zu reifen Adipozyten im EB *outgrowth* innerhalb von 21 Tagen (Dani et al. 1997)(Abb.2). In diesen mESC-Adipozyten wurden eine hohe Expression von Adipozyten-spezifischen Genen sowie lipogene und lipolytische Aktivitäten nachgewiesen (Dani et al. 1997; Billon und Dani 2011). Dabei zeigen neuere Studien, dass mesenchymale Stammzellen und Adipozyten, die aus Retinsäure-behandelten EBs entstanden sind, von Vorläuferzellen der Neuralleiste

abstammen und von daher neuroektodermale Derivate sind (Billon et al. 2007; Takashima et al. 2007).

Da nach einer spontanen Differenzierung die Anzahl spezifisch terminal differenzierter Zellen sehr gering ist, ist die Zugabe von Differenzierungsfaktoren notwendig. Durch die Zugabe von klassischen proadipogenen Faktoren tauchen in 70-80% der EBs große Adipozytenansammlungen auf (Dani et al. 1997). In einer *in vitro* Differenzierung wirken diese Stimuli u.a. über eine intrazelluläre Erhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) durch cAMP-Agonisten (Elks et al. 1983). Insulin (Chang und Polakis 1978) und Glukokortikoide (Asada et al. 2011) besitzen eine proadipogene Wirkung und auch direkte PPAR γ -Agonisten, wie antidiabetisch wirkende Thiazolidindione, fördern die terminale Adipozytenentwicklung (Tang et al. 2011).

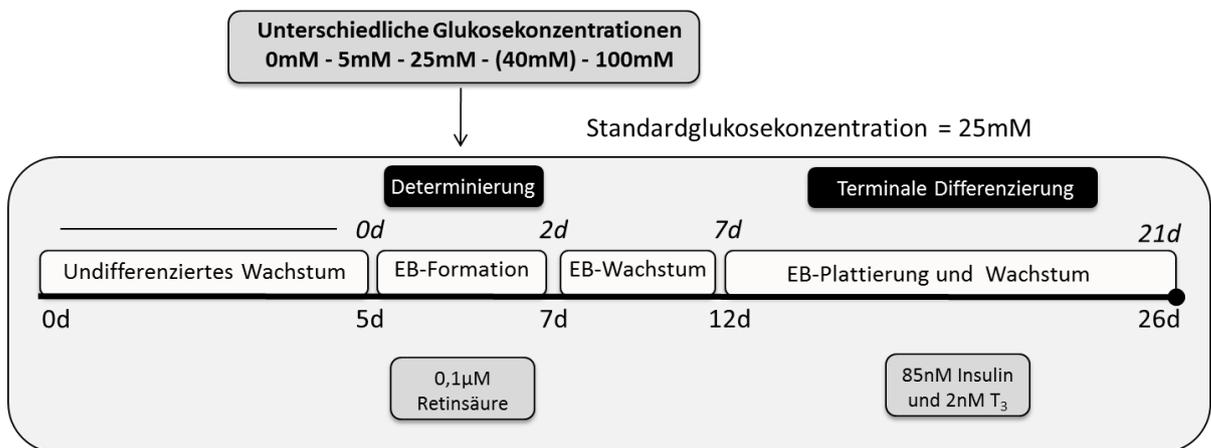


Abb.2 Schematische Darstellung des adipogenen Differenzierungsprotokolls der embryonalen Stammzelllinie CGR8 (d = Tage; EB = *embryoid body*; T₃=Trijodthyronin)

2.1.2 Kardiomyogene Differenzierung von embryonalen Karzinomzellen in vitro

Das Herz-Kreislauf-System ist das erste funktionsfähige Organsystem des jungen Feten. Aus dem kardiogenen Mesoderm entwickelt sich eine hufeisenförmige kardiogene Zone, aus der der primitive Herzschauch hervorgeht. Durch komplexe Faltungen und Schleifenbildungen entwickeln sich die Binnenräume des Herzens (vgl. Lehrbücher der Embryologie). Die weitere Herzentwicklung ist durch die Migration von Zellen der Neuralleiste, die Formierung von Herzklappen und Septen und durch die Entstehung des Erregungsleitungssystems und des Epikards charakterisiert (Harvey 2002). Dabei wird die Kardiomyogenese von einer Vielzahl an Transkriptionsfaktoren und extrazellulären Signalen induziert und reguliert. In mesodermalen Vorläuferzellen führt die Expression von *Brachyury*, *mesoderm posterior 1*, *GATA-binding protein 4*, *homeobox protein Nkx2.5* und *Isl1 transcription factor* zu Zellen der kardiogenen Linie (Masino et al. 2004; Laugwitz et al. 2008; Fuchs et al. 2011). Die Expression von Desmin fördert hierbei die Bildung von sich rhythmisch kontrahierenden Herzmuskelzellen über eine Hochregulation der Gene *Brachyury* und *Nkx2.5* (Hofner et al. 2007).

Kardiomyozyten sind wie Skelettmuskelzellen und glatte Muskelzellen mesodermalen Ursprungs, nehmen aber histologisch und funktionell eine Sonderstellung ein. Sie sind überwiegend mononukleär und zeigen einen verzweigten zellulären Gewebeaufbau, der über mechanische Haftkontakte und über *gap junctions* vermittelt wird. Das Herz besitzt ein autonomes Reizbildungs- und Erregungsleitungssystem, welches aus modifizierten Kardiomyozyten besteht (Lüllmann-Rauch 2003).

Die permanente ES-Zelllinie P19 wurde 1982 etabliert (McBurney und Rogers 1982). Dafür wurden embryonale Karzinomzellen aus einem Teratokarzinom gewonnen, das durch eine Injektion von embryonalen Zellen in extrauterine Gewebe entstanden war (Martin und Evans 1975). Die embryonalen Karzinomzellen der Linie P19 können ohne *feeder layer* embryonaler Maus-Fibroblasten kultiviert werden. Unter geeigneten Kulturbedingungen differenzieren embryonale P19-Zellen zu spontan pulsierenden Kardiomyozyten (McBurney 1993; Maltsev et al. 1994). Eine Exposition der P19-EC-Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) während der EB-Formation führt zur Ausbildung von Zentren mit spontan und synchron pulsierenden Kardiomyozyten, sog. schlagende Zentren/*beating cluster* (Abb.3). Die kontrahierenden Kardiomyozyten weisen biochemische und physiologische Eigenschaften ihrer embryonalen Äquivalente auf und

zeigen typische Charakteristika von frühen und vollständig differenzierten Herzmuskelzellen (Skerjanc 1999; Fijnvandraat et al. 2003).

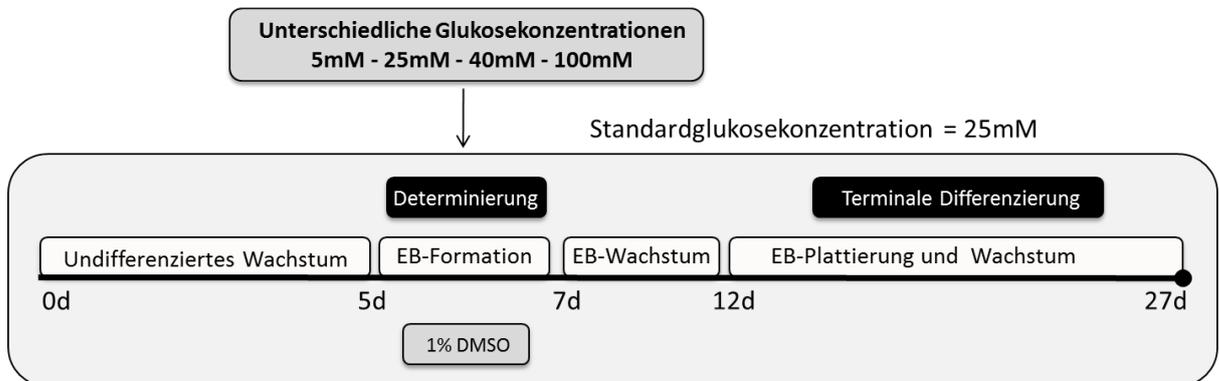


Abb.3 Schematische Darstellung des kardiomyogenen Differenzierungsprotokolls der embryonalen Karzinomzelllinie P19 (d = Tage; EB = *embryoid body*; DMSO = Dimethylsulfoxid)

2.2 Mechanismen der Prägung embryonaler Zellen

Epigenetische Veränderungen sind ein potentieller Mechanismus für die embryonale Prägung. Sie können, einmal erworben, zu langfristigen Veränderungen in der Genexpression beitragen, die z.B. eine Prädisposition für Erkrankungen im Erwachsenenalter schaffen (Jirtle und Skinner 2007).

Als epigenetische Modifikationen bezeichnet man stabile vererbare Änderungen in der Genaktivität. Sie umfassen die Weitergabe von Eigenschaften auf die Nachkommen, die nicht auf Abweichungen in der DNA-Nukleotidsequenz zurückzuführen sind. Veränderungen dieser Art werden durch nichtkodierende RNA-Moleküle, Methylierung der DNA und durch Histonmodifizierungen vermittelt (Moshe 2009).

Die am besten charakterisierte epigenetische Modifikation ist die Methylierung der DNA. Eine Methylierung der DNA erfolgt klassischerweise an der Position 5 der Base Cytosin in Cytosin- und Guanin-reichen Regionen (CpG-Inseln). Eine Methylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich eines Gens hemmt die Genexpression (Bernstein et al. 2007). Bemerkenswerterweise ist die Methylierung der DNA von der mütterlichen Ernährung abhängig und hat damit auch Auswirkungen auf den adulten Phänotyp (Waterland und Jirtle 2003; Sinclair et al. 2007). Bei Schafen, die vor der Befruchtung und während der frühen Embryonalentwicklung eine Diät mit einem reduzierten Gehalt an B-Vitaminen

erhielten, waren die männlichen Nachkommen dicker und schwerer und hatten einen veränderten DNA-Methylierungsstatus in der fetalen Leber (Sinclair et al. 2007).

Ein weiterer epigenetischer Mechanismus ist die Modifikation von Histonproteinen. Im eukaryotischen Nukleus liegt die DNA im Komplex mit Histonen vor und bildet das Chromatin. Posttranslationale Veränderungen der Histone führen zu Veränderungen der Chromatinstruktur und der Genexpression. Modifikationen werden an den N- und C-terminalen Enden der Histonproteine gefunden. Sie umfassen die Prozesse der Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und ADP-Ribosylierung, welche dann den dynamischen Wechsel zwischen dem transkriptionell aktiven oder inaktiven Zustand des Chromatins bestimmen (Jenuwein und Allis 2001). Die Wirkung dieser Modifikationen erfolgt zum einen über die direkte Beeinflussung der Wechselwirkungen mit der negativ geladenen DNA. Zum anderen erfolgt eine Erkennung bestimmter Histonmodifikations-Muster durch Proteine, die wiederum spezifische nachgeschaltete Effekte hervorrufen. Dieser Mechanismus wird unter dem Begriff „Histon-Code“ zusammengefasst (Strahl und Allis 2000). Diese Prozesse können auch durch die Ernährung in der Schwangerschaft beeinflusst werden (Delage und Dashwood 2008; Guerrero-Bosagna und Skinner 2011), wie folgende Beispiele zeigen: Eine cholinreiche Diät der Mutter zwischen Tag 11 bis 17 der Schwangerschaft erhöht bei Ratten die Methylierung an dem Histon H3 (H3K9me2 und H3K27me3) in der fetalen Leber und im Gehirn, was wiederum zur Bildung von transkriptionell inaktivem Heterochromatin führt (Davison et al. 2009). Ein Proteinmangel während der Schwangerschaft resultiert bei weiblichen Ratten in vermehrten Acetylierungen und Methylierungen der Histone H3 und H4. Diese Veränderungen treten im Skelettmuskel innerhalb der Promotorregion des Glukosetransporters 4 auf (Zheng et al. 2011). Eine Ernährung mit einem erhöhten Fettanteil (35% der Kalorien stammen aus Fett) während der Schwangerschaft führt bei Japanmakaken zu einer Hyperacetylierung der Histone H3K14, H3K9 und H3K18 sowie einem Anstieg der hepatischen Triglyzeride in der fetalen Leber der Nachkommen (Raychaudhuri et al. 2008).

Nichtkodierende RNA-Moleküle, zu denen microRNAs (miRNAs) zählen, spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der epigenetischen Kontrolle der Genexpression (Guil und Esteller 2009). Sie sind sowohl in die Methylierung der DNA involviert als auch in die Modifikation

von Histonen. Mäuse, denen ein essentielles Enzym der miRNA-Biogenese, Dicer, fehlt (siehe 1.2.1), zeigen eine verringerte DNA-Methylierung (Benetti et al. 2008). Auch die posttranskriptionelle Regulation von chromatinmodifizierenden Enzymen obliegt der miRNA-Kontrolle (Guil und Esteller 2009). Unterschiede im fetalen Wachstum sind mit Veränderungen in der plazentaren miRNA-Expression assoziiert und lassen auch hier einen Zusammenhang zwischen miRNA-Expression und pränataler Prägung von Erkrankungen im Erwachsenenalter erkennen (Maccani et al. 2011).

2.2.1. Funktion und Biogenese von microRNAs

MicroRNAs (miRs/miRNAs) sind einzelsträngige, nicht kodierende RNA-Moleküle mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden, die eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Genexpressionsregulation spielen. Die Bindung von miRs an eine Ziel-mRNA führt zur mRNA-Degradation oder zur Translationshemmung. MiRs wurden zuerst im Jahr 1993 in der Nematode *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Lee et al. 1993). Seither wird immer mehr über ihre Bedeutung als wichtige Regulatoren in verschiedenen biologischen Prozessen bekannt. MiRs sind zwischen den Spezies hochkonserviert. Momentan sind 1424 humane miRNAs bekannt (http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa; miRBase Version 17) (Kozomara und Griffiths-Jones 2011). Es wird vermutet, dass über 60% der menschlichen Gene durch eine oder mehrere miRNAs reguliert werden können (Friedman et al. 2009).

MiRs werden gewebs- und entwicklungsspezifisch exprimiert und ihre Sequenzabschnitte sind in nicht kodierenden DNA-Bereichen lokalisiert. Ein Teil der miRNAs liegt als Gruppen vor und werden gemeinsam transkribiert. Die Transkription dieser miRs erfolgt hauptsächlich über die RNA-Polymerase II, wobei zuerst ein Primärtranskript, die sogenannten *primary* miRs (pri-miRs), entstehen (Lee et al. 2004). Pri-miRs besitzen eine Länge von ca. 500 - 3000 Nukleotiden, sind am 3'-Ende polyadenyliert und haben ein 3-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende. Sie werden von dem Mikroprozessor-Komplex, dessen katalytische Untereinheit aus den Proteinen Drosha und DGCR8 besteht, erkannt (Gregory et al. 2004). Andere miRs wiederum stammen aus Introns von mRNA-kodierenden Regionen (Rodriguez et al. 2004). Diese sogenannten „mirtons“ werden nach dem Spleißen unabhängig von Drosha autonom prozessiert (Okamura et al. 2007). Die

durch die Prozessierung entstandenen *precursor* miRs (pre-miRs) sind nur noch ca. 70 Nukleotide lang und bilden eine charakteristische Haarnadelstruktur (Gregory et al. 2004). Alle pre-miRs werden, unabhängig von der Art ihrer Entstehung, aktiv ins Zytoplasma geschleust. Dort wird aus einer pre-miR mithilfe eines weiteren Enzyms, Dicer, ein doppelsträngiger RNA-Duplex gebildet (Hutvágner et al. 2001). Nach Inkorporation in den „*RNA-induced silencing complex*“ (RISC) wird zuerst der Doppelstrang entwunden. Es entstehen ein reifer miRNA-Strang und ein Gegenstrang, welcher schnell abgebaut wird und in den meisten Fällen keine regulatorische Funktion hat (Khvorova et al. 2003). Vermittelt über den RISC-Komplex, kann die miRNA auf zwei Wegen modulatorisch wirken: Je nach Komplementarität zwischen miRNA und mRNA und in Abhängigkeit von RNA-bindenden Proteinen wird bei perfekter Basenpaarung die mRNA degradiert, ansonsten wird die mRNA-Translation unterdrückt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass dabei die mRNA-Degradation den größeren Anteil an der Kontrolle der Proteinexpression hat (Guo et al. 2010).

2.2.2. *MicroRNAs in embryonalen Stammzellen und Adipozyten*

In embryonalen Stammzellen (ESC) sind miRNAs für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung notwendig (Marson et al. 2008; Judson et al. 2009). ESC, denen essentielle Enzyme der miRNA-Biogenese, Dicer und DCGR8, fehlen (siehe 1.3.1), sind in der Differenzierung wie auch in der Proliferation gestört (Kanellopoulou et al. 2005; Murchison et al. 2005; Wang et al. 2007). In Stammzellen macht das stammzellspezifische miR-290 Cluster mit über 70% den größten Anteil dieser miRNAs aus (Marson et al. 2008). Ein Zielgen des miR-290 Clusters ist die NF- κ B Untereinheit p65. Durch die miRNA-vermittelte Translationsreprimierung von p65 wird die Pluripotenz der ESC aufrechterhalten und die Differenzierung gehemmt (Lüningschrör et al. 2012).

Zusätzlich zu den stammzellspezifischen miRNAs wurden miRNAs identifiziert, die in die Regulation der Zelldeterminierung eingreifen (Ivey et al. 2008; Stefani und Slack 2008). Aktuelle Studien zeigen, dass miRNAs auch für die erfolgreiche Differenzierung von Adipozyten verantwortlich sein können und wichtige Transkriptionsfaktoren während der Adipogenese regulieren (Alexander et al. 2011; Romao et al. 2011). Dabei greifen miRNAs bei allen Differenzierungsschritten ein und können, vermittelt über ihre Zielgene, sowohl

einen proadipogenen als auch einen antiadipogenen Effekt aufweisen (Xie et al. 2009).
Ein Überblick über experimentell validierte adipogene miRNAs gibt Tabelle 1.

Tab.1 Übersicht bekannter, an der Regulation der Adipogenese beteiligter, microRNAs.
miRNA/miR: microRNA; HMGA2: *high-mobility group AT-hook 2*; PPAR α/γ : *peroxisome proliferator-activated receptor α/γ* ; ERK: *extracellular signal regulated kinase*; EID 1: *adenovirus early region 1-A-like inhibitor of differentiation 1*; KLF: *Krüppel-like factor*; PAI-1: *Plasminogen activator inhibitor-1*; ALK2: *Activin A receptor type 1*; RUNX2: *Runt-related transcription factor 2*

miRNA	Modell	Zielgen	Wirkung in der Adipogenese	Quelle
miR 17-92	Murine Präadipozyten	Rb2/p130	proadipogen	(Wang et al. 2008)
miR-let-7	Murine Präadipozyten	HMGA2	antiadipogen	(Sun et al. 2009)
miR-27a/b	Murine Präadipozyten	PPAR γ	antiadipogen	(Lin et al. 2009)
miR-448	Murine Präadipozyten	KLF5	antiadipogen	(Kinoshita et al. 2010)
miR-375	Murine Präadipozyten	ERK1/2	proadipogen	(Ling et al. 2011)
miR-143	Humane Präadipozyten	ERK5	proadipogen	(Esau et al. 2004)
miR-130	Humane Präadipozyten	PPAR γ	antiadipogen	(Lee et al. 2011)
miR-519d	Humane Präadipozyten	PPAR α	proadipogen	(Martinelli et al. 2010)
miR-138	Humane mesenchymale Stammzellen	EID1	antiadipogen	(Yang et al. 2011)
miR-27b	Humane mesenchymale Stammzellen	PPAR γ	antiadipogen	(Karbiener et al. 2009)
miR-30c	Humane mesenchymale Stammzellen	PAI-1; ALK2	proadipogen	(Karbiener et al. 2011)
miR-30a miR-30d	Humane mesenchymale Stammzellen	RUNX2	proadipogen	(Zaragosi et al. 2011)

Alle diese Studien weisen auf die wichtige Rolle von miRNAs in der Stammzellendifferenzierung und Adipozytenreifung hin.

In dieser Arbeit wurde die adipogene Differenzierung von embryonalen Stammzellen der Linie CGR8 genutzt, um die komplexe miRNA-Regulation in einem Modell, das alle Differenzierungsschritte umfasst, näher zu charakterisieren. Zusätzlich wurde der Einfluss einer kurzzeitigen Glukoseexposition auf die miRNA-Regulation untersucht (Knelangen et al. 2011).

3. Zielstellungen der Arbeit

Die Stammzellendifferenzierung *in vitro* erlaubt die Aufklärung kausaler Beziehungen zwischen definierten Entwicklungsbedingungen und deren langfristige Auswirkungen in einem hochstandardisierten Experimentalmodell. In diesem Zellmodell wurde die Frage nach dem Einfluss einer metabolischen Programmierung in der Embryonalentwicklung auf die Entstehung von Zivilisationskrankheiten wie Diabetes mellitus und Adipositas gestellt und experimentell nachgeahmt. Folgende Fragen galt es dabei zu beantworten:

- Welche Phase der Differenzierung ist für eine metabolische Dysregulation empfindlich und ab wann manifestieren sich Störungen während der weiteren Entwicklung?
- Welche Rolle spielt Glukose als wichtiger Metabolit und als Energiesubstrat?
- Welche entwicklungspezifischen Ursachen und Wirkmechanismen einer längerfristigen metabolischen Veränderung können erkannt und weiter untersucht werden?

Um die Fragen zu beantworten, wurden zwei embryonale Zellsysteme genutzt: die *in vitro* Differenzierung von P19-ECC zu Kardiomyozyten und von CGR8-ESC zu Adipozyten.

Die Experimente und Ergebnisse zur kardiomyogenen Zelldifferenzierung sind in der Publikation "*Short-time glucose exposure of embryonic carcinoma cells impairs their function as terminally differentiated cardiomyocytes*" beschrieben (Knelangen et al. 2012). Die Resultate zur adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC werden im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt (siehe 5.1).

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war es, das globale miRNA-Expressionsmuster während der Adipogenese zu charakterisieren. Im Einzelnen wurden dazu folgende Fragen gestellt:

- Welche miRNA wird zu welchem Zeitpunkt während der adipogenen Differenzierung exprimiert?
- Welche miRNAs sind kennzeichnend für embryonale Stammzellen?
- Welche spezifischen miRNAs regulieren bestimmte Differenzierungsphasen und was sind ihre potentiellen Zielgene?

- Gibt es miRNAs, die mitverantwortlich für die von uns gefunden metabolische Prägung embryonaler Zellen durch Glukose sind?

Die erzielten Ergebnisse sind in der Publikation „*MicroRNA expression profile during adipogenic differentiation in mouse embryonic stem cells*“ zusammengefasst und diskutiert (Knelangen et al. 2011).

Die für diese Untersuchungen verwendete adipogene Differenzierung der murinen embryonalen Stammzelllinie CGR8 (Dani et al. 1997) rekapituliert alle Schritte der Adipogenese und ist besonders gut für die Analyse der ersten Differenzierungsstufen geeignet. Trotz der Zugabe proadipogener Faktoren (siehe 1.2.1) ist die adipogene Differenzierungseffizienz insgesamt aber variabel und macht nur einen geringen Prozentsatz aus. Am Ende der Differenzierung ist die erhaltene Zellpopulation heterogen. Die zuverlässige Trennung von terminal differenzierten Zellen (in diesem Falle Adipozyten) ist somit ein kritischer Punkt bei Differenzierungsmodellen von Stammzellen. Bis jetzt sind keine adipozytenspezifische Oberflächen-Antikörper für die Durchflusszytometrie (*fluorescent activated cell sorting*; FACS) bekannt. Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, mit der man innerhalb der CGR8-Zellkultur terminal differenzierte Adipozyten von undifferenzierten Zellen unterscheiden kann. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode wird in der Publikation „*A simple method to sort ESC-derived adipocytes*“ beschrieben (Schädlich et al. 2010).

In der Arbeit „*Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows*“ wurden das Zellsystem und die 2010 beschriebene Adipozytenseparation zur Bewertung der Embryotoxizität von Umweltchemikalien erfolgreich eingesetzt (Biemann et al. 2012).

4. Originalarbeiten

- 4.1 Julia Knelangen, Randy Kurz, Undraga Schagdarsurengin, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos (2012). *"Short-time glucose exposure of embryonic carcinoma cells impairs their function as terminally differentiated cardiomyocytes."* Biochemical and Biophysical Research Communications 420: 230-235
- 4.2 Julia Knelangen, Mark van der Hoek, Wee-Ching Kong, Julie Owens, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos (2011). *"MicroRNA expression profile during adipogenic differentiation in mouse embryonic stem cells."* Physiological Genomics 43(10): 611-620.
- 4.3 Kristina Schädlich und Julia Knelangen, Alexander Navarrete Santos, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos (2010). *"A simple method to sort ESC-derived adipocytes."* Cytometry A 77(10): 990-995.
- 4.4 Ronald Biemann und Anne Navarrete Santos, Alexander Navarrete Santos, Dagmar Riemann, Julia Knelangen, Matthias Blüher, Holger Koch und Bernd Fischer (2012). *"Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows."* Biochemical and Biophysical Research Communications 417(2): 747-752.

Die Manuskripte werden durch die Herausgeber online publiziert. Sie sind unter den angegebenen DOI-Links erreichbar.

Short-time glucose exposure of embryonic carcinoma cells impairs their function as terminally differentiated cardiomyocytes.

Julia Knelangen, Randy Kurz, Undraga Schagdarsurengin, Bernd Fischer und Anne Navarrete Santos (2012)

Biochemical and Biophysical Research Communications 420: 230-235

DOI:10.1016/j.bbrc.2012.02.105 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.105>

Online-Version via www.journals.elsevier.com/biochemical-and-biophysical-research-communications/

Abstract

The fetal and postnatal phenotype is influenced by developmental conditions experienced prenatally. Among prenatal development metabolic factors are of particular importance as they are supposed to predispose for pathophysiological alterations later in life and to pioneer functional impairment in senescence (metabolic programming). Till now the mechanisms of metabolic programming are not well understood. We have investigated various concentrations of glucose during differentiation of pluripotent P19 embryonic carcinoma cells (ECC) into cardiomyocytes. Undifferentiated P19 cells were exposed to 5mM (low), 25 mM (control), 40 mM or 100mM (high) glucose for 48 h during embryoid body (EB) formation, followed by plating and differentiation into cardiomyocytes in vitro with standard glucose supplementation (25 mM) for 10-15 days. The amount of cardiac clusters, the frequency of spontaneous beatings as well as the expression of metabolic and cardiac marker genes and their promoter methylation were measured. We observed a metabolic programming effect of glucose during cardiac differentiation. Whereas the number of beating clusters and the expression of the cardiac marker alpha myosin heavy chain (α -MHC) were comparable in all groups, the frequencies of beating clusters were significantly higher in the high glucose group compared to low glucose. However, neither the insulin receptor (IR) or insulin like growth factor 1 receptor (IGF1R) nor the metabolic gene glucose transporter 4 (GLUT4) were influenced in RNA expression or in promoter methylation. Our data indicate that a short time glucose stress during embryonic cell determination leads to lasting effects in terminally differentiated cell function.

MicroRNA expression profile during adipogenic differentiation in mouse embryonic stem cells.

Julia Knelangen, Mark van der Hoek, Wee-Ching Kong, Julie Owens, Bernd Fischer
und Anne Navarrete Santos (2011)
Physiological Genomics 43(10): 611-620.

DOI: 10.1152/physiolgenomics.00116.2010 <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00116.2010>

Online-Version via <http://physiolgenomics.physiology.org/>

Abstract

Pluripotent embryonic stem cells (ESC) have the potential to differentiate into any cell type of the three germ layers. Differentiation processes depend on genetic and epigenetic factors. The guidance of cell fate determination by microRNAs (miRs) seems important for embryonic development and cell lineage decisions. MiRs are short, single-stranded, noncoding RNA molecules that regulate through posttranscriptional modulation, a subset of target genes involved in cell differentiation and specific cell function. We have used microarray profiling of miRs in the mouse embryonic stem cell line CGR8. Comparison of the miR profiles of undifferentiated stem cells with mesodermal progenitors cells (day 5), preadipocytes (day 10), and adipocytes (day 21) showed that the expression level of 129 miRs changed (twofold) during adipogenic differentiation. We identified 10 clusters of differentially expressed miRs, which contain putative markers and regulators of mesodermal differentiation and cell fate determination into adipocytes. Notably, the adipocyte-specific miRs 143 and 103 were upregulated from day 10 onward. We have therefore demonstrated and characterized the dynamic profile of miR expression during murine adipogenic differentiation in vitro, including the initial differentiation from ESC via mesenchymal progenitors up to adipocytes. Our findings and experimental approach provide a suitable system to directly interrogate the role of miRs during adipogenic differentiation of embryonic stem cells.

A simple method to sort ESC-derived Adipocytes.

Kristina Schädlich und Julia Knelangen, Alexander Navarrete Santos, Bernd Fischer
und Anne Navarrete Santos (2010).
Cytometry A 77(10): 990-995.

DOI: 10.1002/cyto.a.20953 <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20953>

Online-Version via <http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/%28ISSN%291552-4930>

Abstract

Because of the increasing incidence of worldwide obesity, cell culture models which enable the study of adipose tissue development are of particular importance. The murine embryonic stem cell (ESC) line CGR8 differentiates into adipocytes with a differentiation efficiency of up to 15%. A critical step for the analysis of stem cell-derived adipogenesis is the reliable separation of adipocytes. Here we report on how to (i) gently separate the cells of embryoid bodies (EBs) and (ii) identify and sort adipocytes from the rest of the heterogeneous cell mixture. Up to the present, no adipocyte specific surface marker is known for fluorescence activated cell sorting (FACS). After separation we employed two independently existing FACS methods for adipocyte cell sorting. These methods are based on Nile red staining and granularity. For stem cell-derived adipocytes only the combination of both methods led to a reliable, efficient, and highly reproducible FACS analysis, as shown by the presence and absence of adipocyte specific markers in positively and negatively sorted cells.

Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows.

Ronald Biemann und Anne Navarrete Santos, Alexander Navarrete Santos, Dagmar Riemann, Julia Knelangen, Matthias Blüher, Holger Koch und Bernd Fischer (2012)

Biochemical and Biophysical Research Communications 417(2): 747-752.

DOI: [10.1016/j.bbrc.2011.12.028](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.028) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.028>

Online-Version via www.journals.elsevier.com/biochemical-and-biophysical-research-communications/

Abstract

Endocrine disrupting chemicals (EDC) like bisphenol A (BPA), bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and tributyltin (TBT) are ubiquitously present in the environment and in human tissues. They bind to nuclear hormone receptors and affect cellular and developmental processes. In this study, we show that BPA, DEHP and TBT affect the adipogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells (MSC, C3H/10T1/2) in a concentration-, stage- and compound-specific manner. C3H/10T1/2 cells and embryonic stem cells (CGR8) were exposed to BPA, DEHP or TBT at different stages of cell determination and differentiation (undifferentiated growth, adipogenic induction and terminal adipogenic differentiation). The final amount of differentiated adipocytes, cellular triglyceride content and mRNA expression of adipogenic marker genes (adiponectin, FABP4, PPAR γ 2, LPL) were quantified and compared with corresponding unexposed cells. BPA (10 μ M) decreased subsequent adipogenic differentiation of MSC, when cells were exposed during undifferentiated growth. In contrast, DEHP (100 μ M) during the hormonal induction period, and TBT (100 nM) in all investigated stages, enhanced adipogenesis. Importantly, exposure of undifferentiated murine embryonic stem cells did not show any effect of the investigated EDC on subsequent adipogenic differentiation.

5. Ergebnisse und Diskussion

Die Inzidenz an Zivilisationskrankheiten, die unter dem Ausdruck „Metabolisches Syndrom“ zusammengefasst werden, und zu denen unter anderem Adipositas und Diabetes mellitus Typ II gehören, nimmt weltweit zu. Folgeerscheinungen sind unter anderem kardiovaskuläre Erkrankungen, die in den Industrienationen neben den Krebserkrankungen die höchste Mortalität aufweisen (WHO: *The Global Status Report on Noncommunicable Diseases* 2010). Als Ursache für die Zunahme werden neben Ernährungs- und *life style*-Faktoren pränatale epigenetische Prägungen angesehen, die durch metabolische Einflussfaktoren während der Schwangerschaft ausgelöst werden.

5.1 Metabolische Prägung embryonaler Zellen

Ein kritischer Punkt im Stoffwechsel ist die Verfügbarkeit von Glukose. Ein bekanntes Beispiel ist der Gestationsdiabetes, bei dem die maternale Hyperglykämie während der Schwangerschaft zu Veränderungen bei den Neugeborenen führt. Es kommt zu einer Erhöhung des Geburtsgewichtes mit einem Anstieg des Körperfettanteils (Catalano et al. 2012). Bereits von dem Blastozystenstadium an ist Glukose das hauptsächliche Energiesubstrat des frühen Embryos (Martin und Leese 1995). Die Glukose erreicht den Embryo anfangs über das mütterliche Uterussekret, später über die Plazenta. Die intrauterine Glukosekonzentration korreliert direkt mit dem maternalen Blutzuckerspiegel. So wurden in diabetischen Kaninchen eine dreifache Erhöhung der intraluminalen Glukosekonzentration im Vergleich zu den physiologischen Konzentrationen bei gesunden Tieren gefunden (Ramin et al. 2010). Für den Glukosetransport sind verschiedene Glukosetransporter (GLUT/SLC2A) verantwortlich, die eine erleichterte Diffusion ermöglichen. Die Oozyte und der Embryo verfügen über eine breite Palette von notwendigen Glukosetransportern (Pantaleon und Kaye 1998; Navarrete Santos et al. 2004), über die der Embryo Glukose aufnimmt (Hardy et al. 1989). In P19-EC-Zellen und in P19-EBs werden die Glukosetransporter 1, 3, 4 und 8 exprimiert (Tonack et al. 2007).

Der Embryo ist in der Lage gewisse Glukoseschwankungen zu tolerieren, aber sowohl hyperglykämische Bedingungen als auch ein Glukosemangel haben für den Embryo schwerwiegende Folgen (Moley et al. 1996; Leppens-Luisier et al. 2001; Moley 2001; Fraser et al. 2007). So kann ein Diabetes mellitus während der Oogenese, der Befruchtung

und den ersten Furchungsstadien zu bleibenden morphologischen Veränderungen bei den Nachkommen führen (Wyman et al. 2008).

Wir haben in einem kardiomyogenen Differenzierungsmodell mit embryonalen Karzinomzellen der Linie P19 (P19-ECC) eine metabolische Prägung embryonaler Zellen durch Glukose beobachtet. Dabei führte bereits eine kurzzeitige Kultivierung der P19-ECC mit hohen Glukosekonzentrationen während der *embryoid body* (EB)-Formation zu einer veränderten Kontraktilität bei den terminal differenzierten Kardiomyozyten (Knelangen et al. 2012). Die EB-Formation erfasst die Determinierungsphase, in der die Anlage der drei Keimblattderivate stattfindet.

Auch in embryonalen Stammzellen der Linie CGR8 (CGR8-ESC) veränderte sich die adipogene Differenzierung unter dem Einfluss von Glukose. Kultivierte man diese Zellen während der Determinierungsphase unter hypoglykämischen Bedingungen, zeigten sich am Endpunkt der adipogenen Differenzierung signifikant weniger Adipozyten als unter Standardkulturbedingungen (Abb. 4a). Dieser Effekt trat nicht auf, wenn man die undifferenzierten CGR8-ESC mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen behandelte (Abb. 4b).

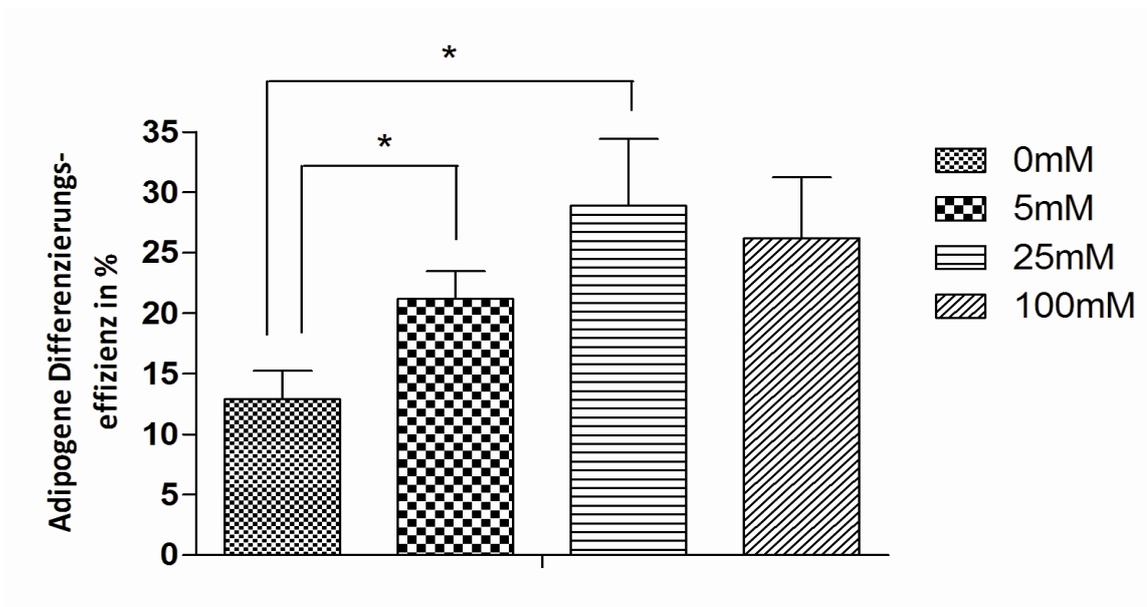


Abb.4a Relative Menge reifer Adipozyten nach 21 Tagen adipogener Differenzierung von CGR8-ESC bei einer Glukoseexposition während der Determinierungsphase. Die Zellen wurden für 2 Tage während der Determinierungsphase mit 0, 5, 25, 100mM Glukose kultiviert (siehe Abb.2). Die Kultur in der undifferenzierten Wachstumsphase und während der Differenzierung erfolgte unter Standardglukosebedingungen von 25mM. Am Kulturtag 21 (d 21) wurde die Anzahl reifer Adipozyten [MW in % ± Standardfehler] in den einzelnen Versuchsgruppen mittels FACS-Analyse bestimmt (Schädlich et al. 2010). N=4, * p < 0.05

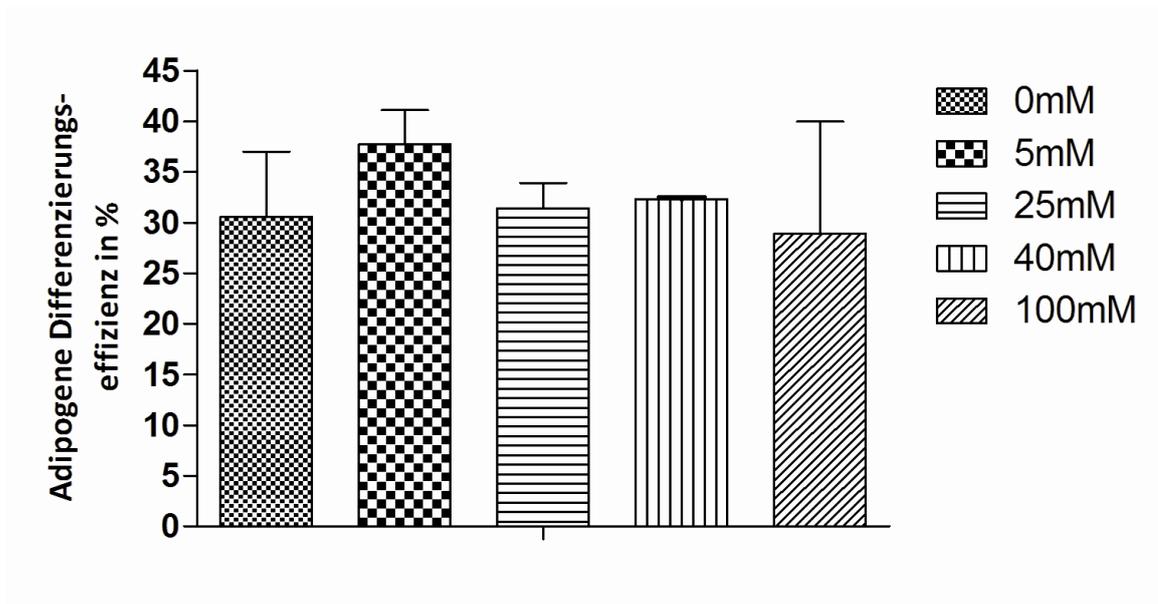


Abb.4b Relative Menge reifer Adipozyten nach 21 Tagen adipogener Differenzierung von CGR8-ESC bei einer Glukoseexposition der undifferenzierten Stammzellen.

Die Zellen wurden für 5 Tage während des undifferenzierten Wachstums mit 0, 5, 25, 100mM Glukose kultiviert (siehe Abb.2). Die Kultur während der Differenzierung erfolgte unter Standardglukosebedingungen von 25mM. Am Kulturtag 21 (d 21) wurde die Anzahl reifer Adipozyten [MW in % \pm Standardfehler] in den einzelnen Versuchsgruppen mittels FACS-Analyse bestimmt (Schädlich et al. 2010).

N=3, keine statistisch signifikanten Unterschiede

5.1.1 Bestimmung der adipogenen Differenzierungseffizienz

Die zuverlässige Auswertung und Trennung differenzierter Zellen von undifferenzierten Vorläufern oder anderen Zelltypen ist ein limitierender Schritt in der embryonalen Stammzell-Technologie. Die Etablierung einer Methode zur Bestimmung von Adipozyten in heterogenen Zellpopulationen war eine Voraussetzung für die Anwendung des CGR8-Modells in dieser Arbeit. Die Anzahl an terminal differenzierten Adipozyten wurde dabei mittels *fluorescent activated cell sorting* (FACS) bestimmt (Schädlich et al. 2010). Erst dadurch konnte eine quantitative Bewertung von Kultureffekten auf die adipogene Differenzierung erfolgen.

Für eine FACS-Analyse ist eine Einzelzellsuspension unabdingbar. Aufgrund der dreidimensionalen Struktur der *embryoid bodies* (EB) wurden bisher bei einer starken Enzymbehandlung nur die äußeren Zellschichten zerstört, während im Inneren des EBs sich die Zellen nicht trennten. Wir haben deshalb dafür eine neue Methode entwickelt, die auf einer milden Enzymbehandlung mit Papain und einer anschließenden mechanischen Homogenisierung beruht. Dabei entstehen aus den EBs vitale Einzelzellen, ohne dass die Zellen mit stark proteolytischen Enzymen wie Trypsin oder Kollagenase behandelt werden müssen.

Bei der FACS-Analyse wurden die Parameter I) Anfärbung durch den fettspezifischen Farbstoff *nile red* und II) erhöhte Granularität eingesetzt. Die positiv sortierten Zellen zeigen einen größeren Zelldurchmesser, eine erhöhte *nile red*-Emission und Lipidtropfen im Inneren der Zellen. Um den adipogenen Charakter der positiv sortierten Zellen zu verifizieren, wurde die Transkriptmenge der adipogenen Markergene Adipsin, Adiponektin und Leptin mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) gemessen. Alle drei Gene waren in den positiv sortierten Zellen höher exprimiert und konnten in den negativ sortierten Zellen nicht oder nur in einem geringeren Maße detektiert werden (Schädlich et al. 2010).

5.1.2 Embryonale Stammzellendifferenzierung als Modell für die Untersuchung einer metabolischen Prägung

Die gewählten Glukosekonzentrationen (0mM, 5mM, 40mM, 100mM) stellen für die Zellen eine metabolische Belastung dar, da embryonale Stammzellen routinemäßig bei 25mM Glukose kultiviert werden (Chang und Zandstra 2004). Das entspricht zwar nicht dem physiologischen Blutzuckerspiegel im Serum (zwischen 4-6mM), aber für die Aufrechterhaltung der stammzellspezifischen Eigenschaften im undifferenzierten Stadium gilt diese Glukosekonzentration (25mM) als optimal. Ob es wirklich notwendig ist, embryonale Stammzellen mit einem so hohem Glukosegehalt im Medium zu differenzieren oder ob es nicht sogar die Differenzierung negativ beeinflusst, wird immer wieder kontrovers diskutiert (Khoo et al. 2005; Kim et al. 2006; Kim und Han 2008). Andere Studien zeigen, dass eine hohe Glukosekonzentration für eine erfolgreiche Differenzierung notwendig ist (Macfarlane et al. 1999; Guillemain et al. 2007).

Wir haben die embryonalen Stammzellen als ein Modell für eine metabolische Programmierung genutzt und gezeigt, dass es sich hierfür sehr gut eignet. Um hyperglykämische Entwicklungsbedingungen zu simulieren, wurden die Glukosekonzentrationen 40mM und 100mM ausgewählt. Der starke Anstieg des Blutzuckerspiegels ist eine bekannte pathophysiologische diabetische Stoffwechsellage. In Extremsituationen kann der Plasmaglukosespiegel Konzentrationen von über 1000mg/dl (56mM) erreichen (Süfke et al. 2010). Da Zellen diesem Milieu im Körper ausgesetzt werden können, wurden diese hohen Glukosekonzentrationen zur Nachahmung eines pathophysiologischen Zustandes gewählt. Obwohl kritisch angemerkt werden muss, dass es sich bei den Zellmodellen um *in vitro* Systeme handelt, die nur begrenzt die embryonale Entwicklung reflektieren können, gibt es ausreichend Belege, die zeigen, dass die *embryoid body*-Formierung ein geeignetes und leicht zugängliches Model ist, um frühe, zellspezifische Differenzierungsschritte nachzuvollziehen (Izumi et al. 2007; ten Berge et al. 2008). Unsere Studien lassen den Schluss zu, dass embryonale Stammzellen während der Determinierung sensitiv auf Glukose reagieren.

Auch in einer anderen Studie, in der mesenchymale Stammzellen der Linie C3H/10T1/2 mit endokrinen Disruptoren wie Bisphenol A (BPA), bis(2-ethylhexyl)-Phthalat (DEHP) und Tributyltin (TBT) behandelt wurden, haben wir zeigen können, dass diese Umweltchemikalien nur in spezifischen Entwicklungsabschnitten einen Einfluss auf die

spätere adipogene Differenzierung der Zellen nehmen (Biemann et al. 2012). Bei der Prägung von Stammzellen gibt es also bestimmte frühe Entwicklungszeitfenster, in denen sie besonders empfindlich gegenüber äußeren Faktoren sind und deren Einfluss sich nicht unmittelbar zeigt, sondern erst später manifestiert. Diese Beobachtungen legen eine epigenetische Grundlage nahe.

5.2 Mechanismen einer metabolischen Prägung

5.2.1 Das Insulin-/IGF-Rezeptor-System

Um die zugrunde liegenden Mechanismen der beobachteten Prägung aufzuklären, wurde die Expression und die Promotormethylierung von Genen des Insulin-/IGF-Rezeptor-Signalweges sowie des Glukosetransporters 4 (*Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4: GLUT4/SLC2A4*) untersucht. Das Hormon Insulin, die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF1, 2), deren Rezeptoren (Insulinrezeptor: IR; *insulin-like growth factor receptor: IGF-R*) und Bindeproteine gehören zum IR/IGF-R-System, das eine zentrale Rolle in der Regulation von Entwicklung, Wachstum und Stoffwechsel hat. Diese Hormone sind im uterinen Milieu präsent und verändern sich durch eine Vielzahl metabolischer, endokriner und neuronaler Stimuli (Fowden und Forhead 2008). Störungen in diesem Netzwerk, das eine der Hauptkomponenten in der embryo-maternalen Interaktion während der Präimplantationsphase darstellt, führen zu langfristigen metabolischen Erkrankungen wie Adipositas und Diabetes mellitus. Aber auch kurzfristig ist ein intaktes Insulin-/IGF-Rezeptor-System für eine korrekte Prä- und Postimplantationsentwicklung unabdingbar (Ramin et al. 2010). Der insulinabhängige Glukosetransport via GLUT4 spielt bei pränatal geprägten Krankheiten eine wichtige Rolle. Bei einer intrauterinen Wachstumsverzögerung (*intrauterine growth restriction: IUGR*) kommt es zu einer Abnahme der Proteinexpression und der mRNA-Expression des GLUT4 im Skelettmuskel. Dies wurde sowohl bei Ratten (Thamotharan et al. 2005) als auch beim Menschen (Ozanne et al. 2005) nachgewiesen.

Weder in P19-Zellen (Knelangen et al. 2012) noch während der adipogenen Differenzierung von CGR8-Zellen (Daten nicht gezeigt) konnte eine Auswirkung einer kurzzeitigen Glukoseexposition auf die Expression des Insulinrezeptors oder des IGF-Rezeptors nachgewiesen werden. Lediglich die GLUT4-Expression stieg an Tag 5+5 bei P19-ECC nach 2-tägiger Kultur mit 5mM Glukose signifikant an (Knelangen et al. 2012).

5.2.2 DNA-Methylierung

Auch die Promotormethylierung der Gene IR, IGF1-R und GLUT4 änderte sich nicht durch den Glukoseeinflusses in den P19-ECC (Knelangen et al. 2012) und CGR8-ESC (siehe Tab. 2). Werden CpG-Inseln im Genpromotor methyliert, wird die Genexpression nachweislich verringert (Bernstein et al. 2007).

Tab.2 Tabellarische Übersicht des Methylierungsstatus ausgewählter CpGs in den Promotorregionen von GLUT4, IGF1-R und IR während der adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC (unveröffentlichte Ergebnisse).

non = es wurde keine Methylierung in der analysierten Region gefunden.

met = alle analysierten CpG-Stellen waren methyliert.

Gene		GLUT4	IGF1-R	IR
		#12-CpG-	#18-CpG-	#2-CpG-
Proben				
	Undifferenzierte CGR8-ESC		non	non
EB 10d	5mM	non	non	met
	25mM	non	non	met
	40mM	non	non	met
	100mM	non	non	met
EB 21d	5mM	non	non	met
	25mM	non	non	met
	40mM	non	non	met
	100mM	non	non	met

Mehrere Studien haben jedoch belegt, dass es zu Unterschieden in der Promotormethylierung dieser Zielgene kommen kann. Yokomori et al. haben während der adipogenen Differenzierung von murinen 3T3-L1-Zellen festgestellt, dass eine Methylierung von spezifischen CpG-Regionen im GLUT4-Promotorbereich zusammen mit methylierungsspezifischen Transkriptionsfaktoren die Transkription von GLUT4 regulieren kann. Zudem nimmt die GLUT4-Promotormethylierung während der Differenzierung vom Präadipozyten zum Adipozyten ab (Yokomori et al. 1999). Ruegg et al. zeigten die Beteiligung der DNA-Methylierung an der GLUT4-Transkriptionskontrolle (Rüegg et al.

2011) und lieferten damit einen weiteren Hinweis auf die epigenetische Regulation der GLUT4-Expression. Bei einem Vergleich von diabetischen mit gesunden Mäusen sind im Herz- und Skelettmuskel für den Insulinrezeptor keine Veränderungen in der Promotormethylierung gemessen worden. Für den IGF1-Promotor zeigte sich hingegen eine verstärkte Methylierung (Nikoshkov et al. 2011).

5.2.3 MicroRNAs

Die Ergebnisse der Charakterisierung der miRNA-Expression während der adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC wurden von mir in dem Artikel „*MicroRNA expression profile during adipogenic differentiation in mouse embryonic stem cells*“ publiziert (Knelangen et al. 2011). Die miRNA-Regulation während der frühen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Präadipozyten (*commitment phase*) oder noch früher, ausgehend von embryonalen Stammzellen, war vor dem Erscheinen der Publikation noch nicht charakterisiert.

MicroRNAs und Differenzierung

Pluripotente embryonale Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich in alle Zellen der drei Keimblätter zu differenzieren. Bei diesen Differenzierungsprozessen spielen miRNAs eine wichtige Rolle und sie nehmen damit Einfluss auf die Zelldeterminierung. Z.B. kann über eine Modulation der miR-93- und miR-20-Expression die Zelldeterminierung von embryonalen Stammzellen beeinflusst werden (Foshay und Gallicano 2009). Dabei wird postuliert, dass während der Zelldeterminierung zwei Klassen von miRNAs benötigt werden (Wang 2007): Einerseits miRNAs, die die Entscheidung über eine Differenzierung zwischen den drei Keimblättern regulieren (z.B. neuronale gegenüber myogenen Zellen). Andererseits miRNAs, die an der Feinregulation innerhalb einer Zelllinie beteiligt sind (z.B. Skelettmuskel- oder Herzmuskelzellen).

Unsere miRNA-Analyse unterstützt diese Hypothese, da es einige früh exprimierte miRNAs gibt, die während der Differenzierung in Vorläuferzellen gebildet werden. Andere miRNAs regulieren die terminale Differenzierung. Es wird vermutet, dass miRNAs für das Überleben von differenzierenden Zellen nicht essentiell sind; für die Differenzierung und gewebsspezifischen Genexpression sind sie jedoch unersetzlich (Kanellopoulou et al. 2005; Murchison et al. 2005). Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass während

der Differenzierung von Stammzellen mehr miRNAs hoch als herunter reguliert werden. Oskowitz et al. haben während der adipogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen 20 hochregulierte und nur eine herunterregulierte miRNA gefunden (Oskowitz et al. 2008). Das stimmt mit den Ergebnissen unseres globalen miRNA-Expressionsprofil überein. Durch eine Analyse von fast 1500 miRNA-Sequenzen vom Menschen, der Maus und von 50 anderen Arten haben wir an Tag 5 der adipogenen Differenzierung 61,5% hochregulierte und 38,5% herunterregulierte miRNAs gefunden (Knelangen et al. 2011). An Tag 10 waren es 63% hochregulierte und 37% runterregulierte miRNAs, an Tag 21 73% und 27% der veränderten miRNAs (siehe 4.2 Abb.2 und 3).

Die Ergebnisse der miRNA-Studie stehen ebenfalls im Einklang mit Expressionsanalysen anderer Zellmodelle, und zwar sowohl von embryonalen Stammzellen als auch von adipogenen Differenzierungsmodellen. Die miR-290-Familie nimmt den größten Anteil der miRNA-Population in embryonalen Stammzellen ein (Lüningschrör et al. 2012). Bei der Differenzierung von CGR8-ESCs kommt es zu einer kontinuierlichen und starken Reprimierung des miR-290 Clusters (siehe 4.2. Abb. 5). Ein weiterer Vergleich der miRNA-Expressionsprofile zeigt, dass die meisten für die Adipogenese relevanten regulatorischen miRNAs auch bei der Differenzierung von CGR8-ESC gefunden werden (siehe 4.2. Abb. 6): miR-let-7c, miR-10b, miR-15, miR-26a, miR-30a-5p, miR-30c, miR-98, miR-99a, miR-103, miR-142, miR-148a, miR-152, miR-224, miR-422b und miR-let-7b. In unserer Arbeit konnten wir demnach die generell wichtige Funktion dieser miRNAs bei der Entwicklung und Formierung des Fettgewebes bestätigen.

Die Expression des miR-17-92-Clusters wird während der adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC fast komplett herunter reguliert. Das steht im Gegensatz zur Expression in der Präadipozytenzelllinie 3T3-L1. Hier wurde das miR-17-92-Cluster während der adipogenen Differenzierung vermehrt exprimiert (Wang et al. 2008). Die Autoren zeigten, dass diese miRNAs die adipogene Differenzierung steigern, indem sie die Expression des Tumorsuppressors Rb2/p130 während der klonalen Expansion vermindern (Wang et al. 2008). Während Wang und Koautoren mit ihrer Zelllinie 3T3-L1 nur die terminale adipogene Differenzierung untersuchten, haben wir Adipozyten aus undifferenzierten

CGR8-ESC generiert und damit die frühe Differenzierung mit eingeschlossen. MiRNAs des miR-17-92-Clusters machen quantitativ einen großen Anteil in embryonalen Stammzellen aus (Marson et al. 2008). Dabei wird sogar postuliert, dass das miR-17-92-Cluster zusammen mit anderen Regulatoren fundamental wichtig für die Pluripotenz und Selbsterneuerung von ESC ist (Gunaratne 2009). Dies würde erklären, dass in dieser Arbeit eine Verringerung der Expression während der Differenzierung von CGR-ESC gefunden wurde.

MicroRNAs und Glukose

Als molekulare Ursache einer metabolischen Programmierung sind epigenetischen Modifikationen wahrscheinlich. Mittels einer globalen miRNA-Expressionsanalyse wurde die Rolle von miRNA während der adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC untersucht. Ein Überangebot wie auch ein Mangel von Glukose kann eine metabolische Stresssituation für embryonale Zellen hervorrufen (Leese 2002). Glukose selbst kann die miRNA-Expression verändern, wie Tang et al. in der pankreatischen β -Zelllinie MIN6 gezeigt haben (Tang et al. 2009). Im Vergleich von MIN6-Zellen mit MIN6-Zellen, die nicht auf Glukose reagieren, war die Expression folgender miRNAs reprimiert: miR-369-5p, miR-130a, miR-27a, miR-410, miR-200a, miR-337, miR-532, miR-320, miR-192 und miR-379 (Hennessy et al. 2010). Die Expression der miR-133a wird in humanen Langerhansschen Inseln durch eine anhaltend hohe Glukoseexposition hochreguliert (Fred et al. 2010).

Unter Langzeitkulturbedingungen ist Glukose in der Lage, die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu beeinflussen, wie unter anderem bei der neuronalen und osteogenen Differenzierung gezeigt wurde (Fu et al. 2006; Dienelt und zur Nieden 2011). Eine *in vitro*-Kultur mit kurzzeitig veränderten Glukosekonzentrationen während der Determinierungsphase hatte keinen Effekt auf die miRNA-Expression der differenzierenden CGR8-ESC (Knelangen et al. 2011). Wir haben das CGR8-ESC-Kulturmodell ausgewählt, um die langfristigen Auswirkungen einer kurzzeitigen metabolischen Belastung während der Determinierungsphase zu untersuchen. Bei der globalen miRNA-Untersuchung mittels einer miRNA-microarray-Analyse wurden die zwei Glukosekonzentration 5mM versus 25mM gegenüber gestellt. Um auszuschließen, dass die anderen verwendeten Glukosekonzentrationen (0mM, 40mM, 100mM) eventuell

einen Effekt auf die miRNA-Expression haben, wurde die Expression der miR-143, der miR-152 und der miR-210 an Tag 5, Tag 10 und Tag 21 in diesen Gruppen mittels qRT-PCR untersucht. Auch hier zeigte sich durch die transiente Glukosebehandlung kein signifikanter Expressionsunterschied (Daten nicht gezeigt).

Ferland-McCollough et al. haben kürzlich gezeigt, dass Veränderungen in der miRNA-Expression durch Entwicklungsbedingungen programmierbar sind und eine Verbindung zwischen intrauteriner Prägung und lebenslangen gesundheitlichen Konsequenzen herstellen können (Ferland-McCollough et al. 2012): Die miR-483-3p ist im Fettgewebe von Erwachsenen mit einem ursprünglich erniedrigten Geburtsgewicht und in prädiabetischen Ratten, die prä- und postnatal eine Proteinunterversorgung erlitten, hochreguliert. Dabei ist die miR-483-3p *in vitro* in der Lage, die Differenzierungskapazität und die Lipidspeicherung über eine Translationsreprimierung des *growth/differentiation factor-3* zu modulieren. Die Autoren postulieren, dass eine erhöhte miR-483-3p-Expression, programmiert durch die prä- und frühe postnatale Ernährung, die Speicherkapazität des Fettgewebes limitiert und dadurch eine Insulinresistenz mit einer erhöhten Prädisposition für metabolische Erkrankungen im Erwachsenenalter verursachen kann (Ferland-McCollough et al. 2012).

5.2.4 Histonmodifikationen

Die Organisation der Chromatinstruktur, welche durch die Verpackung der DNA um Histonproteine entsteht, wird unter anderem über posttranslationale Modifikationen der Histonenden vermittelt (Nakayama et al. 2001). Diese Modifikationen stellen einen weiteren möglichen epigenetischen Mechanismus für die metabolische Programmierung embryonaler Zellen dar.

Von den vier Kernproteinen H2A, H2B, H3 und H4 ist das Histon H3 das am stärksten modifizierte Histon. Insgesamt gibt es in diesem Protein, das aus 135 Aminosäuren besteht 26 modifizierbare Aminosäuren (Ederveen et al. 2011). Dabei führt die Di- und Trimethylierung des Histons H3 am Lysinrest 7 (H3K9) über die Rekrutierung des Heterochromatin-Protein-1 zur Bildung von transkriptionell inaktivem Heterochromatin und zu einer Abschaltung aktiver Gene (Bernstein et al. 2007). Während der Differenzierung von embryonalen Stammzellen erfolgt eine großflächige Dimethylierung von H3K9 (H3K9me2) (Wen et al. 2009).

Auch die Adipogenese wird über Histonmethylierungen epigenetisch reguliert (Ge 2012). PTIP, ein Protein, das mit den Histon H3K4-Methyltransferasen MLL3/MLL4 und mit der Histon H3K27-Demethylase UTX assoziiert ist, wird für die PPAR γ - und C/EBP α -Expression in der Adipogenese benötigt (Cho et al. 2009). Die Histon H3K27-Methyltransferase PRC2 nutzt ihre enzymatische Untereinheit Ezh2, um die Expression von Genen der Wnt-Familie zu reprimieren (Wang et al. 2010). Moleküle des kanonischen *wingless-type MMTV integration site family*-Signalweges (Wnt) inhibieren die Adipogenese, allen voran Wnt 10b (Ross et al. 2000; Longo et al. 2004).

In dieser Arbeit wurde die Dimethylierung von H3K9 in undifferenzierten CGR8-ESC und während der adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC an Tag 5, 10 und 21 mit einem methylierungsspezifischen Antikörper untersucht (siehe Abb.5). Dabei sollte der Methylierungszustand während des Differenzierungsverlaufs untersucht und der transiente Einfluss von Glukose näher aufgeklärt werden. Bei Endothelzellen, die kurzzeitig mit erhöhten Glukosekonzentrationen inkubiert wurden, kam es zu persistierenden Veränderungen der Histonmodifikationen (El-Osta et al. 2008; Brasacchio et al. 2009; Pirola et al. 2011)

Bei der adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC haben wir eine verstärkte Zunahme der H3K9-Dimethylierung gemessen (Abb.5). Der Unterschied zwischen den Glukosegruppen war gering und aufgrund der Variabilität der Differenzierungseffizienz nicht statistisch signifikant. Weiterführende Untersuchungen zu anderen Histonmodifikationen wie der Acetylierung des H3K9 und von zugehörigen Enzymen sollen die Rolle der Histonveränderungen bei der metabolischen Programmierung embryonaler Zellen weiter aufklären.

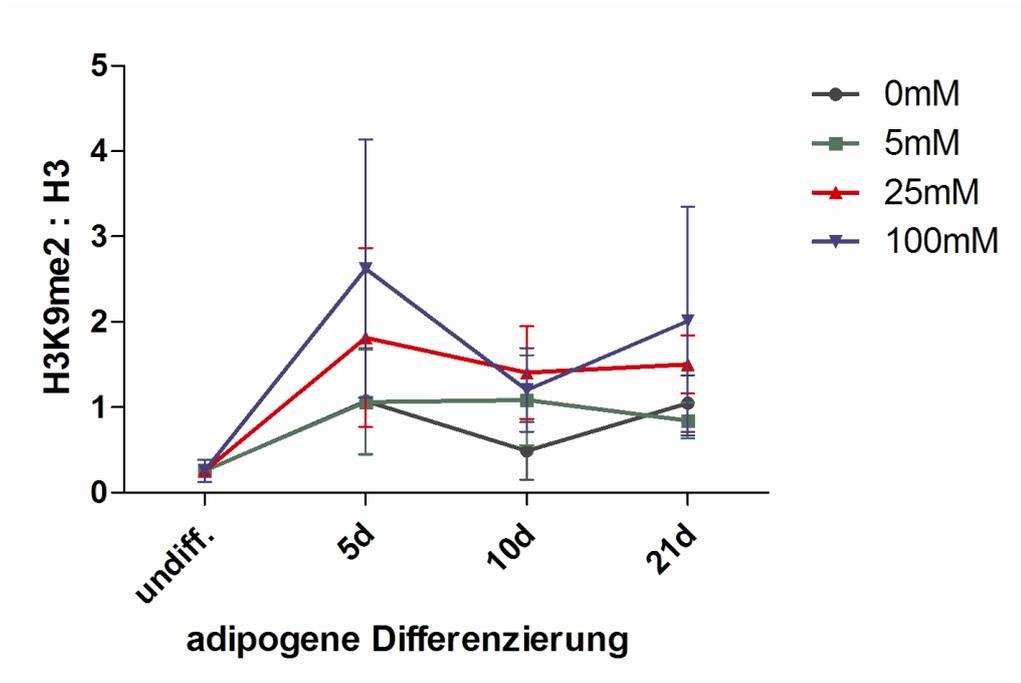


Abb.5 Dimethylierung des Histons H3 während der adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC. Die Zellen wurden für 2 Tage während der Determinierungsphase mit 0, 5, 25, 100mM Glukose kultiviert (siehe Abb.2). Die Kultur während der Differenzierung erfolgte unter Standardglukosebedingungen von 25mM. Die Menge an dimethyliertem Histon H3 (H3K9me2) wurden an den Tagen 5 (5d), 10 (10d) und 21 (21d) mittels eines methylierungsspezifischen Antikörpers quantifiziert und auf die Gesamtmenge von Histon 3 (H3) bezogen. N=3

5.3 Auswirkungen einer metabolischen Prägung embryonaler Zellen

Die mütterliche Ernährung während der Schwangerschaft hat langfristige Auswirkungen auf die Nachkommen. In der Ratte, einem bevorzugten Tiermodell für Fütterungsversuche, hat man z.B. gezeigt, dass eine verringerte Nahrungsaufnahme der Muttertiere während Schwangerschaft und Laktation Auswirkungen auf die Nachkommen in Form eines geringeren Gewichtes und einer geringeren Anzahl an pankreatischen β -Zellen zum Zeitpunkt der Geburt hat (Garofano et al. 1997). Zusätzlich wurde eine Glukoseintoleranz (Garofano et al. 1999), Hyperphagie, Hyperinsulinämie, Hypertonie, Hyperleptinämie und Adipositas im Erwachsenenalter beobachtet (Vickers et al. 2001). Auch eine Proteinunterversorgung während der Schwangerschaft und/oder Laktation beeinträchtigt die Gesundheit des Nachwuchses. Bei Nagetieren wurden unter anderem signifikante Änderungen im Geburtsgewicht (Augustyniak et al. 2010) sowie eine Veränderung des Körperfettanteils (Fagundes et al. 2009), eine Vorliebe für fettreiche Nahrung (Bellinger et al. 2004) und vaskuläre Dysfunktionen (Torrens et al. 2009) beschrieben.

Auch eine Stoffwechselerkrankung wie Diabetes mellitus während der Schwangerschaft kann zu Fehlregulationen innerhalb der Embryonal- und Fetalentwicklung führen (Aerts und Van Assche 2006). Dabei ist besonders das kardiovaskuläre System betroffen (Wren et al. 2003; Reinking et al. 2009). Neugeborene von diabetischen Müttern haben eine erhöhte Inzidenz für Kardiomyopathien (Corrigan et al. 2009). In Schwangerschaften mit einer schlechten Kontrolle des Blutzuckerspiegels innerhalb des 1. Trimesters kommt es häufiger zu fetalen Herzfehlbildungen, was auf einen teratogenen Effekt einer Hyperglykämie bei der frühen Herzentwicklung schließen lässt (Lisowski et al. 2010). Die Hyperglykämie spielt hierbei eine zentrale Rolle. In einem diabetischen Mausmodell kommt es allein durch erhöhte Glukosespiegel zu einer veränderten Genexpression und zu kongenitalen Fehlbildungen (Fine et al. 1999). Eine maternale und fetale Hyperglykämie in der späten Schwangerschaft resultiert bei Schafen in einer postnatalen Adipositas und Veränderungen im Hypothalamus-Hypophysen-Regelnetzwerk (Muhlhausler et al. 2003; Muhlhausler et al. 2006; Muhlhausler et al. 2007).

Inzwischen gibt es experimentell untermauerte Hinweise, dass Umweltfaktoren schon vor der Befruchtung und Implantation (Perikonzeptionsphase) zum Erkrankungsrisiko der

Nachkommen beitragen (Sinclair et al. 2007; Watkins et al. 2010a; Maloney et al. 2011). Adam Watkins und Kollegen fanden bei 1-jährigen Mäusen veränderte Körperfettverteilungen, ein verringertes Körpergewicht sowie einen erhöhten Blutdruck. Diese Tiere waren ausschließlich während der Oozytenreifung und/oder der Präimplantationsphase einer maternalen Proteinrestriktion bei ansonsten isokalorischer Diät ausgesetzt (Watkins et al. 2011). Eine allgemeine Mangelernährung vor der Implantation des Embryos ist bei Schafen in der Lage, kardiovaskuläre Fehlregulationen auszulösen (Gardner et al. 2004). Das Gegenteil, eine maternale perikonzeptionelle Überernährung, resultiert bei Lämmern in einer erhöhten postnatalen Kapazität, Triglyzeride zu speichern und zu synthetisieren (Rattanatray et al. 2010).

Während viele Studien das Problem einer Über- oder Mangelernährung aufgreifen und *in vivo* durchgeführt werden, stellen wir das Hauptenergiesubstrat Glukose in den Vordergrund. Mit den gewählten *in vitro*-Zellkulturmodellen ergibt sich die Möglichkeit, zielgerichtet den Einfluss eines einzelnen Nährstoffes zu untersuchen. Zusätzlich besteht der Vorteil der hohen Materialverfügbarkeit und der kurzen Generationszeit. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine Glukose-vermittelte metabolische Prägung embryonaler Zellen in zwei unabhängigen Differenzierungsmodellen beschrieben.

Im Hinblick auf die wachsende Anzahl der Schwangerschaften nach assistierten Reproduktionstechniken (ART) wie der *in vitro* Fertilisation (IVF) und der Tatsache, dass die frühe embryonale Entwicklung eine Schlüsselrolle in der Entstehung von metabolischen Erkrankungen im Erwachsenenalter spielt, ist die Aufklärung der Auswirkungen einer *in vitro* Kultur von humanen Embryonen unabdingbar. Mädchen, die mit Hilfe einer intrazytoplasmatischen Spermieninjektion gezeugt wurden, neigen z.B. stärker zur Entwicklung einer Adipositas als vergleichbare Altersgenossinnen (Belva et al. 2012). Studien mit Säugetierembryonen zufolge führt die Zugabe höherer Konzentrationen Glukose zum Embryokulturmedium zu einer verzögerten Entwicklung und Retardierung der Embryonen (Chatot et al. 1989; Takahashi und First 1992; Thompson et al. 1992; Quinn 1995). Embryonen verstoffwechseln aber Glukose (Hardy et al. 1989). Zudem zeigen neue Erkenntnisse, dass die Metabolisierung von Glukose über die Hexosamin-Biosynthese des frühen Embryo und die Bildung von O-glykosidischen Bindungen wichtig für die spätere Entwicklung ist (Pantaleon und Kaye 2005). Michelle

Lane und David Gardner postulieren, dass die Glukosemetabolisierung vor der Implantation unerlässlich für den Aufbau des folgenden metabolischen Programms ist (Lane und Gardner 2007). In dieser Arbeit wurden neben einem unmittelbaren Einfluss einer kurzzeitigen Glukoseexposition auf embryonale Zellen auch langfristige Auswirkungen auf die adipogene und kardiomyogene Differenzierung gefunden.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Inzidenz an Zivilisationskrankheiten weltweit rapide zunimmt muss stärker als bisher berücksichtigt werden, dass bereits temporäre Veränderungen im Glukosegehalt, sei es *in vivo* (schlecht eingestellter Diabetes mellitus der Mutter) oder *in vitro* (ART), die Nachkommen prägen können und somit eine Rolle bei den entwicklungsbedingten Krankheiten im Erwachsenenalter spielen. Unser derzeitiger Wissensstand und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine frühe, möglichst schon perikonzeptionelle Schwangerschaftsvorsorge entscheidend und unverzichtbar in der Prävention von metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen ist.

6. Zusammenfassung

Das embryonale Wachstum ist von der endokrinen und parakrinen Regulation und der Verfügbarkeit von Nährstoffen abhängig. Die frühe Embryonalentwicklung, in welcher essentielle Differenzierungsschritte initiiert werden, ist besonders sensitiv gegenüber Änderungen im Nährstoffangebot und Stoffwechselstörungen. Solche Veränderungen können den Embryo prägen. Diese Prägung führt in der darauffolgenden Embryo- und Fetalentwicklung bzw. Differenzierung zu Veränderungen im metabolischen Programm der Zellen und beeinflusst so die Entwicklung des Gesamtorganismus auf Dauer.

Die molekularen Mechanismen der metabolischen Programmierung werden in dieser Arbeit mit Hilfe zweier Stammzellmodelle näher aufgeklärt. Dafür wurde zunächst die adipogene Differenzierung der embryonalen Stammzelllinie CGR8 (CGR8-ESC) genutzt und eine Methode zur Bestimmung der terminalen Differenzierungseffizienz etabliert. Des Weiteren wurde die kardiomyogene Differenzierung in der embryonalen Karzinomzelllinie P19 (P19-ECC) untersucht.

In beiden embryonalen Differenzierungsmodellen wurden glukosevermittelte metabolische Programmierungseffekte nach einer kurzfristigen Exposition mit hohen- bzw. niedrigen Glukosekonzentrationen gefunden, welche sich wie folgt zusammenfassen lassen:

- Eine metabolische Prägung der P19-ECC ändert deren kardiophysiologischen Phänotyp.
- Eine metabolische Prägung der CGR8-ESC verändert deren adipogenes Differenzierungspotential.
- Eine metabolische Prägung embryonaler Zellen kann durch eine kurzfristige hypo- bzw. hyperglykämische Exposition während der Determinierungsphase ausgelöst werden.
- Die Differenzierung embryonaler Zellen beweist eine glukosesensitive Prägung der Kardiomyogenese und Adipogenese.

Es ist bekannt, dass Veränderungen innerhalb des Insulin/IGF-Rezeptor-Systems zu nachhaltigen Veränderungen führen können. Das Insulin/IGF-Rezeptor-System ist deshalb ein potentieller Angriffspunkt für eine metabolische Programmierung.

- Die glukosevermittelte Prägung wird nicht über eine transkriptionelle Regulation des Insulinrezeptors, des Glukosetransporters 4 oder des IGF1-Rezeptors bei den P19-ECC oder CGR8-ESC verursacht.
- Die glukosevermittelte Prägung induziert keine Methylierungsänderungen in den Promotorregionen des Insulinrezeptors, des Glukosetransporters 4 oder des IGF1-Rezeptors innerhalb der beiden Stammzellmodelle.
- Während der kardiomyogenen und adipogenen Differenzierung embryonaler Zellen kommt es zu keinen veränderten Promotormethylierungen des Insulinrezeptors, des Glukosetransporters 4 oder des IGF1-Rezeptors.

Mittels einer globalen miRNA-Expressionsanalyse wurde die Rolle von miRNA während der adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC untersucht.

- Während der adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC werden 129 miRNAs differentiell reguliert.
- Die miRNAs können nach ihrer zeitlichen Expression während der adipogenen Differenzierung in 7 verschiedene Gruppen eingeteilt werden.
- Das miRNA-Expressionsprofil differenzierender CGR8-Zellen ist nicht durch eine Glukoseexposition während der Determinierungsphase veränderbar.

Die Differenzierung von embryonalen Stammzellen bietet ein hochstandardisiertes Experimentalmodell, das für die weitere Aufklärung des Phänomens der metabolischen Prägung sehr gut geeignet ist. Auch wenn die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht verstanden sind, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass bereits eine kurzzeitige Veränderung im metabolischen Milieu von embryonalen Zellen zu lebenslangen Konsequenzen führen kann.

7. Summary

The development of the preimplantation mammalian embryo and fetal and postnatal phenotype are programmed by developmental conditions during the early embryogenesis (metabolic programming). The embryo and embryonic cells have an astonishing capacity to adapt within a short time to metabolic changes. A molecular “cell memory” can store this “stress” information, leading to lifelong metabolic alterations. Thus, prenatal development and metabolic factors predispose for pathophysiological alterations later in life and pioneer functional impairment in senescence. The developmental origins of adult diseases (DOHaD), for example the metabolic syndrome, is of high clinical and socioeconomic importance as the metabolic syndrome has a high prevalence in industrial nations and is a major risk factor for cardiovascular diseases and type II diabetes mellitus.

The mechanisms of metabolic programming were studied by analysing murine pluripotent embryonic stem cells. Metabolic stress was induced by culturing embryonic stem cells during the determination phase in media with high/low glucose, mimicking a diabetic situation or malnutrition. Long-term effects were analysed by stem cell differentiation into cardiomyocytes and adipocytes. The developmental impact of a short-time metabolic stress during embryonic stem cell determination was elucidated by investigating gene expression and functionality of differentiated cells. Epigenetic modifications like DNA methylation, expression patterns of microRNAs and histone modifications were investigated as potential mechanisms of metabolic programming.

The differentiation of embryonic cells is a suitable model to study metabolic imprinting. Even a moderate change in the metabolic environment during cell determination alters the function of terminally differentiated cells with potentially lifetime consequences. Current knowledge and results from this study clearly implicate that early pregnancy care, even periconceptual care, is crucial and indispensable in the prevention of metabolic and cardiovascular diseases.

8. Literaturverzeichnis

- Aerts, L und Van Assche, FA (2006). "Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **38**(5-6): 894-903.
- Alexander, R, Lodish, H und Sun, L (2011). "MicroRNAs in adipogenesis and as therapeutic targets for obesity." Expert Opinion on Therapeutic Targets **15**(5): 623-636.
- Asada, M, Rauch, A, Shimizu, H, Maruyama, H, Miyaki, S, Shibamori, M, Kawasome, H, Ishiyama, H, Tuckermann, J und Asahara, H (2011). "DNA binding-dependent glucocorticoid receptor activity promotes adipogenesis via Kruppel-like factor 15 gene expression." Laboratory Investigation **91**(2): 203-215.
- Augustyniak, RA, Singh, K, Zeldes, D, Singh, M und Rossi, NF (2010). "Maternal protein restriction leads to hyperresponsiveness to stress and salt-sensitive hypertension in male offspring." American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **298**(5): R1375-R1382.
- Bagutti, C, Wobus, AM, Fässler, R und Watt, FM (1996). "Differentiation of Embryonal Stem Cells into Keratinocytes: Comparison of Wild-Type and β 1Integrin-Deficient Cells." Developmental Biology **179**(1): 184-196.
- Barker, DJ (1990). "The fetal and infant origins of adult disease." British Medical Journal **301**(6761): 1111.
- Barker, DJ, Hales, CN, Fall, CH, Osmond, C, Phipps, K und Clark, PM (1993). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth." Diabetologia **36**(1): 62-67.
- Barker, DJP und Osmond, C (1986). "INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES." The Lancet **327**(8489): 1077-1081.
- Bellinger, L, Lilley, C und Langley-Evans, SC (2004). "Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat." British Journal of Nutrition **92**: 513-520.
- Belva, F, Painter, R, Bonduelle, M, Roelants, M, Devroey, P und De Schepper, J (2012). "Are ICSI adolescents at risk for increased adiposity?" Human Reproduction **27**(1): 257-264.
- Benetti, R, Gonzalo, S, Jaco, I, Munoz, P, Gonzalez, S, Schoeftner, S, Murchison, E, Andl, T, Chen, T, Klatt, P, Li, E, Serrano, M, Millar, S, Hannon, G und Blasco, MA (2008). "A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases." Nature Structural & Molecular Biology **15**(3): 268-279.
- Bernstein, BE, Meissner, A und Lander, ES (2007). "The Mammalian Epigenome." Cell **128**(4): 669-681.
- Biemann, R, Navarrete Santos, A, Navarrete Santos, A, Riemann, D, Knelangen, J, Blüher, M, Koch, H und Fischer, B (2012). "Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows." Biochemical and Biophysical Research Communications **417**(2): 747-752.
- Billon, N und Dani, C (2011). "Developmental Origins of the Adipocyte Lineage: New Insights from Genetics and Genomics Studies." Stem Cell Reviews and Reports: 1-12.

- Billon, N, Iannarelli, P, Monteiro, MC, Glavieux-Pardanaud, C, Richardson, WD, Kessar, N, Dani, C und Dupin, E (2007). "The generation of adipocytes by the neural crest." Development **134**(12): 2283-2292.
- Brasacchio, D, Okabe, J, Tikellis, C, Balcerzyk, A, George, P, Baker, EK, Calkin, AC, Brownlee, M, Cooper, ME und El-Osta, A (2009). "Hyperglycemia Induces a Dynamic Cooperativity of Histone Methylase and Demethylase Enzymes Associated With Gene-Activating Epigenetic Marks That Coexist on the Lysine Tail." Diabetes **58**(5): 1229-1236.
- Catalano, PM, McIntyre, HD, Cruickshank, JK, McCance, DR, Dyer, AR, Metzger, BE, Lowe, LP, Trimble, ER, Coustan, DR, Hadden, DR, Persson, B, Hod, M, Oats, JJN und Group, ftHSCR (2012). "The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Study." Diabetes Care **Epub ahead of print**.
- Chambers, I, Colby, D, Robertson, M, Nichols, J, Lee, S, Tweedie, S und Smith, A (2003). "Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells." Cell **113**(5): 643-655.
- Chang, KH und Zandstra, PW (2004). "Quantitative screening of embryonic stem cell differentiation: Endoderm formation as a model." Biotechnology and Bioengineering **88**(3): 287-298.
- Chang, TH und Polakis, SE (1978). "Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. Effect of insulin and indomethacin on the levels of insulin receptors." Journal of Biological Chemistry **253**(13): 4693-4696.
- Chatot, CL, Ziomek, CA, Bavister, BD, Lewis, JL und Torres, I (1989). "An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro." Journal of Reproduction and Fertility **86**(2): 679-688.
- Cho, Y-W, Hong, S, Jin, Q, Wang, L, Lee, J-E, Gavrilova, O und Ge, K (2009). "Histone Methylation Regulator PTIP Is Required for PPAR γ and C/EBP α Expression and Adipogenesis." Cell Metabolism **10**(1): 27-39.
- Corrigan, N, Brazil, DP und McAuliffe, F (2009). "Fetal cardiac effects of maternal hyperglycemia during pregnancy." Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology **85**(6): 523-530.
- Cristancho, AG und Lazar, MA (2011). "Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation." Nature Reviews Molecular Cell Biology **12**(11): 722-734.
- Dani, C, Smith, A, Dessolin, S, Leroy, P, Staccini, L, Villageois, P, Darimont, C und Ailhaud, G (1997). "Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro." Journal of Cell Science **110**(11): 1279-1285.
- Davison, JM, Mellott, TJ, Kovacheva, VP und Blusztajn, JK (2009). "Gestational Choline Supply Regulates Methylation of Histone H3, Expression of Histone Methyltransferases G9a (Kmt1c) and Suv39h1 (Kmt1a), and DNA Methylation of Their Genes in Rat Fetal Liver and Brain." Journal of Biological Chemistry **284**(4): 1982-1989.
- Delage, B und Dashwood, RH (2008). "Dietary Manipulation of Histone Structure and Function." Annual Review of Nutrition **28**: 347-366.
- Dienelt, A und zur Nieden, NI (2011). "Hyperglycemia Impairs Skeletogenesis from Embryonic Stem Cells by Affecting Osteoblast and Osteoclast Differentiation." Stem Cells and Development **20**(3): 465-474.
- Ederveen, THA, Mandemaker, IK und Logie, C (2011). "The human histone H3 complement anno 2011." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms **1809**(10): 577-586.

- El-Jack, AK, Hamm, JK, Pilch, PF und Farmer, SR (1999). "Reconstitution of Insulin-sensitive Glucose Transport in Fibroblasts Requires Expression of Both PPAR γ and C/EBP α ." Journal of Biological Chemistry **274**(12): 7946-7951.
- El-Osta, A, Brasacchio, D, Yao, D, Poci, A, Jones, PL, Roeder, RG, Cooper, ME und Brownlee, M (2008). "Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia." The Journal of Experimental Medicine **205**(10): 2409-2417.
- Elks, ML, Manganiello, VC und Vaughan, M (1983). "Hormone-sensitive particulate cAMP phosphodiesterase activity in 3T3-L1 adipocytes. Regulation of responsiveness by dexamethasone." Journal of Biological Chemistry **258**(14): 8582-8587.
- Esau, C, Kang, X, Peralta, E, Hanson, E, Marcusson, EG, Ravichandran, LV, Sun, Y, Koo, S, Perera, RJ, Jain, R, Dean, NM, Freier, SM, Bennett, CF, Lollo, B und Griffey, R (2004). "MicroRNA-143 Regulates Adipocyte Differentiation." Journal of Biological Chemistry **279**(50): 52361-52365.
- Fagundes, ATS, Moura, EG, Passos, MCF, Santos-Silva, AP, Oliveira, Ed, Trevenzoli, IH, Casimiro-Lopes, G, Nogueira-Neto, JF und Lisboa, PC (2009). "Temporal Evaluation of Body Composition, Glucose Homeostasis und Lipid Profile of Male Rats Programmed by Maternal Protein Restriction During Lactation." Hormone and Metabolic Research **41**(12): 866,873.
- Farmer, SR (2006). "Transcriptional control of adipocyte formation." Cell Metabolism **4**(4): 263-273.
- Ferland-McCollough, D, Fernandez-Twinn, DS, Cannell, IG, David, H, Warner, M, Vaag, AA, Bork-Jensen, J, Brons, C, Gant, TW, Willis, AE, Siddle, K, Bushell, M und Ozanne, SE (2012). "Programming of adipose tissue miR-483-3p and GDF-3 expression by maternal diet in type 2 diabetes." Cell Death and Differentiation **Epub ahead of print**.
- Fijnvandraat, AC, van Ginneken, ACG, de Boer, PAJ, Ruijter, JM, Christoffels, VM, Moorman, AFM und Lekanne Deprez, RH (2003). "Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube." Cardiovascular Research **58**(2): 399-409.
- Fine, EL, Horal, M, Chang, TI, Fortin, G und Loeken, MR (1999). "Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy." Diabetes **48**(12): 2454-2462.
- Fleming, TP, Velazquez, MA, Eckert, JJ, Lucas, ES und Watkins, AJ (2012). "Nutrition of females during the peri-conceptual period and effects on foetal programming and health of offspring." Animal Reproduction Science **130**(3-4): 193-197.
- Foshay, KM und Gallicano, GI (2009). "miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation." Developmental Biology **326**(2): 431-443.
- Fowden, AL und Forhead, AJ (2008). "Endocrine regulation of fetoplacental growth." Hormone research **72**(5): 257-265.
- Fraser, RB, Waite, SL, Wood, KA und Martin, KL (2007). "Impact of hyperglycemia on early embryo development and embryopathy: in vitro experiments using a mouse model." Human Reproduction **22**(12): 3059-3068.
- Fred, RG, Bang-Berthelsen, CH, Mandrup-Poulsen, T, Grunnet, LG und Welsh, N (2010). "High Glucose Suppresses Human Islet Insulin Biosynthesis by Inducing miR-133a Leading to Decreased Polypyrimidine Tract Binding Protein-Expression." PLoS ONE **285**(30): 23457-23465.

- Friedman, RC, Farh, KK-H, Burge, CB und Bartel, DP (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." Genome Research **19**(1): 92-105.
- Fu, J, Tay, S, Ling, E und Dheen, S (2006). "High glucose alters the expression of genes involved in proliferation and cell-fate specification of embryonic neural stem cells." Diabetologia **49**(5): 1027-1038.
- Fuchs, C, Scheinast, M, Pasterner, W, Lagger, S, Hofner, M, Hoellrigl, A, Schultheis, M und Weitzer, G (2011). "Self-Organization Phenomena in Embryonic Stem Cell-Derived Embryoid Bodies: Axis Formation and Breaking of Symmetry during Cardiomyogenesis." Cells Tissues Organs **Epub ahead of print**.
- Gardner, DS, Pearce, S, Dandrea, J, Walker, R, Ramsay, MM, Stephenson, T und Symonds, ME (2004). "Peri-Implantation Undernutrition Programs Blunted Angiotensin II Evoked Baroreflex Responses in Young Adult Sheep " Hypertension **43**: 1290-1296.
- Garofano, A, Czernichow, P und Bréant, B (1997). "In utero undernutrition impairs rat beta-cell development." Diabetologia **40**(10): 1231-1234.
- Garofano, A, Czernichow, P und Bréant, B (1999). "Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period." Diabetologia **42**(6): 711-718.
- Ge, K (2012). "Epigenetic regulation of adipogenesis by histone methylation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms **Epub ahead of print**.
- Gesta, S, Tseng, Y-H und Kahn, CR (2007). "Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source." Cell **131**(2): 242-256.
- Gregory, RI, Yan, K-p, Amuthan, G, Chendrimada, T, Doratotaj, B, Cooch, N und Shiekhattar, R (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." Nature **432**(7014): 235-240.
- Guerrero-Bosagna, C und Skinner, MK (2011). "Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease." Molecular and Cellular Endocrinology **Epub ahead of print**.
- Guil, S und Esteller, M (2009). "DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **41**(1): 87-95.
- Guillemain, G, Filhoulaud, G, Da Silva-Xavier, G, Rutter, GA und Scharfmann, R (2007). "Glucose Is Necessary for Embryonic Pancreatic Endocrine Cell Differentiation." Journal of Biological Chemistry **282**(20): 15228-15237.
- Gunaratne, PH (2009). "Embryonic Stem Cell MicroRNAs: Defining Factors in Induced Pluripotent (iPS) and Cancer (CSC) Stem Cells?" Current Stem Cell Research & Therapy **4**.
- Guo, H, Ingolia, NT, Weissman, JS und Bartel, DP (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." Nature **466**(7308): 835-840.
- Hardy, K, Hooper, MAK, Handyside, AH, Rutherford, AJ, Winston, RML und Leese, HJ (1989). "Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos." Human Reproduction **4**(2): 188-191.
- Harvey, RP (2002). "Patterning the vertebrate heart." Nature Reviews Genetics **3**(7): 544-556.
- Hennessy, E, Clynes, M, Jeppesen, PB und O'Driscoll, L (2010). "Identification of microRNAs with a role in glucose stimulated insulin secretion by expression profiling of MIN6 cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **396**(2): 457-462.

- Hirai, H, Karian, P und Kikyo, N (2011). "Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor " Biochemical Journal **438**: 11-23.
- Hofner, M, Höllrigl, A, Puz, S, Sary, M und Weitzer, G (2007). "Desmin stimulates differentiation of cardiomyocytes and up-regulation of brachyury and nkx2.5." Differentiation **75**(7): 605-615.
- Hutvágner, G, McLachlan, J, Pasquinelli, AE, Bálint, É, Tuschl, T und Zamore, PD (2001). "A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA." Science **293**(5531): 834-838.
- Ivey, KN, Muth, A, Arnold, J, King, FW, Yeh, R-F, Fish, JE, Hsiao, EC, Schwartz, RJ, Conklin, BR, Bernstein, HS und Srivastava, D (2008). "MicroRNA Regulation of Cell Lineages in Mouse and Human Embryonic Stem Cells." Cell Stem Cell **2**(3): 219-229.
- Izumi, N, Era, T, Akimaru, H, Yasunaga, M und Nishikawa, S-I (2007). "Dissecting the Molecular Hierarchy for Mesendoderm Differentiation Through a Combination of Embryonic Stem Cell Culture and RNA Interference." STEM CELLS **25**(7): 1664-1674.
- Jäkel , H, Wobus, A, Bloch, C, Jäkel, N und Schöneich, J (1983). "A micromethod for the determination of alkaline phosphatase in mammalian cells." Biomedica biochimica acta **43**(9): 1123-1128.
- Jenuwein, T und Allis, CD (2001). "Translating the Histone Code." Science **293**(5532): 1074-1080.
- Jirtle, RL und Skinner, MK (2007). "Environmental epigenomics and disease susceptibility." Nature Reviews Genetics **8**(4): 253-262.
- Jones, EA, Tosh, D, Wilson, DI, Lindsay, S und Forrester, LM (2002). "Hepatic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells." Experimental Cell Research **272**(1): 15-22.
- Judson, RL, Babiarz, JE, Venere, M und Belloch, R (2009). "Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency." Nature Biotechnology **27**(5): 459-461.
- Kanellopoulou, C, Stefan A. Muljo, Andrew L. Kung, Shridar Ganesan, Ronny Drapkin, Thomas Jenuwein, Livingston, DM und Rajewsky, K (2005). "Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing." Genes & Development **19**: 489-501.
- Karbiener, M, Fischer, C, Nowitsch, S, Opriessnig, P, Papak, C, Ailhaud, G, Dani, C, Amri, E-Z und Scheideler, M (2009). "microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPAR γ ." Biochemical and Biophysical Research Communications **390**(2): 247-251.
- Karbiener, M, Neuhold, C, Opriessnig, P, Prokesch, A, Bogner-Strauss, JG und Scheideler, M (2011). "MicroRNA-30c promotes human adipocyte differentiation and co-represses PAI-1 and ALK2." RNA Biology **8**(5): 850-860.
- Khoo, MLM, McQuade, LR, Smith, MSR, Lees, JG, Sidhu, KS und Tuch, BE (2005). "Growth and Differentiation of Embryoid Bodies Derived from Human Embryonic Stem Cells: Effect of Glucose and Basic Fibroblast Growth Factor." Biology of Reproduction **73**(6): 1147-1156.
- Khvorova, A, Reynolds, A und Jayasena, SD (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." Cell **115**(2): 209-216.
- Kim, YH und Han, HJ (2008). "Synergistic effect of high glucose and ANG II on proliferation of mouse embryonic stem cells: Involvement of PKC and MAPKs as well as AT1 receptor." Journal of Cellular Physiology **215**(2): 374-382.

- Kim, YH, Heo, JS und Han, HJ (2006). "High glucose increase cell cycle regulatory proteins level of mouse embryonic stem cells via PI3-K/Akt and MAPKs signal pathways." Journal of Cellular Physiology **209**(1): 94-102.
- Kinoshita, M, Ono, K, Horie, T, Nagao, K, Nishi, H, Kuwabara, Y, Takanabe-Mori, R, Hasegawa, K, Kita, T und Kimura, T (2010). "Regulation of Adipocyte Differentiation by Activation of Serotonin (5-HT) Receptors 5-HT_{2A}R and 5-HT_{2C}R and Involvement of MicroRNA-448-Mediated Repression of KLF5." Molecular Endocrinology **24**(10): 1978-1987.
- Knellingen, JM, Kurz, R, Schagdarsurengin, U, Fischer, B und Navarrete Santos, A (2012). "Short-time glucose exposure of embryonic carcinoma cells impairs their function as terminally differentiated cardiomyocytes." Biochemical and Biophysical Research Communications **420**: 230-235
- Knellingen, JM, van der Hoek, MB, Kong, W-C, Owens, JA, Fischer, B und Santos, AN (2011). "MicroRNA expression profile during adipogenic differentiation in mouse embryonic stem cells." Physiological Genomics **43**(10): 611-620.
- Kozomara, A und Griffiths-Jones, S (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." Nucleic Acids Research **39**(suppl 1): D152-D157.
- Kramer, J, Hegert, C, Guan, K, Wobus, AM, Müller, PK und Rohwedel, J (2000). "Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4." Mechanisms of Development **92**(2): 193-205.
- Kwong, W, Wild, A, Roberts, P, Willis, A und Fleming, T (2000). "Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension." Development **127**(19): 4195-4202.
- Lane, M und Gardner, DK (2007). "Embryo culture medium: which is the best?" Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology **21**(1): 83-100.
- Laugwitz, K-L, Moretti, A, Caron, L, Nakano, A und Chien, KR (2008). "Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages?" Development **135**(2): 193-205.
- Lee, EK, Lee, MJ, Abdelmohsen, K, Kim, W, Kim, MM, Srikantan, S, Martindale, JL, Hutchison, ER, Kim, HH, Marasa, BS, Selimyan, R, Egan, JM, Smith, SR, Fried, SK und Gorospe, M (2011). "miR-130 Suppresses Adipogenesis by Inhibiting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Expression." Molecular and Cellular Biology **31**(4): 626-638.
- Lee, RC, Feinbaum, RL und Ambros, V (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.
- Lee, Y, Kim, M, Han, J, Yeom, K-H, Lee, S, Baek, SH und Kim, VN (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." The EMBO Journal **23**(20): 4051-4060.
- Leese, HJ (2002). "Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability." BioEssays **24**(9): 845-849.
- Leppens-Luisier, G, Urner, F und Sakkas, D (2001). "Facilitated glucose transporters play a crucial role throughout mouse preimplantation embryo development." Human Reproduction **16**(6): 1229-1236.
- Lin, Q, Gao, Z, Alarcon, RM, Ye, J und Yun, Z (2009). "A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis." The FEBS Journal **276**(8): 2348-2358.
- Ling, H, Wen, G, Feng, S, Tuo, Q, Ou, H, Yao, C, Zhu, B, Gao, Z, Zhang, L und Liao, D (2011). "MicroRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through modulation of

- extracellular signal-regulated kinase signalling." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **38**(4): 239-246.
- Lisowski, L, Verheijen, P, Copel, J, Kleinman, C, Wassink, S, Visser, G und Meijboom, E-J (2010). "Congenital Heart Disease in Pregnancies Complicated by Maternal Diabetes Mellitus." Herz **35**(1): 19-26.
- Longo, KA, Wright, WS, Kang, S, Gerin, I, Chiang, S-H, Lucas, PC, Opp, MR und MacDougald, OA (2004). "Wnt10b Inhibits Development of White and Brown Adipose Tissues." Journal of Biological Chemistry **279**(34): 35503-35509.
- Lüllmann-Rauch, R (2003). Histologie, Thieme Verlag.
- Lüningschrör, P, Stöcker, B, Kaltschmidt, B und Kaltschmidt, C (2012). "miR-290 Cluster Modulates Pluripotency by Repressing Canonical NF- κ B Signaling." STEM CELLS **Epub ahead of print**.
- Maccani, MA, Padbury, JF und Marsit, CJ (2011). "miR-16 and miR-21 Expression in the Placenta Is Associated with Fetal Growth." PLoS ONE **6**(6): e21210.
- Macfarlane, WM, McKinnon, CM, Felton-Edkins, ZA, Cragg, H, James, RFL und Docherty, K (1999). "Glucose Stimulates Translocation of the Homeodomain Transcription Factor PDX1 from the Cytoplasm to the Nucleus in Pancreatic β -Cells." Journal of Biological Chemistry **274**(2): 1011-1016.
- Maloney, CA, Hay, SM, Young, LE, Sinclair, KD und Rees, WD (2011). "A Methyl-Deficient Diet Fed to Rat Dams during the Peri-Conception Period Programs Glucose Homeostasis in Adult Male but Not Female Offspring." The Journal of Nutrition **141**(1): 95-100.
- Maltsev, VA, Wobus, AM, Rohwedel, J, Bader, M und Hescheler, J (1994). "Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents." Circulation research **75**(2): 233-244.
- Marson, A, Levine, SS, Megan F. Cole, Frampton, GM, Tobias Brambrink, Johnstone, S, Guenther, MG, Johnston, WK, Wernig, M, Newman, J, Calabrese, JM, Dennis, LM, Volkert, TL, Gupta, S, Love, J, Hannett, N, Sharp, PA, Bartel, DP, Jaenisch, R und Young, RA (2008). "Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells." Cell **134**: 521-533.
- Martin, GR und Evans, MJ (1975). "Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **72**(4): 1441-1445.
- Martin, KL und Leese, HJ (1995). "Role of glucose in mouse preimplantation embryo development." Molecular reproduction and development **40**(4): 436-434.
- Martinelli, R, Nardelli, C, Pilone, V, Buonomo, T, Liguori, R, Castano, I, Buono, P, Masone, S, Persico, G, Forestieri, P, Pastore, L und Sacchetti, L (2010). "miR-519d Overexpression Is Associated With Human Obesity." Obesity **18**(11): 2170-2176.
- Masino, AM, Gallardo, TD, Wilcox, CA, Olson, EN, Williams, RS und Garry, DJ (2004). "Transcriptional Regulation of Cardiac Progenitor Cell Populations." Circulation research **95**(4): 389-397.
- McBurney, MW (1993). "P19 embryonal carcinoma cells." International Journal of Developmental Biology **37**: 135-140.
- McBurney, MW und Rogers, BJ (1982). "Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns." Developmental Biology **89**(2): 503-508.

- McMillen, IC und Robinson, JS (2005). "Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming." Physiological Reviews **85**(2): 571-633.
- Mitsui, K, Tokuzawa, Y, Itoh, H, Segawa, K, Murakami, M, Takahashi, K, Maruyama, M, Maeda, M und Yamanaka, S (2003). "The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells." Cell **113**(5): 631-642.
- Moley, K, Chi, M, Manchester, J, McDougal, D und Lowry, O (1996). "Alterations of intraembryonic metabolites in preimplantation mouse embryos exposed to elevated concentrations of glucose: a metabolic explanation for the developmental retardation seen in preimplantation embryos from diabetic animals." Biology of Reproduction **54**(6): 1209-1216.
- Moley, KH (2001). "Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women." Trends in Endocrinology & Metabolism **12**(2): 78-82.
- Moshe, S (2009). "The early life environment and the epigenome." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1790**(9): 878-885.
- Mountford, P, Zevnik, B, Duwel, A, Nichols, J, Li, M, Dani, C, Robertson, M, Chambers, I und Smith, A (1994). "Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(10): 4303-4307.
- Muhlhausler, BS, Adam, CL, Findlay, PA, Duffield, JA und McMillen, IC (2006). "Increased maternal nutrition alters development of the appetite-regulating network in the brain." The FASEB Journal **20**(8): 1257-1259.
- Muhlhausler, BS, Duffield, JA und McMillen, IC (2007). "Increased Maternal Nutrition Stimulates Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ , Adiponectin, and Leptin Messenger Ribonucleic Acid Expression in Adipose Tissue before Birth." Endocrinology **148**(2): 878-885.
- Muhlhausler, BS, Roberts, CT, Yuen, BSJ, Marrocco, E, Budge, H, Symonds, ME, McFarlane, JR, Kauter, KG, Stagg, P, Pearse, JK und McMillen, IC (2003). "Determinants of Fetal Leptin Synthesis, Fat Mass, and Circulating Leptin Concentrations in Well-Nourished Ewes in Late Pregnancy." Endocrinology **144**(11): 4947-4954.
- Murchison, EP, Partridge, JF, Tam, OH, Cheloufi, S und Hannon, GJ (2005). "Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**: 12135-12140.
- Nakayama, J-i, Rice, JC, Strahl, BD, Allis, CD und Grewal, SIS (2001). "Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly" Science **292**(5514): 110-113.
- Navarrete Santos, A, Tonack, S, Kirstein, M, Kietz, S und Fischer, B (2004). "Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos." Reproduction **128**(5): 503-516.
- Nikoshkov, A, Sunkari, VG, Savu, O, Forsberg, E, Catrina, S-B und Brismar, K (2011). "Epigenetic DNA methylation in the promoters of the Igf1 receptor and insulin receptor genes in db/db mice." Epigenetics **6**(4): 405 - 409.
- Okamura, K, Hagen, JW, Duan, H, Tyler, DM und Lai, EC (2007). "The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in Drosophila." Cell **130**(1): 89-100.

- Oskowitz, AZ, Lu, J, Penfornis, P, Ylostalo, J, McBride, J, Flemington, EK, Darwin, PJ und Pochampally, R (2008). "Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: Regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**: 18372-18377.
- Otto, T und Lane, M (2005). "Adipose development: from stem cell to adipocyte." Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **40**(4): 229-242.
- Ozanne, S, Jensen, C, Tingey, K, Storgaard, H, Madsbad, S und Vaag, A (2005). "Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression." Diabetologia **48**(3): 547-552.
- Pantaleon, M und Kaye, P (1998). "Glucose transporters in preimplantation development." Reviews of Reproduction **3**(2): 77-81.
- Pantaleon, M und Kaye, PL (2005). "Nutrient sensing by the early mouse embryo: hexosamine biosynthesis and glucose signalling during preimplantation development." Reproduction, Fertility and Development **17**(9): 70-70.
- Pirola, L, Balcerczyk, A, Tothill, RW, Haviv, I, Kaspi, A, Lunke, S, Ziemann, M, Karagiannis, T, Tonna, S, Kowalczyk, A, Beresford-Smith, B, Macintyre, G, Kelong, M, Hongyu, Z, Zhu, J und El-Osta, A (2011). "Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells." Genome Research **21**(10): 1601-1615.
- Quinn, P (1995). "Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate." Journal of Assisted Reproduction and Genetics **12**(2): 97-105.
- Ramin, N, Thieme, R, Fischer, S, Schindler, M, Schmidt, T, Fischer, B und Santos, AN (2010). "Maternal Diabetes Impairs Gastrulation and Insulin and IGF-I Receptor Expression in Rabbit Blastocysts." Endocrinology **151**(9): 4158-4167.
- Rattanatray, L, MacLaughlin, SM, Kleemann, DO, Walker, SK, Muhlhausler, BS und McMillen, IC (2010). "Impact of Maternal Periconceptional Overnutrition on Fat Mass and Expression of Adipogenic and Lipogenic Genes in Visceral and Subcutaneous Fat Depots in the Postnatal Lamb." Endocrinology **151**(11): 5195-5205.
- Raychaudhuri, N, Raychaudhuri, S, Thamocharan, M und Devaskar, SU (2008). "Histone Code Modifications Repress Glucose Transporter 4 Expression in the Intrauterine Growth-restricted Offspring." Journal of Biological Chemistry **283**(20): 13611-13626.
- Reinking, BE, Wedemeyer, EW, Weiss, RM, Segar, JL und Scholz, TD (2009). "Cardiomyopathy in offspring of diabetic rats is associated with activation of the MAPK and apoptotic pathways." Cardiovascular Diabetology **8**: 43.
- Rodriguez, A, Griffiths-Jones, S, Ashurst, JL und Bradley, A (2004). "Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units." Genome Research **14**(10a): 1902-1910.
- Rohwedel, J, Guan, K, Hegert, C und Wobus, AM (2001). "Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects." Toxicology in Vitro **15**(6): 741-753.
- Rohwedel, J, Maltsev, V, Bober, E, Arnold, H-H, Hescheler, J und Wobus, AM (1994). "Muscle Cell Differentiation of Embryonic Stem Cells Reflects Myogenesis in Vivo: Developmentally Regulated Expression of Myogenic Determination Genes and Functional Expression of Ionic Currents." Developmental Biology **164**(1): 87-101.

- Rohwedel, J, Sehlmeier, U, Shan, J, Meister, A und Wobus, A (1996). "Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution." Cell Biology International **20**(8): 579-587.
- Rolletschek, A, Blyszczuk, P und Wobus, AM (2004). "Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model systems to study toxicological effects." Toxicology Letters **149**(1-3): 361-369.
- Romao, JM, Jin, W, Dodson, MV, Hausman, GJ, Moore, SS und Guan, LL (2011). "MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis." Experimental Biology and Medicine **236**(9): 997-1004.
- Rosen, ED, Hsu, C-H, Wang, X, Sakai, S, Freeman, MW, Gonzalez, FJ und Spiegelman, BM (2002). "C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway." Genes & Development **16**(1): 22-26.
- Rosen, ED und MacDougald, OA (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." Nature Reviews Molecular Cell Biology **7**(12): 885-896.
- Rosen, ED und Spiegelman, BM (2006). "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis." Nature **444**(7121): 847-853.
- Ross, S, Hemati, N, Longo, K, Bennett, C, Lucas, P, Erickson, R und MacDougald, O (2000). "Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling." Science **289**(5481): 950-953.
- Rüegg, J, Cai, W, Karimi, M, Kiss, NB, Swedenborg, E, Larsson, C, Ekström, TJ und Pongratz, I (2011). "Epigenetic Regulation of Glucose Transporter 4 by Estrogen Receptor β ." Molecular Endocrinology **25**: 2017-2028.
- Schädlich, K, Knelangen, J, Navarrete Santos, A, Fischer, B und Navarrete Santos, A (2010). "A simple method to sort ESC-derived adipocytes." Cytometry A **77**(10): 990-995.
- Schmitt, RM, Bruyns, E und Snodgrass, HR (1991). "Hematopoietic development of embryonic stem cells in vitro: cytokine and receptor gene expression." Genes & Development **5**(5): 728-740.
- Schöler, H, Balling, R, Hatzopoulos, A, Suzuki, N und Gruss, P (1989). "Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis." The EMBO Journal **8**(9): 2551-2557.
- Scholz, G, Pohl, I, Genschow, E, Klemm, M und Spielmann, H (1999). "Embryotoxicity Screening Using Embryonic Stem Cells in vitro: Correlation to in vivo Teratogenicity." Cells Tissues Organs **165**(3-4): 203-211.
- Schroeder, IS, Rolletschek, A, Blyszczuk, P, Kania, G und Wobus, AM (2006). "Differentiation of mouse embryonic stem cells to insulin-producing cells." Nature Protocols **1**(2): 495-507.
- Sinclair, KD, Allegrucci, C, Singh, R, Gardner, DS, Sebastian, S, Bispham, J, Thurston, A, Huntley, JF, Rees, WD, Maloney, CA, Lea, RG, Craigon, J, McEvoy, TG und Young, LE (2007). "DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(49): 19351-19356.
- Skerjanc, IS (1999). "Cardiac and Skeletal Muscle Development in P19 Embryonal Carcinoma Cells." Trends in Cardiovascular Medicine **9**(5): 139-143.
- Smith, AG (2001). "EMBRYO-DERIVED STEM CELLS: Of Mice and Men." Annual Review of Cell and Developmental Biology **17**(435-462).

- Solter, D und Knowles, B (1978). "Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1)." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **75**(11): 5565-5567.
- Stefani, G und Slack, FJ (2008). "Small non-coding RNAs in animal development." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(3): 219-230.
- Strahl, BD und Allis, CD (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**: 41-45.
- Strübing, C, Ahnert-Hilger, G, Shan, J, Wiedenmann, B, Hescheler, J und Wobus, AM (1996). "Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons." Mechanisms of Development **53**(2): 275-287.
- Süfke, S, Djonlajić, H und Kibbel, T (2010). "Impairment of cardiac autonomic nervous system and incidence of arrhythmias in severe hyperglycemia." Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin **105**(12): 858-870.
- Sun, T, Fu, M, Bookout, AL, Kliewer, SA und Mangelsdorf, DJ (2009). "MicroRNA let-7 Regulates 3T3-L1 Adipogenesis." Molecular Endocrinology **23**(6): 925-931.
- Takahashi, Y und First, NL (1992). "In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins." Theriogenology **37**(5): 963-978.
- Takashima, Y, Era, T, Nakao, K, Kondo, S, Kasuga, M, Smith, AG und Nishikawa, S-I (2007). "Neuroepithelial Cells Supply an Initial Transient Wave of MSC Differentiation." Cell **129**(7): 1377-1388.
- Tang, W, Zeve, D, Seo, J, Jo, A-Y und Graff, JM (2011). "Thiazolidinediones Regulate Adipose Lineage Dynamics." Cell Metabolism **14**(1): 116-122.
- Tang, X, Muniappan, L, Tang, G und Özcan, S (2009). "Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic β -cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription." RNA **15**(2): 287-293.
- ten Berge, D, Koole, W, Fuerer, C, Fish, M, Eroglu, E und Nusse, R (2008). "Wnt Signaling Mediates Self-Organization and Axis Formation in Embryoid Bodies." Cell Stem Cell **3**(5): 508-518.
- Tesar, PJ, Chenoweth, JG, Brook, FA, Davies, TJ, Evans, EP, Mack, DL, Gardner, RL und McKay, RDG (2007). "New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells." Nature **448**(7150): 196-199.
- Thamotharan, M, Shin, B-C, Suddirikku, DT, Thamotharan, S, Garg, M und Devaskar, SU (2005). "GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring." The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism **288**(5): E935-E947.
- Thompson, JG, Simpson, AC, Pugh, PA und Tervit, HR (1992). "Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos." Molecular reproduction and development **31**(4): 253-257.
- Tonack, S, Kind, K, Thompson, JG, Wobus, AM, Fischer, B und Navarrete Santos, A (2007). "Dioxin Affects Glucose Transport via the Arylhydrocarbon Receptor Signal Cascade in Pluripotent Embryonic Carcinoma Cells." Endocrinology **148**(12): 5902-5912.
- Torrens, C, Hanson, MA, Gluckman, PD und Vickers, MH (2009). "Maternal undernutrition leads to endothelial dysfunction in adult male rat offspring independent of postnatal diet." British Journal of Nutrition **101**: 27-33.

- Vickers, MH, Ikenasio, BA und Breier, BH (2001). "IGF-I Treatment Reduces Hyperphagia, Obesity, and Hypertension in Metabolic Disorders Induced by Fetal Programming." Endocrinology **142**(9): 3964-3973.
- Vittet, D, Prandini, M, Berthier, R, Schweitzer, A, Martin-Sisteron, H, Uzan, G und Dejana, E (1996). "Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps " Blood **88**: 3424-3431.
- Wang, E (2007). "MicroRNA, the putative molecular control for mid-life decline." Ageing Research Reviews **6**(1): 1-11.
- Wang, L, Jin, Q, Lee, J-E, Su, I-h und Ge, K (2010). "Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis " Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **Epub ahead of print**.
- Wang, Q, Li YC, Wang J, Kong J, Qi Y, Quigg RJ und Li, X (2008). "miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**: 2889-2894.
- Wang, Y, Medvid, R, Melton, C, Jaenisch, R und Blelloch, R (2007). "DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal." Nature Genetics **39**(3): 380-385.
- Waterland, RA und Jirtle, RL (2003). "Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation." Molecular and Cellular Biology **23**(15): 5293-5300.
- Watkins, AJ, Lucas, ES und Fleming, TP (2010a). " Impact of the periconceptual environment on the programming of adult disease." Journal of Developmental Origins of Health and Disease **1**: 87-95.
- Watkins, AJ, Lucas, ES, Torrens, C, Cleal, JK, Green, L, Osmond, C, Eckert, JJ, Gray, WP, Hanson, MA und Fleming, TP (2010b). "Maternal low-protein diet during mouse pre-implantation development induces vascular dysfunction and altered renin-angiotensin-system homeostasis in the offspring." British Journal of Nutrition **103**(12): 1762-1770.
- Watkins, AJ, Lucas, ES, Wilkins, A, Cagampang, FRA und Fleming, TP (2011). "Maternal Periconceptual and Gestational Low Protein Diet Affects Mouse Offspring Growth, Cardiovascular and Adipose Phenotype at 1 Year of Age." PLoS ONE **6**(12): e28745.
- Wen, B, Wu, H, Shinkai, Y, Irizarry, RA und Feinberg, AP (2009). "Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells." Nature Genetics **41**(2): 246-250.
- Williams, CL, Teeling, JL, Perry, VH und Fleming, TP (2011). "Mouse maternal systemic inflammation at the zygote stage causes blunted cytokine responsiveness in lipopolysaccharide-challenged adult offspring." BMC Biology **9**: 49.
- Wobus, A (1997). Embryonale Stammzellen der Maus in vitro – Modellobjekt der Entwicklungsbiologie und der genetischen Toxikologie Habilitationsschrift Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wobus, A, Wallukat, G und Hescheler, J (1991). "Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers." Differentiation **48**(3): 173-182.
- Wobus, AM und Boheler, KR (2005). "Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy." Physiological Reviews **85**(2): 635-678.

- Wren, C, Birrell, G und Hawthorne, G (2003). "Cardiovascular malformations in infants of diabetic mothers." Heart **89**(10): 1217-1220.
- Wu, Z, Rosen, ED, Brun, R, Hauser, S, Adelmant, G, Troy, AE, McKeon, C, Darlington, GJ und Spiegelman, BM (1999). "Cross-Regulation of C/EBP α and PPAR γ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity." Molecular Cell **3**(2): 151-158.
- Wyman, A, Pinto, AB, Sheridan, R und Moley, KH (2008). "One-Cell Zygote Transfer from Diabetic to Nondiabetic Mouse Results in Congenital Malformations and Growth Retardation in Offspring." Endocrinology **149**(2): 466-469.
- Xie, H, Lim, B und Lodish, HF (2009). "MicroRNAs Induced During Adipogenesis that Accelerate Fat Cell Development Are Downregulated in Obesity." Diabetes **58**(5): 1050-1057.
- Yang, Z, Bian, C, Zhou, H, Huang, S, Wang, S, Liao, L und Zhao, R (2011). "MicroRNA hsa-miR-138 inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through adenovirus EID-1." Stem Cells Dev. **20**(2): 259-267.
- Yokomori, N, Tawata, M und Onaya, T (1999). "DNA demethylation during the differentiation of 3T3-L1 cells affects the expression of the mouse GLUT4 gene." Diabetes **48**(4): 685-690.
- Zaragosi, L-E, Wdziekonski, B, Brigand, KL, Villageois, P, Mari, B, Waldmann, R, Dani, C und Barbry, P (2011). "Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis." Genome Biology **12**: R:64.
- Zheng, S, Rollet, M und Pan, Y-X (2011). "Protein restriction during gestation alters histone modifications at the glucose transporter 4 (GLUT4) promoter region and induces GLUT4 expression in skeletal muscle of female rat offspring." The Journal of Nutritional Biochemistry **Epub ahead of print.**

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α -MHC	<i>alpha-Myosin-heavy-chain</i>
ART	assistierte Reproduktionstechniken
bp	Basenpaare
BPA	Bisphenol A
cAMP	zyklischen Adenosinmonophosphats
C/EBP	<i>CCAAT enhancer-binding protein</i>
CGR8-ESC	murine embryonale Stammzellen der Linie CGR8
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
d	Tag
DEHP	bis(2-ethylhexyl)-Phthalat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOHaD	<i>Developmental origin of health and disease</i>
EB	<i>embryoid body</i>
ECC	Embryonale Karzinomzellen (<i>embryonic carcinoma cells</i>)
EGC	Embryonale Keimzellen (<i>embryonic germ cells</i>)
ESC	Embryonale Stammzellen (<i>embryonic stem cells</i>)
EpiSC	Epiblast-Stammzellen (epiblast-derived stem cells)
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
GLUT	diffusionsabhängige Glukosetransporter
h	Stunde
H3K9me2	Dimethylierung am Lysinrest 7 des Histons H3
H3K9me3	Trimethylierung am Lysinrest 7 des Histons H3
ICM	innere Zellmasse (<i>inner cell mass</i>)
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGF-R	<i>Insulin-like growth factor</i> -Rezeptor

IR	Insulinrezeptor
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
LIF	<i>leukaemia inhibitory factor</i>
mESC	murine embryonale Stammzellen
(m)RNA	(<i>messenger</i>) Ribonukleinsäure
miR/miRNA	microRNA
MW	Mittelwert
P19-ECC	murine embryonale Karinomzellen der Linie P19
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGC	primordiale Keimzelle
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
pre-miRs	<i>precursor</i> microRNAs
pri-miRs	<i>primary</i> microRNAs
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
T ₃	Trijodthyronin
Tab.	Tabelle
TBT	Tributyltin
Wnt	<i>wingless-type MMTV integration site family</i>

10. Abbildungsverzeichnis

- **Abb.1 Herkunft und Differenzierungspotential embryonaler Zellen der Maus (Wobus und Boheler 2005).**
- **Abb.2 Schematische Darstellung des adipogenen Differenzierungsprotokolls der embryonalen Stammzelllinie CGR8**
- **Abb.3 Schematische Darstellung des kardiomyogenen Differenzierungsprotokolls der embryonalen Karzinomzellen der Linie P19.**
- **Abb.4a Relative Menge reifer Adipozyten nach 21 Tagen adipogener Differenzierung von CGR8-ESC bei einer Glukoseexposition während der Determinierungsphase.**
- **Abb.4b Relative Menge reifer Adipozyten nach 21 Tagen adipogener Differenzierung von CGR8-ESC bei einer Glukoseexposition der undifferenzierten Stammzellen.**
- **Abb.5 Dimethylierung des Histons H3 während der adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC.**

11. Tabellenverzeichnis

- **Tab.1 Übersicht bekannter, an der Regulation der Adipogenese beteiligter, microRNAs.**
- **Tab.2 Tabellarische Übersicht des Methylierungsstatus ausgewählter CpGs in den Promotorregionen von GLUT4, IGF1-R und IR während der adipogenen Differenzierung von CGR8-ESC (unveröffentlichte Ergebnisse).**

Lebenslauf

- Name:** Julia Miriam Knelangen geb. Haag
- Geburtsdatum:** 5. Mai 1982
- Familienstand:** verheiratet mit Matthias Knelangen; 1 Sohn (2 Jahre)
- Schulbildung:** **bis 2001**
Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Heilbronn
Allgemeine Hochschulreife
- Auslandsaufenthalte:** **08/2001 – 06/2002**
Freiwilligendienst in Amman, Jordanien
09/2008 – 01/2009
DAAD-Stipendium für einen Forschungsaufenthalt an der University of Adelaide, School of Reproductive Health, Adelaide, Australien
- Studium:** **10/2002 – 07/2007**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale
Studiengang Ernährungswissenschaften
Dipl. Ernährungswissenschaftlerin (Abschluss 1,0)
- Thema der Diplomarbeit: Untersuchung der Transkriptionsregulation von stoffwechselrelevanten Genen in embryonalen Karzinomzellen
- Institut für Anatomie und Zellbiologie
Professor Bernd Fischer, Dr. Anne Navarrete Santos
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 10/2007 – 09/2011**
Promotion (Promotionsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes)
- Institut für Anatomie und Zellbiologie, Professor Bernd Fischer
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 10/2011 -**
Doktorandin, Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Auszeichnung:** „Auszeichnung zur besten Absolventin 2007 im Studiengang Ernährungswissenschaften“ der Gesellschaft zur Förderung der Agrar- und Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg e. V.

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen, Vorträge und Poster eingegangen:

Zeitschriftenartikel

Knelangen JM, Kurz R, Schagdarsurengin U, Fischer B, Navarrete Santos A (2012): Short-time glucose exposure of embryonic carcinoma cells impairs their function as terminally differentiated cardiomyocytes. *Biochem Bioph Res Co* 420: 230-235

Biemann R, Navarrete Santos A, Navarrete Santos A, Riemann D, Knelangen JM, Blüher M, Koch H, Fischer B (2012): Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows. *Biochem Bioph Res Co* 417(2): 747-752.

Knelangen JM, van der Hoek B, Kong WC, Owens JA, Fischer B, Navarrete Santos A (2011): MicroRNA expression profile during adipogenic differentiation in mouse embryonic stem cells. *Physiological Genomics*: 43(10):611-620

Knelangen JM, Schädlich K, Navarrete Santos A, Fischer B, Navarrete Santos A (2010): A simple method to sort ESC-derived adipocytes. *Cytometry A*: 77(10):990-995.

Publizierte Abstracts

Knelangen JM, Navarrete Santos A, Kurz R, Fischer B, Navarrete Santos A (2011) Metabolic programming of embryonic cells. 28. Arbeitstagung der anatomischen Gesellschaft, Würzburg 28.–30. September 2011 DOI 10.3337/anatges.2011.0014

Haag JM, van der Hoek M, Kong WC, Owens JA, Fischer B, Navarrete Santos A (2010) Characterization of new microRNA clusters involved in embryonic stem cell differentiation into adipocytes. 43. Jahrestagung Physiologie u. Pathologie der Fortpflanzung, gleichzeitig 35. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, München 24. - 26. Februar 2010 DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01589.x

Nicht publizierte Beiträge

Vorträge

Julia Knelangen: "The role of microRNAs and glucose in adipogenic differentiation of mouse embryonic stem cells", 6th International Conference on the Female Reproductive Tract, Frauenwörth 20.–23. Mai 2011

Julia Haag „Angeboren, aber nicht vererbt. Frühe Einflüsse prägen für das ganze Leben“ Doktorandentagung der Studienstiftung des deutschen Volkes, Koppelsberg bei Plön, 13.-16. November 2009

Poster

Knelangen JM, Navarrete Santos A, Kurz R, Fischer B, Navarrete Santos A (2012) Metabolic and epigenetic programming of embryonic cells. 49. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V., Freising-Weihenstephan 14.-16. März 2012

Knelangen JM, Navarrete Santos A, Fischer B, Navarrete Santos A (2011) The influence of glucose on epigenetic modifications during adipogenic differentiation of mouse embryonic stem cells. Batsheva de Rothschild Seminar on Periconceptual Developmental Programming, Jerusalem 31.Mai – 3.Juni 2011

Haag JM, van der Hoek M, Kong WC, Owens JA, Fischer B, Navarrete Santos A (2009) Expression of microRNA during adipogenic differentiation of mouse embryonic stem cells. 7th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Barcelona 8.-11.Juli 2009

Haag JM, Schagdarsurengin U, Dammann R, Müller-Werdan U, Fischer B, Navarrete Santos A (2007): Short-time hyperglycaemia of non-differentiated embryonic carcinoma cells impairs their myocontractility as cardiomyocytes. Tagung Tissue Ageing: from Molecular Biology to Clinical Perspectives, Halle 28. – 30. September 2007

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), den 09. Mai 2012

Julia Knelangen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei **Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer** für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie anzufertigen. Für die stetige Unterstützung und für die Hilfestellung bei der Realisierung von Teilnahmen an Kongressen und einem Aufenthalt im Ausland danke ich ganz besonders.

Mein besonderer Dank gilt **Frau Dr. Anne Navarrete Santos** für die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge, die Anleitung zum eigenverantwortlichen Arbeiten und für die stets freundschaftliche und kollegiale Atmosphäre.

Bei **Frau Prof. Dr. Anna Wobus** bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und für die Überlassung der Stammzelllinie CGR8. **Frau Dr. Insa Schröder** danke ich für viele ideenreiche Diskussionen, das kritische Lesen von Manuskripten und für die Hilfe bei der Kultivierung der Stammzelllinie CGR8.

Herrn Dr. Alexander Navarrete Santos danke ich herzlich für die viele Zeit, die er investiert hat, um für uns die FACS-Analysen durchzuführen. **Herrn Dr. Randy Kurz** möchte ich mein Dank dafür aussprechen, dass er uns die MEA-Messungen ermöglicht hat.

Frau Prof. Julie Owens und **Mark van der Hoek** danke ich für die freundliche Aufnahme und Hilfestellung bei der microRNA-Expressionsanalyse in Adelaide, Australien.

Sabine Schrötter und **Michaela Kirstein** standen mir mit viel Ausdauer bei der Laborarbeit zur Seite. Für die gute Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft möchte ich herzlich danken. **Kristina Schädlich, Maria Schindler, René Thieme, Sünje Fischer, Matthias Jung, Ronald Biemann** und **Juliane-Susanne Schmidt** danke ich für die vielen wertvollen Ratschläge und das stete Interesse an meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt **meiner Familie**, sowie allen **Freunden und Bekannten**, die mich während der gesamten Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Der **Studienstiftung des deutschen Volkes** und dem **DAAD** danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.