

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer

**Einfluss des Weichmachers Di(2-ethylhexyl)phthalat auf die Adipogenese einer  
humanen Präadipozytenlinie**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Luise Hunger

geboren am 10.09.1990 in Berlin

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer  
Prof. Dr. med. Mathias Faßhauer  
PD Dr. med. Lutz P. Müller

Datum der Eröffnung des Promotionsverfahrens: 05.05.2015

Datum der Verteidigung: 17.12.2015

## Referat

Übergewicht, Adipositas und ihre Folgeerkrankungen sind aktuelle gesundheitliche Herausforderungen. Umweltschadstoffe stehen im Verdacht, eine Mitschuld an der pandemischen Ausbreitung dieser Erkrankungen zu tragen. So auch die in großen Mengen für Alltagsartikel aus Kunststoff produzierten Phthalate. Der Weichmacher Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) und sein Metabolit Mono(2-ethylhexyl)phthalat (MEHP) stehen im Verdacht, die Fettzellendifferenzierung des Menschen während bestimmter Entwicklungsschritte von der mesenchymalen Stammzelle bis zum reifen Adipozyten zu beeinflussen. Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, den dickmachenden „obesogenen“ Einfluss des DEHP auf die Adipogenese humaner Fettvorläuferzellen (Prädipozyten) zu untersuchen. Hierzu wurden Zellen der humanen Prädipozytenlinie Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom (SGBS) in einer 14-tägigen Zellkultur zu reifen Adipozyten differenziert. Während der Induktionsphase der Differenzierung von Tag 0 bis Tag 4 wurden sie DEHP gelöst im Induktionsmedium in umweltrelevanter Konzentration von 50 µg/ml ausgesetzt. Die Hydrolyse von DEHP zu MEHP wurde mittels *HPLC*-gekoppelter Massenspektrometrie nachgewiesen. Die Dysregulation der Adiponektinsignalkaskade wurde mittels *qRT-PCR*, *Western-Blot* und *ELISA* analysiert. Der Frage nach einer DEHP-induzierten Hypertrophie oder Hyperplasie der Adipozyten wurde mittels *FACS* nachgegangen. Die intrazelluläre Lokalisation von Perilipin und GLUT4 am Tag 10 wurde mittels Immunfluoreszenz ermittelt. Die *qRT-PCR* ergab eine direkte Dysregulation der Gene Adiponektin, Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (*AMPK*) und Acetyl-CoA-Carboxylase β (*ACACB*) am Tag 4. Die *ELISA* der Medienüberstände von Tag 14 ergaben eine langfristig erhöhte Proteinsekretion von LEPTIN, jedoch keine langfristig dysregulierte Proteinsynthese von ADIPONEKTIN. Die *FACS*-Analyse am Tag 8 ergab signifikant mehr Fett pro Zelle. Es kann daher geschlossen werden, dass in Prädipozyten DEHP in MEHP umgewandelt wird und die DEHP-Exposition die Adiponektinsignalkaskade sowie die Expression von Leptin dysreguliert. Folglich hat eine DEHP-Exposition in umweltrelevanter Konzentration während der Induktionsphase der Adipogenese in SGBS-Zellen ein obesogenes Potenzial.

Hunger, Luise: Einfluss des Weichmachers Di(2-ethylhexyl)phthalat auf die Adipogenese einer humanen Prädipozytenlinie, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 71 Seiten, 2015

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Allgemeine Einführung .....	1
1.1.1	Adipositas – ein weltweites Problem von Kindern und Erwachsenen .....	1
1.1.2	Von Hypothesen, Disruptoren und dem DEHP .....	2
1.1.3	Der Weichmacher DEHP – Umweltschadstoff und endokriner Disruptor ....	6
1.2	SGBS-Zellkulturmodell der humanen Adipogenese.....	10
1.2.1	Allgemeine Charakterisierung der humanen Adipogenese .....	10
1.2.2	Das SGBS-Zellkulturmodell.....	11
1.3	Charakterisierung der Adiponektinsignalkaskade .....	12
1.3.1	Adiponektin und seine metabolische Wirkung .....	12
1.3.2	Leptin im menschlichen Organismus.....	13
1.3.3	Die Adiponektinsignalkaskade.....	14
2	Zielstellung der Arbeit .....	17
3	Material und Methodik .....	18
3.1	Zelllinie und Zellkultur .....	18
3.1.1	SGBS-Zellkultur .....	18
3.1.2	Kultivierung und Differenzierung der SGBS-Zellen.....	18
3.1.3	Behandlung der Zellen mit DEHP und DMSO .....	20
3.1.4	Einfrieren und Auftauen der Zellen .....	20
3.1.5	Passagieren der Zellen .....	21
3.2	Genexpressionsanalyse-vorbereitende Schritte .....	21
3.2.1	Isolation von <i>RNA</i> aus SGBS-Proben .....	21
3.2.2	Proteinisolation und Proteinkonzentrationsbestimmung .....	22
3.2.3	Reverse Transkription zur <i>cDNA</i> -Synthese .....	22
3.3	<i>Primer</i> -Etablierung .....	23
3.4	Herstellung von Plasmidstandards für die <i>qRT-PCR</i> .....	24
3.4.1	Ligation .....	24

3.4.2	Transformation der Plasmide/Vektoren in kompetente <i>E.coli XL1-Blue</i> und Blau-Weiß-Selektion positiver Klone .....	24
3.4.3	Flüssigkulturansatz und Plasmidpräparation .....	25
3.4.4	Restriktion der Plasmide .....	25
3.4.5	<i>Primer</i> für die <i>qRT-PCR</i> .....	26
3.5	Genexpressionsanalyse mittels <i>qRT-PCR</i> .....	26
3.6	<i>FACS</i> -Analyse von SGBS-Zellen .....	28
3.7	Proteinnachweis mittels <i>Western-Blot</i> .....	28
3.7.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	28
3.7.2	<i>Western-Blot</i> .....	30
3.7.3	Binden spezifischer Antikörper .....	30
3.7.4	Detektion der Sekundärantikörper.....	30
3.7.5	Wiederverwenden der Nitrozellulosemembran .....	31
3.8	ADIPONEKTIN- <i>ELISA</i> .....	31
3.9	LEPTIN- <i>ELISA</i> .....	32
3.10	Immunfluoreszenz von GLUT4.....	32
3.11	Immunfluoreszenz von Perilipin.....	32
3.12	<i>HPLC</i> -gekoppelte Massenspektrometrie .....	33
3.13	Statistische Auswertung.....	33
4	Ergebnisse.....	34
4.1	Nachweis von MEHP im Medium und im Zelllysat.....	34
4.1.1	<i>HPLC</i> -gekoppelte Massenspektrometrie von MEHP im Medium.....	34
4.1.2	<i>HPLC</i> -gekoppelte Massenspektrometrie von MEHP im Zelllysat.....	34
4.2	Quantifizierung der Proteine ADIPONEKTIN und LEPTIN im Medium .....	35
4.3	Genexpressionsanalyse der Adiponektinsignalkaskade und seiner Regulatoren .....	36
4.3.1	Genexpressionsanalyse der Adipozyten-Marker <i>ADIPOR2</i> , <i>CPT1</i> und <i>GLUT4</i> .....	36
4.3.2	Genexpressionsanalyse von Adiponektin, <i>AMPK</i> und <i>ACACB</i> .....	37
4.3.3	Genexpressionsanalyse von <i>LEPR</i> und <i>PPAR<math>\alpha</math></i> .....	39

4.4	Proteinquantifizierung mittels <i>Western-Blot</i> -Analyse .....	40
4.4.1	<i>Western-Blot</i> -Analysen von Tag 8.....	41
4.4.2	<i>Western-Blot</i> -Analysen von Tag 14.....	42
4.5	<i>FACS</i> -Analyse der Differenzierungseffizienz zu Adipozyten.....	42
4.6	Immunfluoreszenz von PERILIPIN und GLUT4.....	44
4.6.1	Lokalisation von PERILIPIN in SGBS-Zellen von Tag 10 .....	44
4.6.2	Lokalisation von GLUT4 in SGBS-Zellen von Tag 10.....	45
5	Diskussion.....	47
5.1	DEHP wird in MEHP umgewandelt .....	47
5.2	DEHP reguliert die Genexpression von Adiponektin herunter .....	49
5.3	DEHP erhöht die Sekretion von LEPTIN langfristig .....	50
5.4	DEHP vermindert die Anzahl des Adiponektinrezeptors 2 an Tag 14 .....	51
5.5	DEHP dysreguliert die Genexpression der <i>AMPK</i> , der <i>ACACB</i> und des <i>LEPR</i> .....	52
5.6	DEHP wirkt auf SGBS-Zellen hypertroph .....	53
5.7	DEHP führt zu mehr PERILIPIN und lässt GLUT4 unbeeinflusst.....	54
5.8	Schlussfolgerung.....	54
5.9	Ausblick .....	55
6	Zusammenfassung.....	57
7	Literaturverzeichnis .....	58
8	Thesen.....	71

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Koinzidenz der industriellen Herstellung organischer und anorganischer Chemikalien und der Zunahme von Übergewicht in der erwachsenen Bevölkerung in den USA im Zeitraum von 1930 bis 2000 .....	3
Abbildung 2:	Wege der Exposition mit endokrinen Disruptoren .....	8
Abbildung 3:	Adiponektinsignalkaskade .....	15
Abbildung 4:	SGBS-Zellkulturmodell.....	19
Abbildung 5:	Zellkultur und Probenahme.....	20
Abbildung 6:	Massenspektrometrie von MEHP im Medium und Zelllysat.....	35
Abbildung 7:	ADIPONEKTIN- und LEPTIN-Gehalt im Medium von Tag 14 .....	36
Abbildung 8:	Absolute Transkriptmengen Adipogenese-spezifischer Markergene ...	37
Abbildung 9:	Absolute Transkriptmengen von Adiponektin, <i>AMPK</i> und <i>ACACB</i> .....	39
Abbildung 10:	Absolute Transkriptmengen von <i>LEPR</i> und <i>PPAR<math>\alpha</math></i> .....	40
Abbildung 11 -	Beispielhafte Detektion anhand des <i>Western-Blot</i> von ADIPOR2 .....	41
Abbildung 12:	Proteinquantifizierung an Tag 8 .....	41
Abbildung 13:	Proteinquantifizierung an Tag 14 .....	42
Abbildung 14:	Beispielhafte <i>FACS</i> -Analyse .....	43
Abbildung 15:	<i>FACS</i> -Analyse der Differenzierungseffizienz zu Adipozyten .....	44
Abbildung 16:	Lokalisation von PERILIPIN und Lichtmikroskopie an Tag 10.....	45
Abbildung 17:	Lokalisation von GLUT4 und Lichtmikroskopie an Tag 10.....	46

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Maximale <i>iatrogene</i> DEHP-Exposition Neugeborener.....	10
Tabelle 2:	Zusammensetzungen der Zellkulturmedien .....	18
Tabelle 3:	Pipettieransatz zur reversen Transkription .....	22
Tabelle 4:	<i>PCR</i> -Ansatz je Probe.....	23
Tabelle 5:	20 µl Ligationsansatz je Probe .....	24
Tabelle 6:	<i>Lurea-Bertani-Broth-Agar</i> .....	25
Tabelle 7:	Restriktionsansatz .....	25
Tabelle 8:	<i>Primer</i> für die <i>qRT-PCR</i> .....	26
Tabelle 9:	Mastermix für die <i>qRT-PCR</i> .....	27
Tabelle 10:	Thermoprotokoll der <i>qRT-PCR</i> .....	27
Tabelle 11:	Trenngel der SDS-PAGE .....	29
Tabelle 12:	Sammelgel der SDS-PAGE .....	29
Tabelle 13:	Elektrophoresepuffer 10fach-Laemmli .....	29
Tabelle 14:	Transferpuffer für <i>Western-Blot</i> .....	30
Tabelle 15:	<i>TBS</i> -Puffer.....	30
Tabelle 16:	Primär- und Sekundärantikörper für <i>Western-Blot</i> .....	31

# Abkürzungsverzeichnis

## A

ACACB.....	Acetyl-CoA-Carboxylase $\beta$
ADIPOR2.....	Adiponektinrezeptor 2
AMPK.....	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
AMPKK.....	Adenosinmonophosphatkinasekinase
APS.....	Ammoniumpersulfat
ATP.....	Adenosintriphosphat

## B

<i>BMI</i> .....	<i>Body-Mass-Index</i>
BSA.....	bovines Serumalbumin

## C

<i>cDNA</i> .....	<i>copy desoxyribonucleic acid</i>
<i>CDS</i> .....	<i>Cell Dissociation Solution</i>
CPT1.....	Carnitin-Palmitoyltransferase 1

## D

DCHP.....	Dicyclohexylphthalat
DEHP.....	Di(2-ethylhexyl)phthalat
DEPC.....	Diethylpyrocarbonat
<i>DMEM</i> .....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
<i>DoHaD</i> .....	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>

## E

<i>ECMO</i> .....	<i>extracorporeal membrane oxygenation</i>
<i>ELISA</i> .....	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER.....	Endoplasmatisches Retikulum

## F

<i>FACS</i> .....	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
-------------------	--

## G

GLUT4.....	Glukosetransporter Typ 4
------------	--------------------------

## H

<i>HMW</i> .....	<i>high molecular weight</i>
<i>HPLC</i> .....	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP.....	Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase

**I**

IBMX..... 3-Isobutyl-1-methylxanthin  
IPTG..... Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid

**J**

JAK2..... Januskinase 2

**L**

*LB*..... *Lysogeny-Broth*  
LEPR..... Leptinrezeptor  
LKB1..... Liver Kinase B1

**M**

MEHP..... Mono(2-ethylhexyl)phthalat

**P**

pACACB..... phosphorylierte Acetyl-CoA-Carboxylase  
pAMPK..... phosphorylierte Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase  
*PBS*..... *phosphate buffered saline*  
*PCR*..... *polymerase chain reaction*  
PEPCK..... Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
PGC-1 $\alpha$ ..... PPAR $\gamma$ -Coaktivator 1 $\alpha$   
*POMC/CART pro-opiomelanocortin/ cocaine- and amphetamine-regulated transcript*  
PPAR $\alpha$ ..... Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\alpha$

**Q**

*qRT-PCR*..... *quantitative Real-Time-PCR*

**R**

*REACH*..... *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*  
*ROS*..... *reactive oxygen species*

**S**

*SDS-PAGE*..... *Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese*  
SGBS..... Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom  
*SP3*..... *Specificity Protein 3*  
*STAT*..... *Signal Transducers and Activators of Transcription*

**T**

T3..... Trijodthyronin  
TAE..... Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure  
TAG..... Triacylglycerin  
*TAK1*..... *Transforming Growth Factor  $\beta$ -activated Kinase 1*

TBST ..... *Tris buffered Saline with Tween*

TEMED ..... Tetramethylethylendiamin

**X**

X-Gal ..... 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einführung

### 1.1.1 Adipositas – ein weltweites Problem von Kindern und Erwachsenen

Übergewicht, Adipositas und ihre Folgeerkrankungen sind im 21. Jahrhundert gesundheitliche Herausforderungen von bisher nicht erwartetem Ausmaß. „Jeder Dritte weltweit ist übergewichtig“ titelte die Ärzte-Zeitung am 30.05.2014 (dpa 2014) und ergänzte: „Wegen 1980 noch 857 Millionen Menschen weltweit zu viel, waren es 2013 bereits 2,1 Milliarden Menschen.“ In Deutschland sind 67,1 % der Männer und 53,0 % der Frauen mit einem  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$  übergewichtig (Mensink et al. 2013). Fettleibigkeit mit einem  $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$  weisen 15 % der Frauen und Männer in Deutschland auf (OECD 2013).

Übergewicht und Fettleibigkeit / Adipositas sind mit Sorgfalt zu verwendende Termini, nicht zuletzt weil Gesundheitswesen und Kultur der Moderne massiven Druck auf übergewichtige Menschen ausüben, ihr Gewicht zu reduzieren. Diese Begriffe werden definiert anhand des *Body-Mass-Index*, *BMI*. Von Übergewicht wird gesprochen ab einem  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ , von Adipositas ab einem  $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$  (Mensink et al. 2013). Die Behandlungsnotwendigkeit eines Patienten aufgrund seines *BMI* muss unter anderem altersabhängig entschieden werden. Beispielsweise haben Menschen im Alter von 19 bis 24 Jahren einen optimalen *BMI* von 19 bis 24, über 64-jährige hingegen einen idealen *BMI* von 24 bis 29.

Übergewicht und Adipositas prädisponieren für Volkskrankheiten und können die Lebenserwartung um bis zu 14 Jahre senken (Kitahara et al. 2014). So steigt mit dem Körpergewicht das Erkrankungsrisiko für Diabetes mellitus Typ II, kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere die Koronare Herzkrankheit und Myokardischämie, den ischämischen Schlaganfall und Krebserkrankungen wie das Kolon-, Mamma- und Endometriumkarzinom (Abdullah et al. 2010; Wang et al. 2005b; Bogers et al. 2007; Boden-Albala und Sacco 2000; Dehlendorff et al. 2014; Pergola und Silvestris 2013).

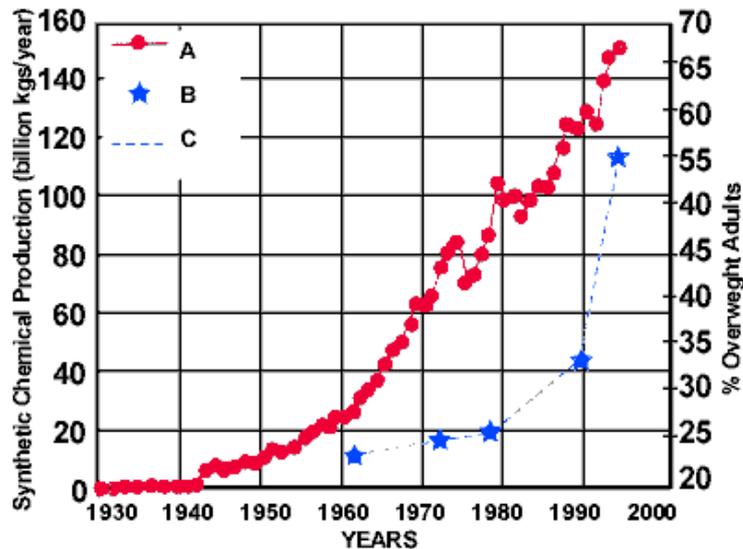
Besonders der Anstieg von Übergewicht und Adipositas im Kindes- und Jugendalter seit den 1980er Jahren ist alarmierend. Im Jahr 2013 waren 23,8 % der Jungen und 22,6 % der Mädchen in „entwickelten Ländern“ übergewichtig (Ng et al. 2014). Es konnte in der letzten Dekade ein erfreuliches Stagnieren von Übergewicht im Kindesalter in „entwickelten Ländern“ verzeichnet werden. Der Effekt resultiert aus der erfolgreichen Umsetzung präventiver Gesundheitsprogramme für Kinder mit einer Erhöhung physisch-sportlicher Aktivität, weniger Stunden vor Televisions- und

Computerkonsolen pro Tag und einer gesünderen Ernährung mit mehr Obst und Gemüse und weniger zuckerhaltigen *Soft Drinks*. Die Zahl extrem dicker Kinder nimmt jedoch weiterhin zu (Wabitsch et al. 2014). Übergewichtige Kinder müssen bereits während der Adoleszenz mit den gesundheitlichen Konsequenzen des Wohlstandsproblems Überernährung rechnen. Schon ein  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$  im Alter von 7 – 10 Jahren bahnt einen Bluthochdruck im frühen Erwachsenenalter und führt zum Metabolischen Syndrom (Howe et al. 2014).

Überernährung, Bewegungsmangel und Stress führen zu einer Gewichtszunahme. Doch ist das alles?

### **1.1.2 Von Hypothesen, Disruptoren und dem DEHP**

Die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts ist der Zeitraum der „*exploding obesity epidemic*“, der Zeitraum, in dem Übergewicht und Adipositas weltweit zur gesundheitlichen wie auch wirtschaftlichen Herausforderung wurden, der Zeitraum, in dem Hunderte von Tausenden von Tonnen an Chemikalien als Pestizide, Lösungsmittel, Emulgatoren und Weichmacher über eine massive industrielle Nutzung Einzug in den Alltag eines jeden Menschen fanden, über den Arbeitsplatz, über den Wohnraum, über die Nahrung, über die Kontamination der Umwelt (Baillie-Hamilton 2002).



**Abbildung 1: Koinzidenz der industriellen Herstellung organischer und anorganischer Chemikalien und der Zunahme von Übergewicht in der erwachsenen Bevölkerung in den USA im Zeitraum von 1930 bis 2000**

Die Koinzidenz zwischen der massiven Steigerung der industriellen Chemikalienproduktion und dem exponentiellen Anstieg der Prävalenz von Übergewicht in der US-amerikanischen Bevölkerung dient als beispielhafte Grundlage für die „*obesogen-hypothesis*“ und die „*Developmental Origins of Health and Disease*“-Hypothese des 21. Jahrhunderts. (A) Produktion synthetischer Chemikalien; (B) prozentualer Anteil von Übergewicht unter allen adulten US-Amerikanern; (C) Verbindung der Prozentpunkte (Baillie-Hamilton 2002).

Während der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts hielten Kunststoffe Einzug in den Lebensalltag des Menschen. Von deren Siegeszug ist die Rede, von Plastik Fantastik, vom Zeitalter der Plaste in direkter Folge auf die Zeitalter der Aufklärung, der Eiszeit, der Steinzeit. Kunststoff ist ein vielseitig verwendbares Material, in jede Form zu bringen, kostengünstig erwerblich und sogar Kunstobjekt. Doch ebenso viele Eigenschaften, wie dem polymeren Kunststoff zugeschrieben werden können, ebenso viele Zusätze sind im Material der Moderne enthalten.

Exogene Substanzen können endogen wirken. Stellen sie auch eine Ursache der weltweit zunehmenden Prävalenz der Adipositas dar? Diese Frage stellen die Professoren Grün und Blumberg in ihrer *Obesogen Hypothesis* (Grün und Blumberg 2006). Professor Bruce Blumberg etablierte den Begriff „obesogen“ als Charakteristikum für chemische, in der Umwelt vorkommende Stoffe mit hormonähnlicher Wirkung auf Mensch und Tier, sogenannte endokrine Disruptoren, welche die endogene Lipidakkumulation und Adipogenese stimulieren (Grün und Blumberg 2007). Es sind hierunter Umweltschadstoffe zu verstehen, welche die

Funktionen des Fettgewebes für die Physiologie des Menschen nachteilig beeinflussen (Decherf und Demeneix 2011).

Die *Obesogen Hypothesis* findet ihren Ursprung in der durch Professor David Barker in den 1990er Jahren begründeten *DoHaD*-Hypothese. Jene Hypothese der *Developmental Origins of Health and Disease (DoHaD)* postuliert eine fetale Fehlprogrammierung als maßgeblich entscheidend für die Entwicklung chronischer Erkrankungen postnatal. Prä- und postnatale Hypotrophie bedingen ein hohes Risiko für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen, von Diabetes mellitus Typ II und Brustkrebs im mittleren Lebensalter (Fall und Osmond 2013; Barker 2012).

Endokrine Disruptoren wie das Biozid Tributylzinn, das antioxidative Kunststoffadditiv Bisphenol A und die als Weichmacher und Lösungsmittel verwendeten Phthalate wirken wie auch weitere Umweltkontaminanten laut verschiedener Studien obesogen auf Tier und Mensch (Newbold et al. 2009a; Newbold et al. 2009b; Philippat et al. 2014; Simmons et al. 2014; Biemann et al. 2014; Biemann et al. 2012; Schmidt et al. 2012). Insbesondere für die Phthalate gilt: Sie sind im Blutplasma des Menschen nachweisbar, plazentagängig und in der Muttermilch vorhanden (Martinez-Arguelles et al. 2013). Diese obesogenen Substanzen stehen unter Verdacht, die Adipogenese während distinkter ontogenetischer Fenster zu beeinflussen.

Der Begriff der Adipogenese umfasst die Fettzeldifferenzierung von der mesenchymalen Stammzelle bis zur reifen Fettzelle (Adipozyt) und wird ausführlich beschrieben in Kapitel 1.2.1.

Die Entstehung von Kompartimenten des weißen Fettgewebes beginnt am Ende der Schwangerschaft (zur Übersicht siehe Cristancho und Lazar 2011). Nach Spalding *et al.* wird die Anzahl an Adipozyten des Menschen während der Kindheit und Adoleszenz determiniert (Spalding et al. 2008). Ferner werden jährlich etwa 10 % aller Adipozyten erneuert, unabhängig vom Alter des Erwachsenen und unabhängig von seiner Konstitution (*BMI*). Der Apoptose-Index und die Teilungsrate von Fettvorläuferzellen (Präadipozyten) sind während der *Early Onset Obesity*, der Adipositas im Jugendalter, unverändert (Spalding et al. 2008). Säuglinge haben einen Körperfettanteil von etwa 15 % (Kuzawa 1998; Janesick und Blumberg 2011). Dieser verdoppelt sich im Kleinkindalter. Im Alter von 8 Jahren bis zum Ende der Pubertät nimmt die Anzahl an Fettzellen nochmals zu. Dies ist die sogenannte hyperplastische Expansion (Spalding et al. 2008).

Adipozyten entstehen aus mesenchymalen Stammzellen. Distinkte Signaltransduktionswege sind erforderlich, damit eine multipotente mesenchymale Stammzelle

dem ontogenetischen Weg der Adipogenese folgt. Wird ein Fetus oder Kleinkind relevanten Konzentrationen von Obesogenen ausgesetzt, könnte dies zu Störungen auf Ebene der Signaltransduktion der Fettzellendifferenzierung führen mit der Folge von hyperproliferativem Fettgewebe in kurzen Zeiträumen. Eine andere Möglichkeit der obesogenen Disruption ist epigenetischer Natur (während vulnerabler Phasen der gewebsspezifischen Entwicklung), könnte die in der *DoHaD*-Hypothese implizierten metabolischen Veränderungen bezogen auf die Morbidität einer einzelnen Person erklären und generationsübergreifende Auswirkungen haben. Tributylzinn, Bisphenole und Phthalate können die Expression von Genen unmittelbar verändern und sie könnten ihr obesogenes Potenzial sogar einige Generationen nach der eigentlichen Exposition entfalten, wenn die Exposition während kritischer Entwicklungsphasen erfolgte.

Eine endokrine Disruption während der Schwangerschaft und Stillzeit kann die Entwicklung von Übergewicht *in utero* und postnatal programmieren (Heindel und Vom Saal 2009; Schmidt et al. 2012). Biemann *et al.* belegten den adipogenen Effekt des Weichmachers Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) auf die adipogene Differenzierung der murinen mesenchymalen Stammzelllinie C3H10T1/2. Eine DEHP-Exposition von [100 µM] während der Induktionsphase der adipogenen Differenzierung steigerte den Triglyzeridgehalt und die Adipozyten-spezifische Genexpression signifikant (Biemann et al. 2012; Biemann et al. 2014).

Schmidt, Schädlich *et al.* deckten einen obesogenen DEHP-Effekt bei der Maus *in vivo* auf. So hatten Fütterungen weiblicher C3H/N-Mäuse mit 3 verschiedenen hohen Konzentrationen an DEHP im frei verfügbaren Futter über 8 Wochen zu einer signifikanten Zunahme von Körpergewicht und viszeraler Fettmasse geführt. In der Studie hatte die Gruppe 1 der Mäuse DEHP in niedriger Dosis erhalten (0,05 mg/kgKG/Tag), was der täglichen Aufnahme der Bevölkerung gemäß Angaben der WHO 2003 entsprach. Gruppe 2 hatte freien Zugang zu Futter versetzt mit DEHP im *No Observed Adverse Effect Level* (5 mg/kgKG/Tag) und Gruppe 3 freien Zugang zu Futter, welches DEHP in hoher Konzentration (500 mg/kgKG/Tag) enthielt. Gruppe 4 hatte Futter ohne Zusatz von DEHP erhalten. Die Genexpression der Adipokine (Fettgewebshormone) Adiponektin und Leptin war durch die DEHP-Zufuhr dysreguliert. So wiesen alle 3 Gruppen DEHP-exponierter Mäuse der F0-Generation nach 8 Wochen eine signifikant verminderte Expression von Adiponektin auf. Leptin war herunterreguliert in Gruppe 1. Ferner wies auch die F1-Generation eine signifikante Zunahme von Körpergewicht und viszeraler Fettmasse auf, verglichen mit der nicht-exponierten Kontrollgruppe 4. Dies ist bemerkenswert vor dem Hintergrund,

dass die Nachkommen dem obesogen wirkenden DEHP ausschließlich diaplazentar, *in utero* und durch die Muttermilch ausgesetzt waren (Schmidt et al. 2012).

Es stellt sich die Frage, ob der von Biemann (Biemann et al. 2012) und Schmidt (Schmidt et al. 2012) erkannte obesogene DEHP-Effekt auf den Menschen übertragbar ist. Vor diesem Hintergrund wurden durch Frau Dr. Kristina Schädlich am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 2013 Studien an Zellen der humanen Präadipozytenlinie Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom (SGBS) begonnen. Diese SGBS-Zellen wurden in einem 14-tägigen Zellkulturansatz zu Adipozyten differenziert und im Zeitfenster der adipogenen Induktionsphase mit dem Weichmacher DEHP in umweltrelevanter Konzentration von 50 µg/ml exponiert. Jenes Zeitfenster der DEHP-Exposition war gewählt worden aufgrund der beschriebenen Erkenntnisse von Biemann *et al.*. Ein Adipogenese-spezifischer *Polymerase Chain Reaction Array* war 2013 durch Frau Dr. Kristina Schädlich durchgeführt worden. Dieser wies eine signifikante Herunterregulation der Gene Adiponektin, Glukosetransporter 4 und Acetyl-CoA-Carboxylase  $\beta$  auf und stellt die Arbeitsgrundlage vorliegender Studie dar.

### 1.1.3 Der Weichmacher DEHP – Umweltschadstoff und endokriner Disruptor

Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) ist einer der weltweit am häufigsten industriell genutzten Weichmacher in Kunststoffprodukten aus Polyvinylchlorid (PVC). In Westeuropa wurden allein im Jahr 2003 zweihundertvierundvierzigtausend Tonnen DEHP zur Herstellung von diversen Plastikartikeln des täglichen Lebens produziert. Weltmarktführer seit der Jahrtausendwende ist nur mehr das Di-iso-nonylphthalat/Di-iso-decylphthalat (DINP/DIDP) mit fünfhundertsiebzigttausend Tonnen Jahresproduktion 2003 (Umweltbundesamt 2005).

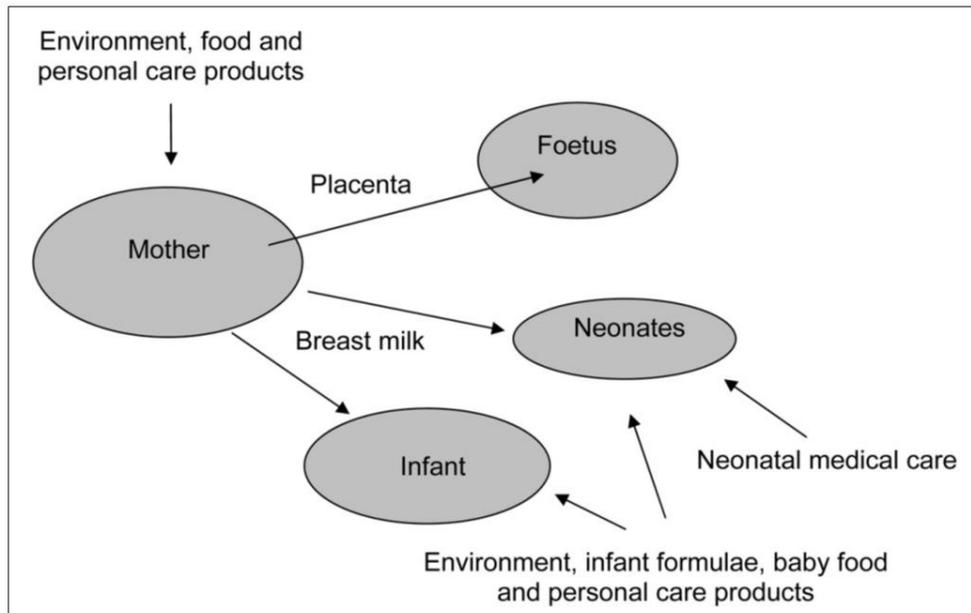
DEHP ist ein hochmolekulares, lipophiles Phthalat. Es wird dem Polymer PVC im Herstellungsprozess zur Erhöhung der Flexibilität zugesetzt. Ein Weich-PVC-Produkt kann bis zu 50 % aus DEHP bestehen. Dabei ist der Weichmacher nicht kovalent gebunden, geht aus und dringt in die umliegenden Medien ein (Umweltbundesamt 2005).

Der Mensch begegnet DEHP enthaltendem PVC jeden Tag in Lebensmittelverpackungen für Käse, Wurst, Süßwaren, in Getränkeflaschen, Kinderspielzeug, Fußbodenbelägen, Zimmerdecken (sogenannten Spanndecken aus Weich-PVC-Folie), Mobiliar und Tapeten. Auch Lacke und Farben, Repellentien und Pestizide, Kosmetika und Parfüms enthalten DEHP. Hierbei wird das Phthalat als Emulgator und Lösemittel gebraucht. Überdies wird der Mensch dem DEHP iatrogen ausgesetzt:

Schlauchsysteme von Dialysegeräten und Beatmungsanlagen werden mit DEHP hergestellt und bis zum heutigen Tage werden in deutschen Krankenhäusern Blutkonservenbeutel aus DEHP-haltigem PVC genutzt (Koch et al. 2005; Inoue et al. 2005). In Babyartikeln, Spielzeug und Kosmetika ist das DEHP seit 2005 EU-weit verboten, in Verpackungen fetthaltiger Lebensmittel seit 2007. Ab 2015 darf das DEHP entsprechend der EU-Verordnung *REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)* nicht mehr zulassungsfrei zur Herstellung von Verbraucherprodukten genutzt werden. In der Umwelt ist es jedoch weit verbreitet und über importierte Lebensmittel wird die Aufnahme auch in Zukunft erfolgen.

Als Beispiel für die DEHP-Exposition in einem deutschen Krankenhaus sei die von Münch *et al.* ermittelte DEHP-Konzentration im Erythrozytenkonzentrat therapeutisch anwendbarer Blutkonservenbeutel aufgeführt. Das Erythrozytenkonzentrat aus 33 Blutkonservenbeuteln enthielt eine durchschnittliche Konzentration von [33,10 µg/ml] DEHP, wobei sich die Konzentration an DEHP direkt proportional zur Lagerungsdauer verhielt (Münch et al. 2011).

Die DEHP-Exposition betrifft zunächst jeden Menschen jeden Alters. Bis zu 90 % des täglich aufgenommenen Weichmachers DEHP entfallen dabei auf eine enterale Ingestion über die Nahrung (Dewalque et al. 2014; Kranich et al. 2014; Heinemeyer et al. 2013; Völkel et al. 2014). Nur zu etwa 10 % nimmt der Mensch DEHP über die Atemwege (DEHP auf Hausstaub in der Luft) und die Haut (DEHP als Kontamination und Trägerflüssigkeit in Körperpflegeprodukten) auf. Doch die Exposition mit Umweltschadstoffen und endokrinen Disruptoren beginnt schon im Mutterleib.



**Abbildung 2: Wege der Exposition mit endokrinen Disruptoren**

Eine Exposition mit endokrinen Disruptoren erfolgt bereits prä- und perinatal: *in utero* diaplazentar über Phthalate im mütterlichen Blut, postnatal nutritiv über Weichmacher in der Muttermilch, iatrogen parenteral und inhalativ über DEHP und andere Giftstoffe durch therapeutische Eingriffe (Frederiksen et al. 2007).

DEHP ist im Nabelschnurblut neugeborener Kinder nachweisbar und eine DEHP-Exposition *in utero* im dritten Trimenon der Schwangerschaft steht unter Verdacht, das Risiko einer Frühgeburt zu erhöhen (Latini et al. 2003a; Latini et al. 2003b; Ferguson et al. 2014).

Auch die Muttermilch ist ein potentieller Weg der Exposition des Säuglings mit endokrinen Disruptoren. So sind Metaboliten des DEHP in der Muttermilch nachweisbar (Frederiksen et al. 2007; Main et al. 2006).

Das DEHP ist eine durch die EU-Verordnung Nr. 143/2011 als fortpflanzungsgefährdend eingestufte Substanz (Europäische Union 2011). Dies betrifft sowohl die Primärverpackung von Arzneimitteln als auch die Herstellung bestimmter Kinderspielzeuge und Babyartikel. Die Reproduktionstoxizität des DEHP ist sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen erwiesen (Gray et al. 2000; Kay et al. 2014) im Hinblick auf die Geschlechtsausbildung, Geschlechtsreife und die Samenqualität beim männlichen Geschlecht. Beim weiblichen Geschlecht ist ein antiandrogener Effekt bei Nagern bekannt. Dieser äußert sich in Form einer verkleinerten Anogenitaldistanz und wird unter dem Begriff des Phthalatsyndroms geführt (Swan 2008; Jarfelt et al. 2005). Dem DEHP wird ferner ein teratogenes und kanzerogenes Potenzial zugeschrieben (zur Übersicht siehe Hauser und Calafat 2005).

Ein obesogener Effekt des DEHP ist durch *in vitro*-Studien an murinen mesenchymalen Stammzellen und im Tierversuch belegt (Biemann et al. 2014; Schmidt et al. 2012; Hao et al. 2012). Es gibt epidemiologische Studien, die eine positive Korrelation zwischen der Konzentration an DEHP-Metaboliten im Urin und einer Erhöhung von *BMI* und Hüftumfang zeigen (Song et al. 2014; Hatch et al. 2008).

Eine aktuelle Studie untersuchte den Staub von Räumlichkeiten deutscher Kindertagesstätten auf seinen Gehalt an Phthalaten. Der Anteil von DEHP unter allen im Staub enthaltenen Phthalaten betrug 70 %. Folgend wurden die Urinkonzentrationen zweier Sekundärmetaboliten des DEHP der Kitakinder gemessen. Die mittlere Konzentration der beiden Sekundärmetaboliten lag bei 16,5 µg/l und 17,9 µg/l Urin. Daraus wurde die tägliche Aufnahme von DEHP der Kinder berechnet. 20 % jener Kitakinder wiesen eine gesundheitsschädigende tägliche DEHP-Aufnahme oberhalb der 95. Perzentile in Höhe von 11,9 µg/kgKG auf (Fromme et al. 2013).

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die DEHP-Exposition eines Organismus zu determinieren. Einerseits kann die DEHP-Plasmakonzentration massenspektrometrisch gemessen werden. Andererseits kann die Urinkonzentration der hydrophilen Metaboliten des DEHP bestimmt und anhand dieser Daten die tägliche DEHP-Aufnahme errechnet werden. Letzteres ist die häufiger genutzte Methode, denn das DEHP liegt nach exogener Aufnahme nicht dauerhaft im Blutplasma vor (Calafat et al. 2013).

DEHP wird im Blutplasma sehr rasch durch omniprärente hydrolytische Enzyme in seine hydrophilen Metaboliten umgewandelt und sodann renal eliminiert. Eine Phase-I-Biotransformation (enzymatische Oxidation der Alkylreste) und eine Phase-II-Biotransformation (Glukuronidierung) sind möglich und erhöhen die renale Eliminierbarkeit. Ein früher Metabolit des DEHP und zugleich einer der quantitativ höchsten im Urin des Menschen gemessenen DEHP-Metaboliten ist das Mono(2-ethylhexyl)phthalat (MEHP). Grundlage vorliegender Studie ist die Annahme, dass lipophiles DEHP im Organismus Zellmembranen *per diffusionem* durchdringt und sodann durch intrazelluläre Hydrolyse in MEHP umgewandelt wird (Koch et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde DEHP im Zellkulturmedium in einer Konzentration von 50 µg/ml verwendet. 2009 veröffentlichten Gillum *et al.* eine Studie, die den Einfluss einer klinisch relevanten Menge an DEHP auf die Physiologie neonataler Kardiomyozyten der Ratte untersuchte. DEHP in einer Konzentration von 1 - 50 µg/ml bewirkte einen konzentrationsabhängigen Abfall der Schlagfrequenz und ein asynchrones Kontrahieren der Kardiomyozyten. Das Konzentrationsfenster entsprach Mengen, wie sie auch im Blutplasma Neugeborener nach *ECMO*-Therapie anzufinden

sind. ECMO bezeichnet die extrakorporale Membranoxygenierung und ist eine Geräte-medizinische Anwendung zur Behandlung ateminsuffizienter Neugeborener auf Intensivstationen (Gillum et al. 2009).

**Tabelle 1: Maximale *iatrogene* DEHP-Exposition Neugeborener**

Medical procedure (neonate)	DEHP ( $\mu\text{g/ml}$ )	Citation
Exchange transfusion	84.9	Sjoberg et al., 1985
	123.1	Plonait, 1993
	26.7	Shintani, 1985
ECMO	34.9	Karle, 1997
	33.5	Shneider et al., 1989
Congenital heart repair	4.7	Barry et al., 1989

Die Tabelle entstammt der Studie von Gillum *et al.* 2009 und enthält veröffentlichte Maximalwerte der DEHP-Exposition im Rahmen medizinisch-therapeutischer Anwendungen für Neugeborene. *Exchange transfusion* = Blutaustauschtransfusion, *ECMO* = extrakorporale Membranoxygenierung, *congenital heart repair* = kongenitale Operation am Herzen. Die Quellenangaben unter *Citation* sind auf (Gillum et al. 2009) zurückzuführen.

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Fragestellung, welchen Einfluss eine DEHP-Exposition von 50  $\mu\text{g/ml}$  während der Induktionsphase der Adipogenese auf die Differenzierung humaner Präadipozyten hat. Die gewählte DEHP-Konzentration soll als vergleichbare, für den Menschen umweltrelevante Menge an DEHP dienen. Bei der Wahl jener Konzentration halfen die Publikationen Gillum *et al.* 2009, Inoue *et al.* 2005, Schmidt *et al.* 2012.

## 1.2 SGBS-Zellkulturmodell der humanen Adipogenese

### 1.2.1 Allgemeine Charakterisierung der humanen Adipogenese

Das weiße und das braune Fettgewebe des Menschen wie auch jenes aller Säugetiere besteht neben Adipozyten (Fettzellen) aus einem heterogenen Netzwerk untereinander kommunizierender Zellen (Bergman und Mittelman 1998). Hierzu gehören unter anderem Adipozytenvorläuferzellen unterschiedlicher Stadien, Fibroblasten, Zellen des Immunsystems und der Blutgefäße. Eine zentrale Funktion des Fettgewebes ist der langfristige Speicher von Energie in Form von Fettvesikeln. Dies impliziert eine kontrollierte Fetteinlagerung und Bereitstellung für energieverbrauchende Stoffwechselfunktionen. Die nachfolgenden Informationen beschreiben ausschließlich das weiße Fettgewebe.

Adipozyten entstehen aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen. Häufig werden zwei Phasen der Adipogenese unterschieden: die Determination der Stammzelle zum unipotenten Präadipozyten und die terminale Differenzierung des Präadipozyten zum reifen Adipozyten (zur Übersicht siehe Rosen und MacDougald 2006). Eine Besonderheit der humanen Adipogenese ist die fehlende mitotische klonale Expansion. Zu 100 % konfluent gewachsene humane Präadipozyten differenzieren terminal, ohne sich nochmals mitotisch zu teilen. Hingegen haben murine Präadipozytenlinien wie die 3T3-L1-Zellen die Fähigkeit zur mitotischen klonalen Expansion (Otto und Lane 2005).

Wachstum und Proliferation des Fettgewebes können beschrieben werden durch die Begriffe der Hyperplasie und der Hypertrophie. Hyperplasie bezeichnet Gewebsproliferation durch die Zunahme der Zellzahl. In hyperplastischem Fettgewebe finden sich viele kleine Adipozyten. Unter Hypertrophie versteht man die Zunahme der Zellgröße. Hypertrophes Fettgewebe enthält weniger Adipozyten als hyperplastisches Fettgewebe. Die Zellen sind größer aufgrund von mehr intrazellulär gespeichertem Fett. 8-10 % aller Adipozyten des Erwachsenen werden im Jahr erneuert (Rigamonti et al. 2011; Spalding et al. 2008).

### 1.2.2 Das SGBS-Zellkulturmodell

Zellen der humanen Präadipozytenlinie Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom (SGBS) sind ausgesprochen geeignet zur Untersuchung molekularer Mechanismen der menschlichen terminalen Adipozyten. Sie dient als gutes Modell der Adipogenese des weißen Fettgewebes des Menschen. Wabitsch *et al.* etablierten 2001 die *in vitro*-Kultivierung der SGBS-Zellen (Wabitsch et al. 2001), welche in vorliegender Arbeit nach dem Protokoll von Frau Dr. Fischer-Posovszky differenziert wurden (Fischer-Posovszky et al. 2008). Das Institut für Anatomie und Zellbiologie in Halle hatte seine SGBS-Zellen aus dem Labor von Herrn Prof. Wabitsch der Universität Ulm in der 28. Generation übernommen.

Das Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom ist auch bekannt unter dem Namen Gigantismus-Dysplasie-Syndrom. Es handelt sich um eine angeborene Erkrankung unklarer Prävalenz mit Punktmutation des X-chromosomalen Gens Glypican3. SGBS-Patienten fallen phänotypisch auf durch einen prä- und postnatalen Hochwuchs, grobe Gesichtszüge, kurze Phalangen, Ventrikel-Septum-Defekte und kardiale Arrhythmien. Das neoplastische Risiko ist erhöht und eine mentale Retardierung möglich. Die Mortalität variiert stark vom frühen Kindstod bis hin zum Versterben in der 50. Dekade aufgrund der variablen Expressivität.

Die SGBS-Zellen sind Präadipozyten entnommen aus dem subkutanen Fettgewebe eines am Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom erkrankten Kindes. Die Zellen unterlagen keiner Transformierung oder Immortalisierung. Im Gegensatz zu humanen Präadipozytenlinien anderen Ursprungs, z.B. perivaskulär, haben SGBS-Zellen ein enormes Proliferationspotenzial mit erhaltener homogener adipogener Differenzierung bis zur 50. Generation. Das 14-tägige Differenzierungsschema (siehe Abbildung 4) ermöglicht die Untersuchung des Einflusses endokriner Disruptoren auf die humane adipogene Differenzierung. Die Induktion der Adipogenese erfolgt mit Rosiglitazon als Aktivator des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin), mit Dexamethason und Cortisol als Aktivatoren des Glukokortikoidrezeptors, Trijodthyronin (T3), welches über *Thyroid Response Elements* (Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren) und spezifische Isoformen des nukleären T3-Rezeptors in die Regulation der Adipogenese eingreift (Obregon 2008; Seifi et al. 2013b), mit Insulin, welches die Glukoseaufnahme der Zellen über den Glukosetransporter 4 (GLUT4) stimuliert, sowie Transferrin, welches die mitochondriale Biogenese stimuliert (Moreno-Navarrete et al. 2014). Mit dem Zeitpunkt der Induktion begann die viertägige Exposition mit Di(2-ethylhexyl)phthalat, DEHP 50  $\mu\text{g/ml}$ . Am Tag 14 der Zellkultur liegen über 90 % der SGBS-Zellen als reife Adipozyten vor. In vorliegender Arbeit wurde speziell der Einfluss einer DEHP-Exposition während der Induktionsphase (Tag 0 bis 4) der adipogenen Differenzierung in dem Zeitfenster von Tag 0 bis 14 auf die molekulare Dysregulation der Adiponektinsignalkaskade untersucht.

### **1.3 Charakterisierung der Adiponektinsignalkaskade**

#### **1.3.1 Adiponektin und seine metabolische Wirkung**

Das subkutane und viszerale Fettgewebe des Menschen produziert und sezerniert ein Potpourri endokriner aktiver Substanzen, sogenannte Adipokine. Eines der am besten untersuchten Adipokine ist das Adiponektin.

Das Gen Adiponektin befindet sich auf Chromosom 3q27. Das globuläre Protein ADIPONEKTIN hat eine Größe von 30 kDa und wird vorrangig von Adipozyten synthetisiert. Seine Plasmakonzentration liegt bei [3 - 30 mg/ml] und korreliert invers mit dem *Body-Mass-Index (BMI)* und Taillenumfang. Das heißt, je mehr Fettgewebe ein Mensch besitzt, umso geringer ist seine Adiponektinplasmakonzentration (Shehzad et al. 2012; Gelsing et al. 2010). Niedrige Adiponektinplasmakonzentrationen gehen einher mit Insulinresistenz, Dyslipidämie und Atherosklerose (Yadav et al. 2013; Schäffler et al. 1999).

Im Plasma zirkulierendes Adiponektin liegt in Multimeren unterschiedlicher Komplexität vor, in Trimeren, Hexameren und hochmolekularen Komplexen, sogenannten *high molecular weight-* (HMW-)Komplexen (Wang et al. 2006). HMW-Adiponektin korreliert negativ mit dem BMI, trimeres Adiponektin hingegen positiv mit einem Diabetes mellitus Typ 2 (Hamilton et al. 2011).

Adiponektin wirkt rezeptorvermittelt über die Adiponektinrezeptoren ADIPOR1, ADIPOR2 und T-Cadherin, wobei auch die Expression des ADIPOR1 negativ mit dem BMI korreliert (Rasmussen et al. 2006). ADIPOR1 und ADIPOR2 sind ubiquitär exprimierte, 7-transmembranäre Rezeptoren (Seifi et al. 2013a; Yamauchi et al. 2007). Murinen Gewebsuntersuchungen zufolge wird ADIPOR1 am meisten in der Skelettmuskulatur exprimiert, ADIPOR2 vorrangig in Hepatozyten (Yamauchi et al. 2003). Adiponektin fördert die T-Cadherin-vermittelte Revaskularisation chronisch-ischämischen kardialen Gewebes bei der Maus (Parker-Duffen et al. 2013).

Die hormonellen Wirkungen des Adiponektin sind mannigfaltig und reichen von der Suppression der hepatischen Glukoneogenese über die Stimulation der pankreatischen Insulinsekretion, Steigerung der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und Stimulation der Glukoseaufnahme in Skelettmuskulatur und Fettgewebe bis hin zur Induktion der Zytokine IL-1 und IL-10 (Gelsinger et al. 2010).

### 1.3.2 Leptin im menschlichen Organismus

Leptin ist ein Adipokin mit größter Bedeutung für die Langzeitregulation der Energiebilanz. Seine Funktionen liegen in der Appetitzügelung, Stimulation der Thermogenese, Steigerung der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, Reduktion des Blutglukosespiegels, des Körpergewichts und des Körperfettgehaltes (Yadav et al. 2013). Ferner gilt eine Leptinresistenz als primärer Risikofaktor in der Pathogenese der Adipositas (Morris et al. 2010).

Das Protein LEPTIN hat eine Größe von 16 kDa. Sein Gen befindet sich auf Chromosom 7q32. Adipozyten sezernieren Leptin. Die Plasmakonzentration von Leptin verhält sich direkt proportional zum Körperfettgehalt des Organismus. Leptin wirkt appetitzügelnd über die Leptinrezeptoren im *Nucleus arcuatus* und *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus. Die eine Energiezufuhr stimulierenden Neurotransmitter *Agouti-related Protein* und Neuropeptid Y werden durch Leptin gehemmt. POMC/CART-Neurone (*pro-opiomelanocortin/ cocaine- and amphetamine-regulated transcript*), welche die Energiezufuhr hemmen, werden durch Leptin stimuliert. Mit Adipositas einher geht eine Leptinresistenz. Übergewichtige Menschen

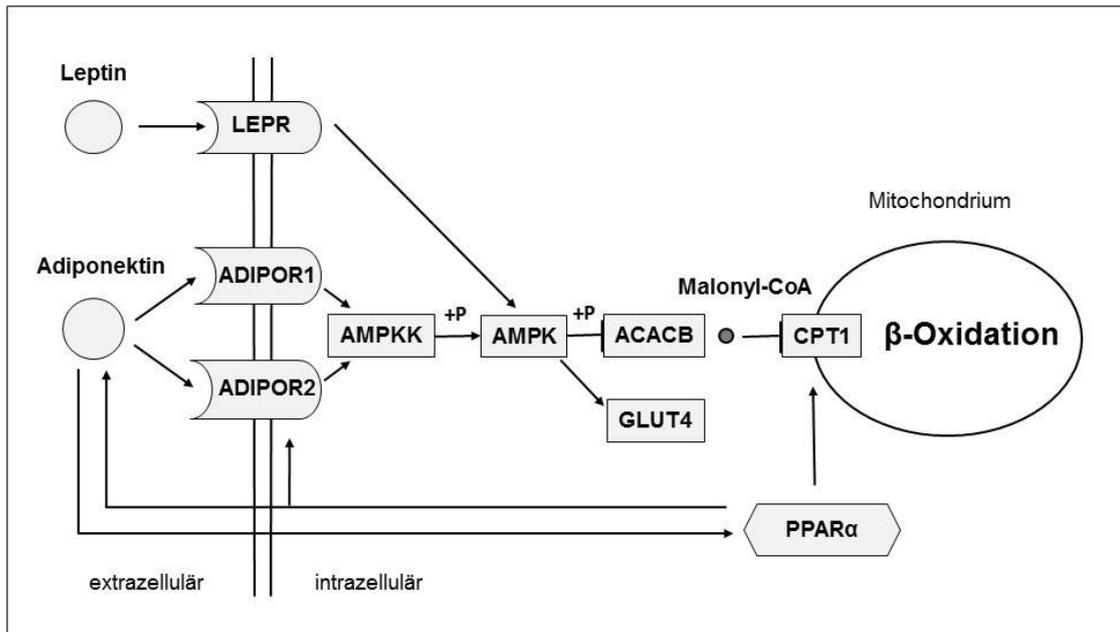
weisen zwar hohe Leptinplasmakonzentrationen auf, die physiologische Wirkung auf seine Zielneurone ist jedoch gestört (zur Übersicht siehe Jéquier 2002).

Der Leptinrezeptor ist ein Tyrosinkinase-assoziiertes Rezeptor der Zytokinrezeptorfamilie Typ I. Durch alternatives Spleißen können 6 Isoformen exprimiert werden (Ceddia 2005). Diese kommen unter anderem im Zentralnervensystem, Immunsystem und in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas vor (Villanueva und Myers 2008).

Das subkutane Fettgewebe ist eines der Zielgewebe von zirkulierendem Leptin (Dua et al. 1996). Die Wirkung von Leptin ist gekoppelt an den JAK-STAT-Mechanismus. Das Binden von Leptin an seinen Leptinrezeptor autophosphoryliert die Januskinase 2. Die aktive JAK2 phosphoryliert Tyrosinreste des zytoplasmatischen Anteils des Leptinrezeptors. Nun können *Signal Transducers and Activators of Transcription*, die STAT-Transkriptionsfaktoren, binden und dimerisieren. Als Dimere gelangen sie in den Zellkern und regulieren durch spezifisches Binden an *Responsive Elements* in der DNA eine Vielfalt von Genen. Tezapsidis et al. zeigten 2009, dass Leptin über den JAK-STAT-Mechanismus auf die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) wirkt (Tezapsidis et al. 2009). Leptin aktiviert so die AMPK und greift in die Regulation der Adiponektinsignalkaskade ein (Minokoshi et al. 2002). Nach Minokoshi et al. stimuliert Leptin über Phosphorylierung der AMPK die  $\beta$ -Oxidation im murinen Skelettmuskel. Die hypothalamische Phosphorylierung der AMPK wird durch Leptin gehemmt (Minokoshi et al. 2004). Wang et al. berichten von einer autokrinen Aktivierung der AMPK durch Leptin im Fettgewebe und von einer Leptin-induzierten Blockierung dieser Reaktion bei Adipositas (Wang et al. 2005a).

### **1.3.3 Die Adiponektinsignalkaskade**

Was ist die Adiponektinsignalkaskade und wie stehen ihre Substrate, Regulatoren und Enzyme miteinander in Verbindung?



**Abbildung 3: Adiponektinsignalkaskade**

Dargestellt ist die Interaktion der Adipokine Adiponektin und Leptin. Die Signalkaskade resultiert in einer Förderung der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren in Mitochondrien von Adipozyten. Adiponektinrezeptoren 1 und 2 (ADIPOR1 und ADIPOR2), Leptinrezeptor (LEPR), Adenosinmonophosphatkinasekinase (AMPKK), Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK), Acetyl-CoA-Carboxylase  $\beta$  (ACACB), Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1), Glukosetransporter 4 (GLUT4), Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), Phosphorylierung (+P).

Adiponektin beeinflusst die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren insbesondere in Adipozyten, Myozyten und Hepatozyten durch Binden an seine membranständigen Rezeptoren ADIPOR1 und ADIPOR2. Das Binden von Adiponektin aktiviert die intrazelluläre zytosolische Adenosinmonophosphatkinasekinase (AMPKK), welche durch Phosphorylierung die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) aktiviert (Liu et al. 2010). Die phosphoryliert aktive AMPK hemmt die für die Lipogenese (Synthese von Fettsäuren) verantwortliche Acetyl-CoA-Carboxylase  $\beta$  (ACACB) (Yadav et al. 2013). Die Phosphorylierung von AMPK-Effektoren hat den Zweck, Zellen vor Energiemangel in Form von zu wenig Adenosintriphosphat (ATP) zu schützen (Hardie et al. 2012). Die aktive AMPK phosphoryliert und inhibiert die ACACB, das Schrittmacherenzym der Lipogenese. Es gibt mehrere Isoformen der ACACB. Das weiße Fettgewebe des Menschen exprimiert vor allem die ACACB2 (Castle et al. 2009), weshalb diese in vorliegender Dissertation untersucht wurde. Die ACACB katalysiert die Methylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, dem Substrat der Lipogenese. Wird die ACACB gehemmt, liegt weniger Malonyl-CoA zytosolisch vor. Malonyl-CoA ist in der Lage, die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1) zu hemmen. In

Abwesenheit von Malonyl-CoA katalysiert die CPT1 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der  $\beta$ -Oxidation ungebremst. CPT1 ist Teil des Acyl-Carnitin-Shuttles aktivierter Fettsäuren und transportiert Acyl-CoA durch die äußere mitochondriale Membran. Schlussendlich fördert eine Stimulation der Adiponektinsignalkaskade die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren.

Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor PPAR $\alpha$  ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der die Expression von Enzymen der  $\beta$ -Oxidation fördert. Choi *et al.* zeigten 2005, dass der PPAR $\alpha$ -Agonist Fenofibrat die Genexpression von Adiponektin hemmt (Choi *et al.* 2005). Mit anderen Worten: Adiponektin wird durch PPAR $\alpha$ -Aktivierung herunterreguliert. Hingegen zeigten Yamauchi *et al.* 2001 eine Aktivierung von PPAR $\alpha$  und seinen Zielgenen wie der ACACB durch Adiponektin (Yamauchi *et al.* 2001). An Nagetieren konnte gezeigt werden, dass MEHP, der hydrophile Metabolit des DEHP, die Expression von PPAR $\alpha$  induziert (Hurst und Waxman 2003).

Leptin hemmt die ACACB über PPAR $\alpha$  und die myogenen Faktoren Myf3, Myf4 und Myf6 unabhängig von der AMPK (Atkinson *et al.* 2002; Lee *et al.* 2001) und stimuliert so die  $\beta$ -Oxidation.

Adiponektin steigert die Genexpression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) und fördert seinen Transport zur Zellmembran (insulinotroper Effekt des Adiponektin) (Fu *et al.* 2005). Eine Aktivierung der AMPK fördert die Translokation von GLUT4 in die Zellmembran von 3T3-L1-Prädipozyten und erhöht somit die basale insulinunabhängige Glukoseaufnahme (Yamaguchi *et al.* 2005).

## 2 Zielstellung der Arbeit

Zielstellung der vorliegenden Arbeit ist die Beantwortung der Frage, welchen Einfluss der Weichmacher Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) auf die Adipogenese humaner Präadipozyten hat.

In der *in vitro*-Studie wurde die humane Präadipozytenzelllinie der Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom-Zellen (SGBS-Zellen) verwendet, welche über ein enormes Potenzial der homogenen Differenzierung zu reifen Adipozyten bis zur 50. Generation verfügen.

Der Studie zugrunde liegt die Arbeitshypothese, dass eine DEHP-Exposition in umweltrelevanter Konzentration während der Induktionsphase der Adipogenese humaner Präadipozyten einen langfristigen obesogenen Effekt verursacht. Hintergrund war die Erkenntnis von Biemann *et al.*, dass das DEHP die Adipogenese mesenchymaler Stammzellen im ontogenetischen Fenster der Induktion stimulierte und die Expression von Adiponektin steigerte (Biemann *et al.* 2014; Biemann *et al.* 2012).

Die SGBS-Zellen wurden in einem 14-tägigen Zellkulturansatz zu Adipozyten differenziert. Der Weichmacher DEHP wurde in umweltrelevanter Konzentration von 50 µg/ml während der Induktionsphase der Adipogenese von Tag 0 bis 4 verwandt.

Kernfragen sind folgende:

- Wird DEHP in der Zellkultur in MEHP umgewandelt und liegt MEHP intrazellulär vor?
- Hat die DEHP-Exposition direkte und/oder langfristige obesogene und die Adiponektinsignalkaskade dysregulierende Effekte?
- Kann das DEHP eine Hyperplasie oder Hypertrophie bewirken?

Zunächst wurde der MEHP-Gehalt von SGBS-Mediumüberstand und -Zellysat in Kooperation mit Herrn Dr. Holger Koch (Zentrum für Toxikologie der Ruhr-Universität Bochum) quantifiziert. Des Weiteren wurden die Marker der Adiponektinsignalkaskade auf Gen- und Proteinexpressionsebene untersucht, um direkte und langfristige obesogene Effekte der DEHP-Exposition zu analysieren. Außerdem wurde die Differenzierungseffizienz von DEHP-exponierten SGBS-Zellen in Kooperation mit Herrn Dr. Alexander Navarrete Santos (Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Halle/Saale) durchflusszytometrisch bestimmt. Abschließend erfolgten Immunfluoreszenzanalysen zur Lokalisation von GLUT4 und dem Fettvesikelhüllprotein Perilipin zur Klärung der Hyperplasie- oder Hypertrophiefrage.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Zelllinie und Zellkultur

Als *in vitro*-Zellkulturmodell dieser Studie diente die humane Präadipozytenlinie SGBS (Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom).

##### 3.1.1 SGBS-Zellkultur

Die Zellkulturmedien und -lösungen wurden unter der Sterilbank hergestellt, vor Gebrauch steril-filtriert oder im Autoklaven dampfsterilisiert. Alle Medien und Lösungen mit ihren Inhaltsstoffen und Konzentrationen sind nachfolgend aufgeführt.

**Tabelle 2: Zusammensetzungen der Zellkulturmedien**

<u>Basalmedium</u>		<u>Induktionsmedium</u>	
DMEM/F12	siehe 2.1.2	Basalmedium	
Biotin	3,3 mM	Transferrin	0,01 mg/ml
Panhotenat	1,7 mM	Insulin	20 nM
Penicillin	10.000 U/ml	Cortisol	100 nM
Streptomycin	10.000 µg/ml	T3	0,2 nM
		Dexamethason	25 nM
		IBMX	250 µM
<u>Kulturmedium</u>		Rosiglitazon	2 µM
Basalmedium			
FKS	10 %		
		<u>Differenzierungsmedium</u>	
<u>Einfriermedium</u>		Basalmedium	
Basalmedium		Transferrin	0,01 mg/ml
FKS	10 %	Insulin	20 nM
Glycerin	≥ 99 %	Cortisol	100 nM
		T3	0,2 nM

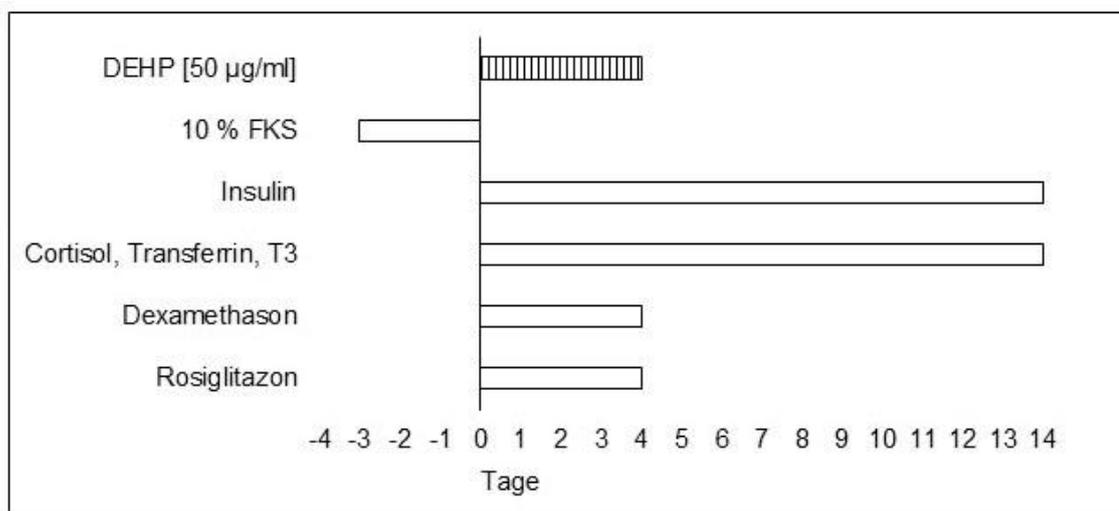
##### 3.1.2 Kultivierung und Differenzierung der SGBS-Zellen

Die SGBS-Zelllinie wurde aus dem Labor von Herrn Prof. Wabitsch (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Ulm) in der 28. Generation übernommen und im Institut für Anatomie und Zellbiologie nach dem Protokoll von Frau Dr. Fischer-Posovszky (Fischer-Posovszky et al. 2008) kultiviert und zu reifen Adipozyten differenziert. Das Kulturmedium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) beinhaltet den Nährstoffmix

F12 bestehend aus L-Glutamin, HEPES-Puffer, dem Indikatorstoff Phenolrot, Biotin, Panthotenat, Penicillin und Streptomycin und wurde mit 10 % fetalem Kälberserum supplementiert. Die Zellen wurden adhären auf Greiner-Zellkulturflaschen (*Bioscience*, 75 cm<sup>2</sup>, 250 ml) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten.

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert, um sie mit einer Dichte von 1x10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> auf Zellkulturflaschen oder 12-Well-Platten (TPP) aufzuteilen. Hierzu wurde einmal mit der phosphatgepufferten NaCl-Lösung PBS gewaschen, Trypsin/EDTA (Biochrome, L2143) für 3 Minuten bei 37 °C zugegeben, die Zellen in Kulturmedium aufgenommen, gezählt, ausgesät und kultiviert. Lag die Konfluenz wiederum bei 70-80 %, wurden die 12-Well-Platten dreimal mit PBS gewaschen und das Induktionsmedium des Tages 0 hinzugegeben. Mit dem Zeitpunkt der Induktion begann die viertägige Exposition mit Di(2-ethylhexyl)phthalat, DEHP [50 µg/ml].

Nach 4 Tagen der Differenzierung wurde das alte Medium abgenommen und ohne weitere DEHP-Exposition durch Differenzierungsmedium ersetzt. Weitere Mediumwechsel erfolgten weiter an den Tagen 8 und 10. An Tag 14 wurde der jeweilige Versuch beendet.



**Abbildung 4: SGBS-Zellkulturmodell**

Die Kultivierung der SGBS-Zellen erfolgte bis zum Tag 0 mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS). Die Induktion der adipogenen Differenzierung über 4 Tage geschah mit den Zusätzen Insulin, Cortisol, Transferrin, Trijodthyronin (T3), Dexamethason und Rosiglitazon (siehe Text). Die Differenzierung wurde fortgesetzt bis zum Tag 14 ohne Dexamethason und Rosiglitazon. Die Exposition mit Di(2-ethylhexyl)phthalat, DEHP [50 µg/ml], erfolgte von Tag 0 bis 4.

Probenahmen erfolgten an den Tagen 0, 4, 8 und 14. Als Lösungsmittelkontrollen dienten SGBS-Zellen, deren Induktionsmedium anstelle von DEHP nur die äquivalente Menge des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO 0,1 %) enthielt. Das in einer Konzentration von 50 µg/ml im Induktionsmedium enthaltene DEHP war stets in DMSO gelöst.

	Proliferation				Induktion				Differenzierung											
Tage	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Probenahme					↑				↑				↑							↑
						DEHP [50 µg/ml]														

**Abbildung 5: Zellkultur und Probenahme**

Das Schema zeigt Proliferations-, Induktions- und Differenzierungsphase der SGBS-Zellen in Kultur sowie das Expositionsfenster von DEHP [50 µg/ml] im Induktionsmedium. Die Pfeile weisen auf die Tage der Probenahmen.

### 3.1.3 Behandlung der Zellen mit DEHP und DMSO

Die SGBS-Zellen wurden ab 70-80 % Konfluenz über 4 Tage mit DEHP [50 µg/ml] behandelt, das heißt in 1 ml Induktionsmedium befanden sich 50 µg DEHP. Für eine 1000-fache Stammlösung [50 mg/ml] wurde DEHP (Sigma Aldrich, Deutschland) in Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma Aldrich, Deutschland) gelöst.

Das Lösungsmittel DMSO hat zytotoxische Eigenschaften. Um sicherzustellen, dass Signifikanzen auf Genexpressionsebene auf DEHP und nicht auf DMSO zurückzuführen sind, wurde das Differenzierungsmedium der kontrollbehandelten Zellen mit 0,1 % DMSO versetzt, dem Äquivalent zum DMSO im DEHP-Zusatz.

### 3.1.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die SGBS-Präadipozyten wurden aus einer exponentiell wachsenden Population eingefroren. Hierzu wurden sie mit PBS gewaschen und trypsiniert (siehe 2.1.2) und in 4 ml Zellkulturmedium suspendiert. Im Medium enthaltenes FKS 10 % inhibiert die Aktivität von Trypsin/EDTA. Es erfolgte ein 5-minütiges Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 800 rpm sowie anschließendes Resuspendieren in 1 ml Einfriermedium. In 2 ml-Kryoröhrchen konnte die Zellsuspension in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox über 24 Stunden langsam auf – 80 °C heruntergekühlt werden, um sie dann in flüssigem Stickstoff zu lagern.

Im Gegensatz zum langsamen Einfrieren erfolgte das Auftauen rasch. Die Zellen wurden in 37 °C-warmem Wasser kontrolliert aufgetaut, im unmittelbaren Anschluss mit 10 ml FKS-haltigem Basalmedium gemischt und 5 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 4 ml FKS-haltigem Basalmedium resuspendiert und in Greiner-Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche ausgesät, welche bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden. Nach etwa 2 Tagen und maximal 80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert.

### 3.1.5 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden alle 3-4 Tage je nach Dichte 1:4, 1:5 oder 1:6 passagiert. Zur Passage wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, um sie anschließend zu trypsinieren. Nach dem Zentrifugationsschritt erfolgte das Resuspendieren des Zellpellets in 4, 5 oder 6 ml FKS-haltigem Basalmedium. Je 1 ml der neuen Zellsuspension wurde auf 4, 5 oder 6 Greiner-Zellkulturflaschen gegeben, welche je 10 ml FKS-haltiges Basalmedium enthielten.

Für den Versuchseinsatz war eine definierte Zellzahl von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> erforderlich, sodass die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die entsprechenden Zellzahlen weiter verwendet wurden.

## 3.2 Genexpressionsanalyse-vorbereitende Schritte

Die Genexpression von DEHP-exponierten SGBS-Zellen sowie nicht exponierten Kontrollgruppen wurde mittels quantitativer *Real-Time-PCR* analysiert.

### 3.2.1 Isolation von RNA aus SGBS-Proben

Die Aufbereitung der RNA-Proben aller SGBS-Versuche erfolgte mit dem *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit 50* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll. Das lysierende Reagenz bei dieser Isolationsmethode ist QIAzol, ein Phenol/Guanidin-Gemisch. Es wurde 1 µl RNA mit 3 µl RNA-Ladepuffer gemischt und auf ein 1 % Agarose-Gel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer und der Gel-Kamm wurden zuvor für 30 Minuten mit 0,3 % Wasserstoffperoxid inkubiert, um RNAsen zu inaktivieren. Zum Nachweis der RNA wurden die RNA-Banden nach erfolgter Gelelektrophorese unter ultraviolettem Licht mit dem Programm *Gen5* am *SynergyMx* (BioTek) sichtbar gemacht. Im Anschluss wurden 2 µl der RNA direkt in die Messeinrichtung des *NanoVue*-Spektrometers (*GE Healthcare*) pipettiert und die Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Als Leerwert diente RNase-freies Wasser, sogenanntes Diethylpyrocarbonatwasser (DEPC-Wasser). Der Absorptionsquotient aus den Messwerten bei 260 nm und 280 nm gab Aufschluss über den Reinheitsgrad der

isolierten *RNA*. Ein Quotient von etwa 1,8 bedeutet „reine *DNA*“, ein Quotient von 2,0 „reine *RNA*“. Lag der Quotient unter 1,8, so enthielt die Probe Verunreinigungen (Protein, Phenol, andere Kontamination).

### 3.2.2 Proteinisolation und Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinproben wurden folgendermaßen gewonnen. Die Zellproben eines jeden Versuchstages wurden in je 400 µl RIPA-Puffer versetzt mit Phosphatase- und Proteaseinhibitor (je 2 µl / 100 µl) aufgenommen. Der RIPA-Puffer wurde aus 10 ml 10-fach-PBS, 1 ml Nonidet (NP40), 100 µl 10 % SDS und 0,5 g Natriumdeoxycholat hergestellt und anschließend mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert. Das Zelllysate wurde durch dreimaliges Aufziehen durch eine Omnifixspritze (Omnifix 40 Duo U-40 Insulin, BRAUN) homogenisiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 20 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der proteinhaltende Überstand abgenommen und bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem *Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) nach Herstelleranleitungen ermittelt.

### 3.2.3 Reverse Transkription zur *cDNA*-Synthese

Zum Herstellen von *cDNA* wurde die aus den Proben isolierte Gesamt-*RNA* verwendet. Zu je 1 µg *RNA* wurde 1 µl *Random-Hexamer-Primer* (*Primer Random pd(N)<sub>6</sub>*) gegeben und mit RNase-freiem Wasser auf 12,5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 65 °C im *Thermocycler* inkubiert und währenddessen folgender, *RevertAid<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific) enthaltender Reaktionsmix auf Eis pipettiert:

**Tabelle 3: Pipettieransatz zur reversen Transkription**

5-fach-Reaktionspuffer	4 µl
10 mM dNTP-Mix	2 µl
<i>RNAse</i> -Inhibitor	0,5 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl

Nun wurden je 7,5 µl des Master-Mixes zum 12,5 µl Ansatz gegeben und wie folgt inkubiert: *Annealing* für 10 min bei 25 °C, reverse Transkription für 60 min bei 42 °C und Inaktivierung der reversen Transkriptase für 10 min bei 70 °C. Nach abgeschlossener *cDNA*-Synthese wurde diese mit 70 µl *Aqua dest.* aufgefüllt, um sie im Anschluss für diverse *PCR*-Anwendungen nutzen zu können. Um zu kontrollieren,

ob die cDNA-Synthese erfolgreich verlief, wurde eine Test-PCR mit 18S-Primern durchgeführt.

### 3.3 Primer-Etablierung

Um die Sequenzen der Gene von Interesse zu erhalten, wurde die NCBI-Datenbank *Nucleotide* (NCBI Nucleotide 2014) genutzt. Mithilfe dieser Datenbank wurden die sequenzspezifischen *Primer* erstellt und in der NCBI-Datenbank *Blast* (NCBI Blast 2014) auf ihre Spezifität getestet. Die *Primer*-Längen umfassten 150 - 250 bp, sodass sie für Standard-PCR und qRT-PCR genutzt werden konnten.

Die bestellten *Primerstocks* [100 µM] wurden 1:10 mit Reinstwasser verdünnt, um sie für die Polymerase-Kettenreaktion zu verwenden. Zur PCR wurde nachfolgender Reaktionsmix auf Eis pipettiert und die Polymerase-Kettenreaktion im *Thermocycler* nach folgendem Schema durchgeführt: Inkubation für 5 min bei 95 °C, Denaturieren für 45 s bei 95 °C, *Annealing* für 45 s bei 60 °C, Elongation für 45 s bei 72 °C, ebenso weitere 39 Zyklen, Inkubation für 10 min bei 72 °C und anschließendes Kühlen bei 4 °C.

**Tabelle 4: PCR-Ansatz je Probe**

5fach-Reaktionspuffer	5 µl
10 mM dNTP-Mix	0,5 µl
Autoklaviertes Wasser	17,4 µl
<i>Crimson-Taq-DNA-Polymerase</i>	0,125 µl
10 µM <i>Forward-Primer</i>	0,5 µl
10 µM <i>Reverse-Primer</i>	0,5 µl
cDNA	1 µl

Zur Gelelektrophorese wurden je 15 µl der PCR-Produkte und 3 µl Ladepuffer auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen aus 1,5 g Agarose, 100 ml 1fach-TAE-Puffer und 1 µl Ethidiumbromid [10 mg/ml]. TAE steht für Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure. 10fach-TAE-Puffer wurde hergestellt aus 0,4 M Trisbase (SERVA) und 0,01 M Na<sub>4</sub>EDTA (ROTH).

Die PCR-Produktgrößen wurden anhand des Größenmarkers (*Thermo Fisher Scientific* SM0383 von 80 – 1031 bp) ermittelt, die Fragmente von Interesse unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (*Qiagen*) extrahiert. Um die Produkte zu verifizieren, wurden die Nukleotidsequenzen durch Frau Dr.

Dorothea Darmer im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Universitätsklinik Halle/Saale analysiert.

### 3.4 Herstellung von Plasmidstandards für die *qRT-PCR*

Aus den etablierten *Primern* wurden wie folgt Plasmidstandards hergestellt, um sie für die quantitative *Real-Time-PCR* zu nutzen.

#### 3.4.1 Ligation

Die extrahierten *PCR*-Produkte aus 2.3 wurden an Poly-T-Überhänge des linearisierten Vektor *pGEM-T* (Promega) ligiert, um sie anschließend in *E. coli XL1-Blue* zu transformieren. Die *Crimson-Taq-DNA*-Polymerase hatte einen Poly-A-Überhang ans *PCR*-Produkt synthetisiert. Zur Ligation lagerte sich das *PCR*-Produkt über freies Adenin an freies Thymin der 5'-Enden des Vektors. Der Ligationsansatz konnte über Nacht bei 4 °C oder für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden.

**Tabelle 5: 20 µl Ligationsansatz je Probe**

<i>2x Rapid Ligation Buffer</i>	10 µl
Vektor <i>pGEM-T</i>	1 µl
<i>PCR</i> -Produkt	8 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl

#### 3.4.2 Transformation der Plasmide/Vektoren in kompetente *E.coli XL1-Blue* und Blau-Weiß-Selektion positiver Klone

Der Ligationsansatz wurde in je 100 µl kompetente *E.coli* gegeben und nach behutsamem Mischen für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 42 °C für 45 s, 2-minütiges Abkühlen auf Eis, die Zugabe von 0,3 ml *Lurea-Bertani-Broth-/LB*-Medium (1 l wurde hergestellt aus 12 g Pepton (ROTH), 5 g Hefeextrakt (AppliChem), 5 g Natriumchlorid (ROTH), 1 g Glucose (SERVA)) und 1 Stunde schüttelndes Inkubieren bei 37 °C.

50 - 150 µl der Kultur wurden auf LB-Agar-Platten mit den Zusätzen 100 µg/ml Ampicillin, 80 µg/ml IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) und 50 mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) ausplattiert. Die LB-Agar-Platten wurden wie folgt hergestellt:

**Tabelle 6: *Lurea-Bertani-Broth-Agar***

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
Glukose	1 g
Agar	12 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 l

Die aufgeführten Agar-Bestandteile wurden miteinander vermischt und autoklaviert. Nach mäßigem Abkühlen wurden Ampicillin, IPTG und X-Gal hinzugegeben und je 20 ml in Petrischalen gefüllt. Nach Erkalten der Agarplatten konnten diese bei 4 °C gelagert werden.

Nach Inkubation der beimpften Platten bei 37 °C über Nacht konnten die gewachsenen, weißen Kolonien in LB-Flüssigmedium gepickt werden.

### 3.4.3 Flüssigkulturansatz und Plasmidpräparation

Zur Plasmidisolation wurden die gepickten Klone in je 4 ml LB-Flüssigkultur, versetzt mit je 4 µl Ampicillin, bei 37 °C über Nacht im Schüttler herangezogen. Die Plasmidisolation erfolgte am Folgetag mit dem *peqGoldPlasmid Miniprep Kit I (Peqlab)*. Die Isolation der Plasmide erfolgte nach Herstellerangaben.

### 3.4.4 Restriktion der Plasmide

Die aufgereinigten Plasmide wurden abschließend in einer Doppelrestriktion mit den Enzymen Apal und SacI geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Größe und Lage der Banden gaben Aufschluss darüber, ob die Klonierung erfolgreich war.

**Tabelle 7: Restriktionsansatz**

<i>Aqua destillata</i>	5,5 µl
Puffer B	1 µl
Apal	0,5 µl
SacI	0,5 µl
Plasmid	2,5 µl

### 3.4.5 Primer für die qRT-PCR

Die DNA-Sequenzen, Produktgrößen und optimalen *Annealing*-Temperaturen der neu synthetisierten, etablierten *Primer* sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8: Primer für die qRT-PCR**

<b>Primer</b>	<b>Richtung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Größe</b>	<b>Temperatur</b>
<i>TBP</i>	<i>forward</i>	TGTGCTCACCCACCAACAAT	199 bp	60,0 °C
	<i>reverse</i>	AGTCGTCTTCCTGAATCCCT		60,0 °C
<i>ADIPOQ</i>	<i>forward</i>	TTCTGCCTTCCGCAGTGTAG	127 bp	58,0 °C
	<i>reverse</i>	TAGCCAGATGGTGTGGCTTG		58,0 °C
<i>AMPK</i>	<i>forward</i>	ATAAGCACGAGCCTGAACGG	226 bp	60,0 °C
	<i>reverse</i>	TCTTCTACTGCTTCGTCCTCG		60,0 °C
<i>ACACB</i>	<i>forward</i>	ACAGTCCTGAGATCCCCCTC	238 bp	58,0 °C
	<i>reverse</i>	GTTCAGCCGGGTGGACTTTA		58,0 °C
<i>ADIPOR1</i>	<i>forward</i>	TGCGGCGGGGAGTTTAGAAG	245 bp	63,2 °C
	<i>reverse</i>	CGTGTCAGCTTCCCTGTTACT		63,2 °C
<i>ADIPOR2</i>	<i>forward</i>	GAGACACGCGGATCAACTCA	175 bp	60,0 °C
	<i>reverse</i>	GTTGGTGCCCTTTTCTGAGC		60,0 °C
<i>CPT1</i>	<i>forward</i>	CAATGGGCCAGGGCTTTGAC	169 bp	62,8 °C
	<i>reverse</i>	GCAAAGCCCCAAGGTTAC		62,8 °C
<i>GLUT4</i>	<i>forward</i>	ACTGGCCATTGTTATCGGCA	213 bp	59,1 °C
	<i>reverse</i>	GTCAGGCGCTTCAGACTCTT		59,1 °C
<i>LEPR</i>	<i>forward</i>	ACACCAGAGTGATGCAGTTT	187 bp	62,0 °C
	<i>reverse</i>	ATGCTCAAACGTTTCTGGCTTC		62,0 °C
<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	<i>forward</i>	GGACAAGGCTCAGGCTATC	181 bp	62,0 °C
	<i>reverse</i>	CATCCCACAGAAAGGCACT		62,0 °C

### 3.5 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

Die quantitative *Real-Time-PCR* als Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ermöglicht die Quantifizierung der gewonnenen DNA anhand von Fluoreszenzmessungen.

Das Kit *Takyon SYBR Master Mix dTTP Blue with Fluorescein* (Eurogentech) verwendet *SYBR<sup>®</sup>-Green*, welches mit Doppelstrang-DNA interkaliert und fluoresziert. Die Zunahme der Fluoreszenz entspricht direkt proportional der Menge an Ziel-DNA.

Es wurden je 3  $\mu\text{l}$  *cDNA* mit 17  $\mu\text{l}$  Mastermix (siehe unten) in Doppelbestimmung sowie eine *No-Template-Control (NTC)* pipettiert und die *qRT-PCR* im *BioRAD MyiQ5 Cycler* nach dem Schema der

Tabelle 10 gestartet. Dabei entspricht die mit \* gekennzeichnete Temperatur der optimalen *Annealing*-Temperatur des jeweiligen *Primer*-Paares. Schritt 4 diente der Erstellung einer Schmelzkurve, um auszuschließen, dass mehr als ein *PCR*-Produkt amplifiziert wurde. Es erfolgte eine schrittweise Temperaturerhöhung um 0,5 °C.

Die Fluoreszenzmessung fand am Ende jeder Elongation während der 40 Zyklen statt. Während der exponentiellen Phase der Amplifikation herrschten optimale Reaktionsbedingungen. Nur hier kann die synthetisierte *cDNA* korrekt quantifiziert werden. Zur Berechnung der absoluten Molekülzahl wurde für jedes Plasmid eine Standardgerade mit 4 Verdünnungen ( $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  Moleküle) erstellt. Diese diente der Software *Bio-Rad iQ5* zur Berechnung der Molekülzahl der gemessenen *cDNA*. Es wurde je ein Probenlauf mit dem *housekeeping*-Gen *TBP* durchgeführt und die Molekülzahl der verschiedenen Gene mit der Anzahl der *TBP* Moleküle verrechnet.

**Tabelle 9: Mastermix für die *qRT-PCR***

<i>Takyon SYBR Mix</i>	10 $\mu\text{l}$
<i>Forward-Primer</i>	2 $\mu\text{l}$
<i>Reverse-Primer</i>	2 $\mu\text{l}$
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	3 $\mu\text{l}$

**Tabelle 10: Thermoprotokoll der *qRT-PCR***

Temperatur	Dauer	Zyklus	Schritt
95 °C	5 min	1	1
95 °C	20 s	2 (40x)	1
*	30 s	2 (40x)	2
72 °C	40 s	2 (40x)	3
95 °C	1 min	3	4
60 °C	1 min	4	4
55 °C	10 s	5	4 (81x)

### 3.6 FACS-Analyse von SGBS-Zellen

In Kooperation mit Herrn Dr. Alexander Navarrete Santos aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Andreas Simm aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Halle/Saale wurde das Differenzierungspotenzial von SGBS-Zellen mit der Methode des *Fluorescence-Activated Cell Sorting*, FACS, nach Schaedlich *et al.* untersucht (Schaedlich *et al.* 2010).

Hierzu wurden SGBS-Zellen am Tag 8 sortiert und gezählt, welche nach dem Differenzierungsprotokoll (siehe Kapitel 2.1.2) kultiviert worden waren. Gefärbt wurde mit *Nile Red*, einem lipophilen, fluoreszierenden Vitalfarbstoff. Die *Nile Red*-Stammlösung [100 µg/ml gelöst in DMSO] wurde 1:1000 verdünnt im Kulturmedium angewandt, um die SGBS-Zellen anzufärben.

Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit jeweils 150 µl *CDS* (*Cell Dissociation Solution*, SIGMA) behandelt, 5 Minuten bei 37 °C inkubiert, durch Klopfen vom Boden des *Wells* gelöst und mit je 1 ml PBS plus 10 % FKS abgestoppt. Vor der Messung mit dem *BECTON DICKINSON FACScalibur* wurden die Proben durch ein Zellsieb mit 70 nm Porengröße filtriert.

### 3.7 Proteinnachweis mittels *Western-Blot*

#### 3.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Unter SDS-PAGE ist eine Elektrophorese mit Polyacrylamidgel zu verstehen, mit der Proteine nach ihrer Molekülgröße getrennt werden. Dabei überdeckt Natriumdodecylsulfat, SDS, die Proteineigenladung und je größer die Kettenlänge, umso stärker werden die Proteine im Gel zurückgehalten.

Trenn- und Sammelgel wurden hergestellt (siehe Tabelle 11 und Tabelle 12) und die Polymerisationsauslöser TEMED (Tetramethylethylendiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) hinzugegeben. Die Gelkassetten (Invitrogen) wurden bis zur Hälfte mit dem 12 %-igen Trenngel befüllt. Zum Glätten der Geloberfläche wurde diese bis zur Auspolymerisierung mit Reinstwasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Reinstwasser entfernt und das Trenngel mit einem 8 %-igen Sammelgel auf 75 % der Kassettenhöhe aufgefüllt und wiederum mit Reinstwasser überschichtet. In das noch unpolymerisierte Sammelgel wurde ein Gelkamm mit entsprechender Anzahl an Ladetaschen gesteckt. Die fertige Kassette wurde in eine mit 1fach-Laemmli-Puffer befüllte Kammer gestellt, der Kamm gezogen und das Sammelgel mit den Proben beladen.

**Tabelle 11: Trenngel der SDS-PAGE**

Trenngel	8,0 %	12,0 %
Reinstwasser	4,8 ml	3,5 ml
Lösung 2 *	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid (30 %)	2,7 ml	4,0 ml
TEMED	20 µl	20 µl
APS	100 µl	100 µl

\* Lösung 2: 36,3 g TAE, 8,0 ml SDS 10%, aufgefüllt auf 200ml, pH 8,8

**Tabelle 12: Sammelgel der SDS-PAGE**

Reinstwasser	6,5 ml
Lösung 3 *	2,5 ml
Acrylamid (30 %)	1,0 ml
TEMED	20 µl
APS	100 µl

\* Lösung 3: 6,0 g TAE, 4,0 ml SDS 10%, aufgefüllt auf 200ml, pH 6,8

**Tabelle 13: Elektrophoresepuffer 10fach-Laemmli**

TAE	30,25 g
Glycin (2,5 M)	144,25 g
SDS (10 %)	10,0 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 l

Die Proteinproben wurden entsprechend ihres Probenvolumens mit 2fach- oder 5fach-Laemmli-Puffer versehen, um ein jeweiliges Gesamtvolumen von 40 µl in die Ladetaschen der Gelkassette überführen zu können. Vor dem Beladen der Taschen erfolgte ein fünfminütiges Denaturieren der Proteine bei 90 °C. Die Protein-Marker „26616“ und „26625“ (Thermo Scientific) wurden zum Einordnen der Proteingrößen verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 100 V gestartet (Elektrophoresekammer: *XCell Sure Lock™ Mini Cell*, Invitrogen; Stromversorgung: *Power Pack P25*, Biometra). Nachdem die sich auftrennenden Proteinproben das Sammelgel durchlaufen hatten, wurde die Spannung auf 150 V erhöht und die Elektrophorese nach Migration des Ladepuffers durch das Trenngel beendet.

### 3.7.2 Western-Blot

Der *Western-Blot* ist das Übertragen und Fixieren der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus ihrem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran.

Hierzu wurde eine *Western-Blot*-Kammer (*XCell Sure Lock™ Mini Cell*, Invitrogen) mit Transferpuffer gefüllt (siehe Tabelle 14). Ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld überführte das Protein bei 150 mA binnen 120 Minuten auf die Membran.

**Tabelle 14: Transferpuffer für *Western-Blot***

TAE (48 mM)	5,82 g
Glycin (39 mM)	2,93 g
Methanol (20 %)	200 ml
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 l

### 3.7.3 Binden spezifischer Antikörper

Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden durch einstündiges Inkubieren der Membran mit 3 % BSA bei 20 °C blockiert. Es folgte die Zugabe des jeweiligen Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurde für dreimal 5 Minuten mit *TBST* gewaschen, dann der *HRP*-konjugierte Zweitantikörper 2 Stunden lang bei 20 °C zugegeben. Das Entfernen freier Antikörper im Überschuss erfolgte abermals durch dreimaliges Waschen mit *TBST* plus zweimaliges Waschen mit *TBS*.

**Tabelle 15: *TBS*-Puffer**

TAE (1,5 M, pH 7,5)	10 ml
NaCl	5,8 g
<i>Aqua destillata</i>	ad 1 l

\* *TBS* wird zu *TBST* durch Zugabe von 1 ml *Tween* auf 1 l *TBS*.

### 3.7.4 Detektion der Sekundärantikörper

Mittels einer Chemolumineszenz-Reaktion (*Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP-Substrate*) wurde der gebundene Sekundärantikörper am *Fusion FX7* (Pierce) detektiert. Jedes *Western-Blot*-Bild wurde als *16 Bit File* gespeichert und mit der Software *Fusion* (Vilber Lourmat) ausgewertet. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

### 3.7.5 Wiederverwenden der Nitrozellulosemembran

Zum Hybridisieren mit neuen Antikörpern wurden zuvor gebundene Antikörper durch sogenanntes *Stripping* entfernt. Dazu wurde die Membran bei 70 °C 10 Minuten in *Stripping*-Puffer (20 % SDS 10 ml, 1 M TAE pH 6,8 12,5 ml,  $\beta$ -Mercaptoethanol 700  $\mu$ l, Reinstwasser ad 100 ml) inkubiert, dreimal mit *TBST* gewaschen und erneut mit BSA blockiert.

**Tabelle 16: Primär- und Sekundärantikörper für Western-Blot**

Primär-antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Sekundär-antikörper	Verdünnung	Firma
<b>ADIPO-NEKTIN</b>	<i>mouse</i>	1:250 in 3 % BSA/TBST	Abcam (ab22554)	<i>goat anti mouse</i>	1:20.000 in 3 % BSA/TBST	Dianova
<b>ADIPOR1</b>	<i>goat</i>	1: 250 in 3 % BSA/TBST	Abcam (ab50675)	<i>mouse anti goat</i>	1:6.000 in 3 % BSA/TBST	Santa Cruz (2354)
<b>ADIPOR2</b>	<i>goat</i>	1:1000 in 3 % BSA/TBST	Abcam (ab53399)	<i>mouse anti goat</i>	1:6.000 in 3 % BSA/TBST	Santa Cruz (2354)
<b>pAMPK</b>	<i>rabbit</i>	1:500 in 3 % BSA/TBST	Cell Signaling (2531)	<i>goat anti rabbit</i>	1:6.000 in 1 % BSA/TBST	DAKO (P0448)
<b>AMPK</b>	<i>rabbit</i>	1:500 in 5 % BSA/TBST	Cell Signaling (2532)	<i>goat anti rabbit</i>	1:6.000 in 1 % BSA/TBST	DAKO (P0448)
<b>pACACB</b>	<i>rabbit</i>	1:500 in 3 % BSA/TBST	Gene Tex (62736)	<i>goat anti rabbit</i>	1:6.000 in 1 % BSA/TBST	DAKO (P0448)
<b>ACACB</b>	<i>rabbit</i>	1:500 in 3 % BSA/TBST	Gene Tex (89089)	<i>mouse anti goat</i>	1:6.000 in 3 % BSA/TBST	Santa Cruz (2354)
<b><math>\beta</math>-AKTIN</b>	<i>mouse</i>	1:10.000 in 3 % BSA/TBST	Sigma (A5441)	<i>goat anti mouse</i>	1:20.000 in 3 % BSA/TBST	Dianova

### 3.8 ADIPONEKTIN-ELISA

Der *Quantikine® ELISA Human Total Adiponectin/Acrp30* (R&D Systems) dient der Mengenbestimmung von humanem ADIPONEKTIN im Bereich von 1 – 1000 ng/ml in Zellkulturmedien, Blutserum und –plasma und wurde verwendet, um Medienüberstände der SGBS-Zellkultur auf ihre Konzentration an ADIPONEKTIN zu untersuchen. Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA*, wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

### 3.9 LEPTIN-ELISA

Der *Leptin (high sensitive) ELISA* (IBL international) dient der Mengenbestimmung von humanem LEPTIN im Bereich von 15 ~ 1000 pg/ml in Zellkulturmedien, EDTA-Plasma und Blutserum und wurde verwendet, um Medienüberstände der SGBS-Zellkultur auf ihre Konzentration an LEPTIN zu untersuchen. Der *ELISA* wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

### 3.10 Immunfluoreszenz von GLUT4

Die Immunfluoreszenz wurde angewandt, um zu analysieren, welche Lage das Protein GLUT4 in den differenzierten SGBS-Zellen einnimmt. Es kann sowohl in inaktiver Form zytosolisch als auch in aktiver Form innerhalb der Zytoplasmamembran lokalisiert sein.

Es wurden  $0,5 \times 10^4$  SGBS-Zellen je Kammer auf Vierkammerschlitten (*Chamber Slides*, Zellkulturkammern, 4-Well auf Polyolefin, pyrogenfrei, Sarstedt) ausgesät, nach Protokoll kultiviert und differenziert.

An Versuchstag 10 wurden die SGBS-Zellen für 25 Minuten mit 4 %-igem Paraformaldehyd in PBS fixiert. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und für 60 Minuten mit 10 % Ziegenserum, verdünnt mit PBS, bei 20 °C blockiert. Es folgte die Zugabe des Primärantikörpers (mAbcam 48547, Maus monoklonal) 1:2000 in 3 % BSA, und eine Inkubation über Nacht bei 4 °C.

Am Folgetag wurde dreimal mit PBS gewaschen und im Dunkeln bei Raumtemperatur für 90 Minuten mit einem Alexa-Fluor-Sekundärantikörper (Abcam A-11001, IgG der Ziege, gerichtet gegen Maus, rot fluoreszierend bei 488 nm) 1:700 gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Kernfärbung mit dem Farbstoff „Hoechst“ (33342, Invitrogen) für 5 Minuten. Die Zellen wurden mit *Fluorescent Mounting Medium* (Dako, S3023) und einem Deckgläschen bedeckt und am *Keyence-High-Resolution-Mikroskop* „Biozero“ beurteilt.

### 3.11 Immunfluoreszenz von Perilipin

Zur Perilipin-Immunfluoreszenz wurden SGBS-Zellen analog zur GLUT4-Immunfluoreszenz an Versuchstag 10 für 25 Minuten in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und für 60 Minuten mit 3,5 % Pferdeserum bei 20 °C blockiert. Es folgte die Zugabe des Primärantikörpers (monoklonal Anti-Perilipin P1873) 1:500 in 1 % BSA, und eine Inkubation über Nacht bei 4 °C.

Am Folgetag wurde dreimal mit PBS gewaschen und im Dunkeln bei 20 °C für 60 Minuten mit Sekundärantikörper (*goat-anti-rabbit*, A11034, *life technologies*) 1:400 in 1 % BSA, gefärbt. Kernfärbung und Eindeckeln erfolgten analog zur Immunfluoreszenz von GLUT4.

### **3.12 HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie**

Die *High Performance Liquid Chromatography*, *HPLC*, ist eine massenspektrometrische Methode zur Identifizierung und Quantifizierung gelöster Substanzen. In Kooperation mit Hr. Dr. rer. nat. Holger Koch des Zentrum für Toxikologie der Ruhr-Universität Bochum wurde die Konzentration von MEHP im Induktions- und Differenzierungsmedium sowie im Zelllysat von Proben der Tage 4 und 14 bestimmt.

### **3.13 Statistische Auswertung**

Sämtliche Berechnungen der erhobenen Daten wurden mit *Microsoft Excel* ausgeführt. Die Beurteilung von Signifikanzen zwischen den Gruppen der DEHP-Exposition und der DMSO-Kontrolle erfolgte mit dem *student's T-test* in *Excel*. Die Analyse von Signifikanzen zwischen unterschiedlichen Proben Tagen von *qRT-PCR*-Daten wurde mit *SIGMA Plot* durchgeführt und der *Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks-Test* genutzt.

## 4 Ergebnisse

Zellen der humanen Präadipozytenlinie Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom (SGBS) wurden in einem 14-tägigen Zellkulturschema zu reifen Adipozyten differenziert. Während der 4-tägigen Induktionsphase der adipogenen Differenzierung erfolgte die Exposition mit Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) in einer Konzentration von 50 µg/ml im Induktionsmedium. Probenahmen erfolgten an den Tagen 0, 4, 8 und 14. Als Vehikelkontrolle diente DMSO.

### 4.1 Nachweis von MEHP im Medium und im Zelllysate

Mittels *High Performance Liquid Chromatography*- (HPLC-)gekoppelter Massenspektrometrie wurde die Konzentration von Mono(2-ethylhexyl)phthalat (MEHP) im Mediumüberstand und Zelllysate an den Tagen 4 und 14 der Zellkultur bestimmt. DEHP-exponierte SGBS-Zellen wurden nicht-exponierten DMSO-Kontrollen gegenübergestellt. Die DEHP-Exposition der SGBS-Zellen erfolgte von Tag 0 – Tag 4.

#### 4.1.1 HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie von MEHP im Medium

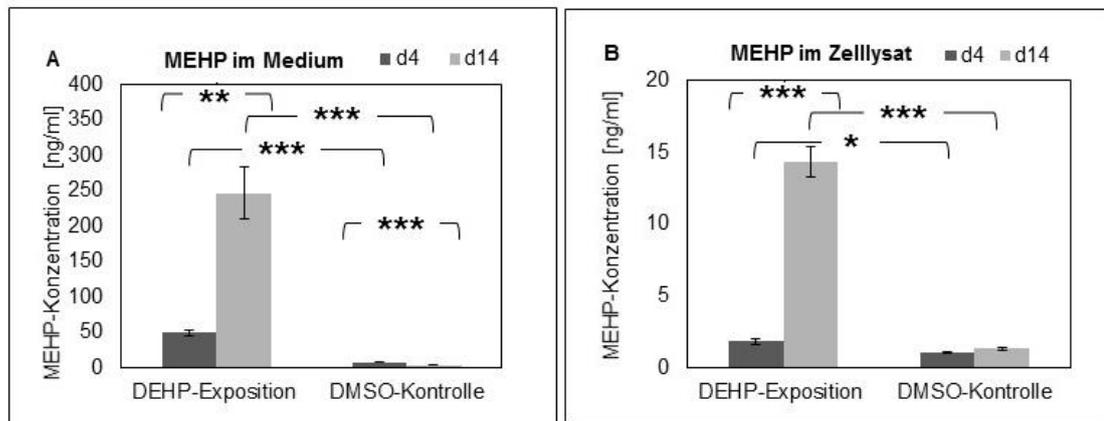
Die MEHP-Konzentration war unter DEHP-Exposition im Differenzierungsmedium (Tag 14) im Vergleich zum Induktionsmedium (Tag 4) signifikant erhöht. An Tag 4 ergab die Messung  $49,6 \pm 4,4$  ng/ml und an Tag 14  $246,4 \pm 36,2$  ng/ml (N=4, n=1;  $p < 0,001$ , siehe Abbildung 6).

Auch in DMSO-Kontrollen konnte MEHP nachgewiesen werden. Die MEHP-Konzentration war in DMSO-Kontrollen von Tag 4 verglichen mit jenen von Tag 14 signifikant erhöht (Tag 4  $8,3 \pm 0,4$  ng/ml (N=4, n=1;  $p < 0,001$ ), Tag 14  $3,6 \pm 0,2$  ng/ml (N=4, n=1), siehe Abbildung 6). Die MEHP-Konzentration DEHP-exponierter SGBS-Zellen betrug an Tag 4 das 6-fache, an Tag 14 das 68-fache im Vergleich zur DMSO-Kontrolle von Tag 4.

#### 4.1.2 HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie von MEHP im Zelllysate

Die MEHP-Konzentration im Zelllysate war unter DEHP-Exposition an Tag 14 im Vergleich zu Tag 4 signifikant erhöht (DEHP Tag 14  $14,4 \pm 1,1$  ng/ml vs. DEHP Tag 4  $1,8 \pm 0,2$  ng/ml; N=4, n=1;  $p < 0,001$ , siehe Abbildung 6). Am Differenzierungsende betrug die MEHP-Konzentration lysierter Zellen das 8-fache verglichen mit dem Ende der Induktionsphase.

Im Zelllysats der DMSO-Kontrollen konnte ebenfalls MEHP nachgewiesen werden. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tagen 4 und 14 (DMSO Tag 14  $1,3 \pm 0,1$  ng/ml vs. DMSO Tag 4  $1,0 \pm 0,1$  ng/ml; N=4, n=1).



**Abbildung 6: Massenspektrometrie von MEHP im Medium und Zelllysats**

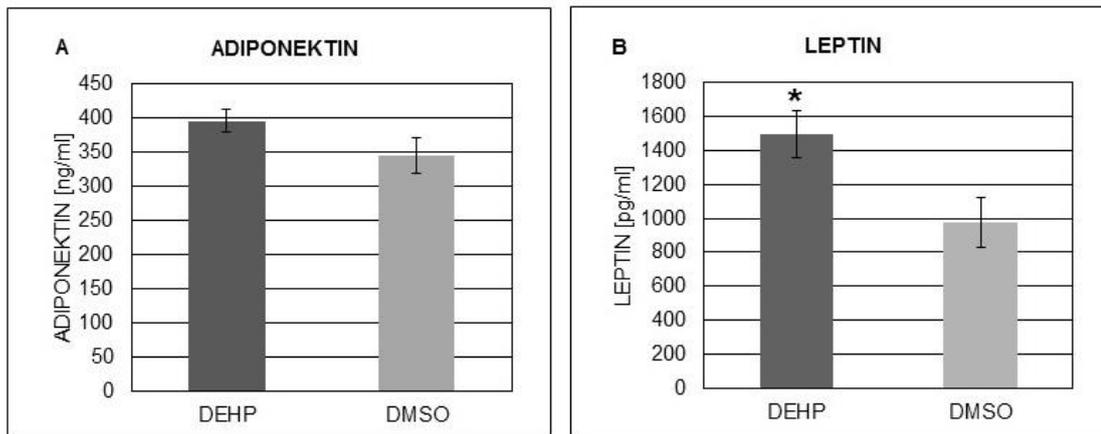
Mittels *HPLC*-gekoppelter Massenspektrometrie wurde MEHP im Medium (A) und Zelllysats (B) an den Tagen 4 und 14 quantifiziert. N=4; P $\leq$ 0,05\*; P $\leq$ 0,01\*\*; P $\leq$ 0,001\*\*\*; *student's T-test*.

#### 4.2 Quantifizierung der Proteine ADIPONEKTIN und LEPTIN im Medium

Die Adipokine ADIPONEKTIN und LEPTIN wurden mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* in Medienüberständen von Tag 14 quantifiziert. Die Durchführung der *ELISA* erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Kristina Schädlich innerhalb der Arbeitsgruppe. Die Ergebnisse wurden mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt.

Der ADIPONEKTIN-*ELISA* (*Quantikine® ELISA Human Total Adiponectin/Acrp30, R&D Systems*) von N=16 Medienüberständen des Differenzierungsendes der SGBS-Zellen an Tag 14 ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den DEHP-exponierten SGBS-Zellen und den DMSO-Kontrollen; DEHP ( $395,2 \pm 16,5$ ) ng/ml (N=16, n=1) und DMSO ( $343,4 \pm 26,0$ ) ng/ml (N=16, n=1), P $>$ 0,05, siehe Abbildung 7.

Im LEPTIN-*high sensitive-ELISA* (*IBL international*) von N=12 Medienüberständen von Tag 14 war der LEPTIN-Gehalt der DEHP-Proben signifikant erhöht gegenüber den DMSO-Kontrollen (P $\leq$ 0,05, siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: ADIPONEKTIN- und LEPTIN-Gehalt im Medium von Tag 14**

Die Proteine ADIPONEKTIN und LEPTIN wurden mittels *ELISA* im Mediumüberstand von Tag 14 quantifiziert. Für (A) ADIPONEKTIN konnte keine Signifikanz ermittelt werden; N=16. Für (B) LEPTIN ergab sich eine signifikante Erhöhung nach DEHP-Exposition im Vergleich zur DMSO-Kontrolle; N=12.  $P \leq 0,05^*$ ; *student's T-test*.

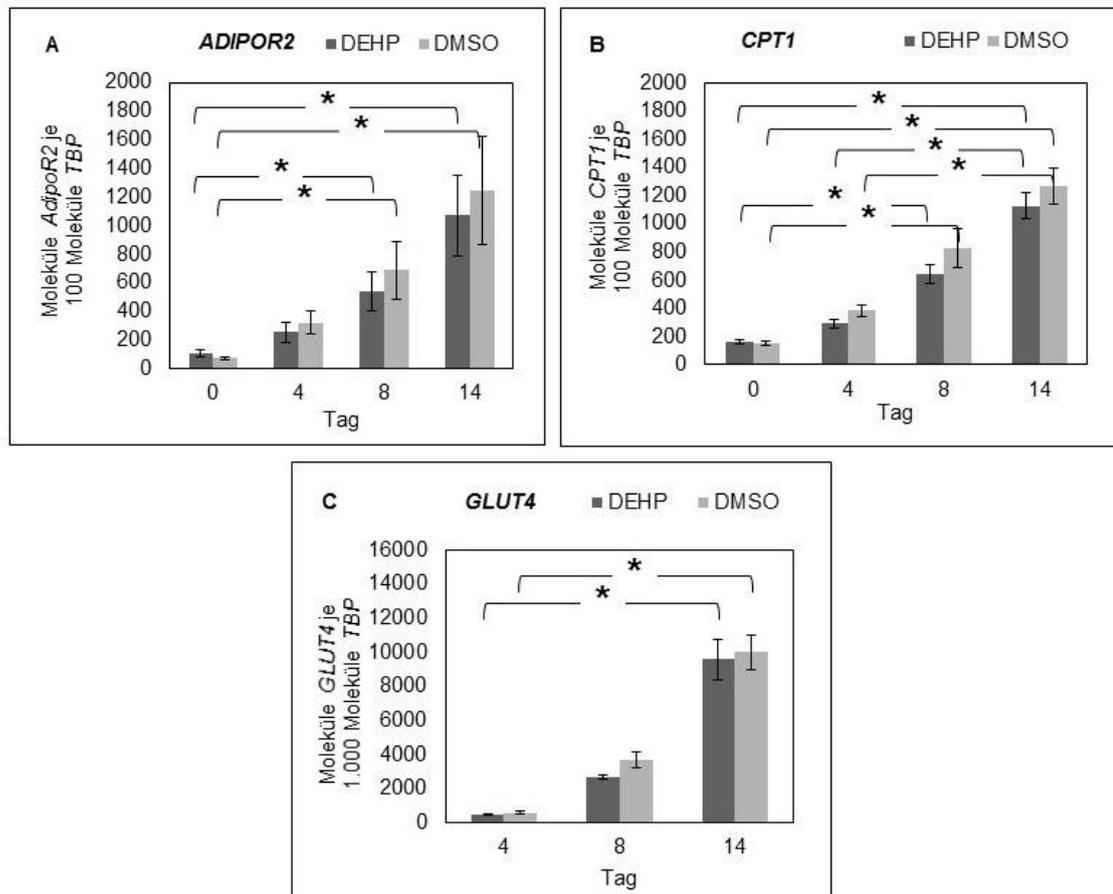
### 4.3 Genexpressionsanalyse der Adiponektinsignalkaskade und seiner Regulatoren

Die Expression der Gene der Adiponektinsignalkaskade und seiner Regulatoren wurde zu Versuchsbeginn, am Ende der Induktionsphase der adipogenen Differenzierung, inmitten der Differenzierungsphase und am Differenzierungsende untersucht. Anhand von *RNA*-Proben der Tage 0, 4, 8 und 14 wurde die Transkriptmenge von bis zu 12 Versuchen mittels quantitativer *Real-Time-PCR* (*qRT-PCR*) gemessen. Die Gene Adiponektin, Glukosetransporter 4 (*GLUT4*) und Acetyl-CoA-Carboxylase  $\beta$  (*ACACB*) ergaben an Tag 0 kein Transkript. Dies wurde mittels Standard-*PCR* (*PCR*) festgestellt und mittels Agarose-Gelelektrophorese belegt.

#### 4.3.1 Genexpressionsanalyse der Adipozyten-Marker *ADIPOR2*, *CPT1* und *GLUT4*

Die *qRT-PCR* Adipogenese-spezifischer Markergene zeigte eine erfolgreiche Differenzierung der SGBS-Zellen hin zu reifen Adipozyten. Die quantifizierten Transkriptmengen des Adiponektinrezeptors 2 (*ADIPOR2*), der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (*CPT1*) und des Glukosetransporters 4 nahmen von Tag 0 bis 14 exponentiell zu (siehe Abbildung 8). Die Quantifizierung von *ADIPOR2* ergab signifikante Unterschiede zwischen den Tagen 0 und 8 sowie 0 und 14 innerhalb der DEHP-Proben beziehungsweise DMSO-Kontrollen. *CPT1* zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Tagen 0 und 8, 0 und 14 sowie 4 und 14. Von *GLUT4*

waren an Tag 0 keine Transkripte messbar, weshalb Daten zu Tag 0 in Abbildung 8 entfallen. DEHP-Proben und DMSO-Kontrollen von *GLUT4* waren an Tag 14 signifikant erhöht verglichen mit Tag 4. Eine Genexpressionsanalyse des Adiponektinrezeptors 1 (*ADIPOR1*) war mit zwei verschiedenen *Primer*-Paaren mehrfach erfolglos versucht worden.



**Abbildung 8: Absolute Transkriptmengen Adipogenese-spezifischer Markergene**

Die Transkriptmengen der Gene *ADIPOR2*, *CPT1* und *GLUT4* wurden von DEHP-exponierten SGBS-Zellen und DMSO-Kontrollen an den Tagen 0, 4, 8 und 14 mittels *qRT-PCR* quantifiziert und nahmen von Tag 0 bis 14 einen exponentiell ansteigenden Verlauf. Von *GLUT4* waren an Tag 0 keine Transkripte messbar. Die DEHP-Proben von *ADIPOR2*, *CPT1* und *GLUT4* unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von den DMSO-Kontrollen desselben Tages. (A) *ADIPOR2* N=12; (B) *CPT1* N=8; (C) *GLUT4* N=7;  $P \leq 0.05$  \*; *Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks*.

#### 4.3.2 Genexpressionsanalyse von Adiponektin, *AMPK* und *ACACB*

Die Transkriptmengen von Adiponektin, *AMPK* und *ACACB* von DEHP-exponierten SGBS-Zellen und DMSO-Kontrollen wurden an den Tagen 0, 4, 8 und 14 mittels *qRT-PCR* quantifiziert. Adiponektin und *ACACB* waren an Tag 0 nicht messbar, weshalb in

nachfolgender Abbildung keine Daten an Tag 0 angeführt sind. Eine beispielhafte Agarose-Gelelektrophorese einer Standard-PCR von Adiponektin belegte die noch nicht eingesetzte Genexpression an Tag 0 (siehe Abbildung 9).

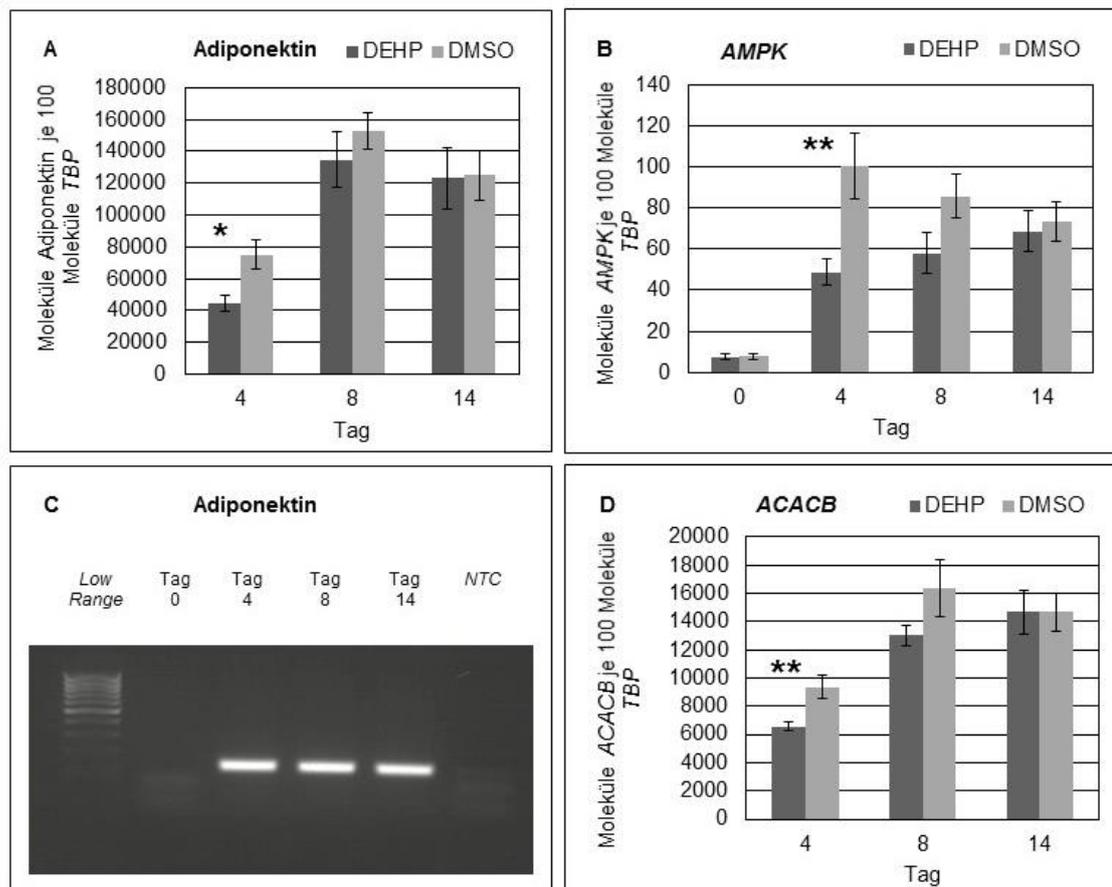
An Tag 4 waren die Gene Adiponektin, *AMPK* und *ACACB* unter DEHP-Exposition signifikant herunterreguliert (siehe Abbildung 9):

Adiponektin Tag 4 (DEHP  $44801 \pm 4878$  Moleküle Adiponektin / 100 Moleküle *TBP* vs. DMSO  $75121 \pm 9287$  Moleküle Adiponektin / 100 Moleküle *TBP*; N=8, n=1;  $p < 0,05$ );

*AMPK* Tag 4 (DEHP  $48,8 \pm 6,5$  Moleküle *AMPK* / 100 Moleküle *TBP* vs. DMSO  $100,4 \pm 16,0$  Moleküle *AMPK* / 100 Moleküle *TBP*; N=12, n=1;  $p < 0,01$ );

*ACACB* Tag 4 (DEHP  $6576 \pm 345$  Moleküle *AMPK* / 100 Moleküle *TBP* vs. DMSO  $9332 \pm 822$  Moleküle *AMPK* / 100 Moleküle *TBP*; N=7, n=1;  $p < 0,01$ ).

An Tag 8 konnten keine signifikanten Unterschiede mehr gemessen werden. An Tag 14 waren die Transkriptmengen nahezu ausgeglichen. Die größten Transkriptmengen von Adiponektin konnten an Tag 8 gemessen werden. Die Transkriptmengen von Adiponektin DEHP-exponierter Proben waren an Tag 8 3-fach erhöht gegenüber Tag 4 und betragen an Tag 14 noch das 2,7-fache bezogen auf Tag 4. *AMPK* wurde in geringer Menge bereits an Tag 0 exprimiert. Die Induktion der Adipogenese ergab unter den DMSO-Kontrollen einen 12,5-fachen Anstieg der Transkription von *AMPK* an Tag 4. Die Transkription nahm dann über Tag 8 bis zum Differenzierungsende an Tag 14 ab und erreichte unter den DMSO-Kontrollen die 9-fache Menge bezogen auf Tag 4. Der herunterregulierende Effekt von DEHP an Tag 4 war bereits an Tag 8 nicht mehr messbar.



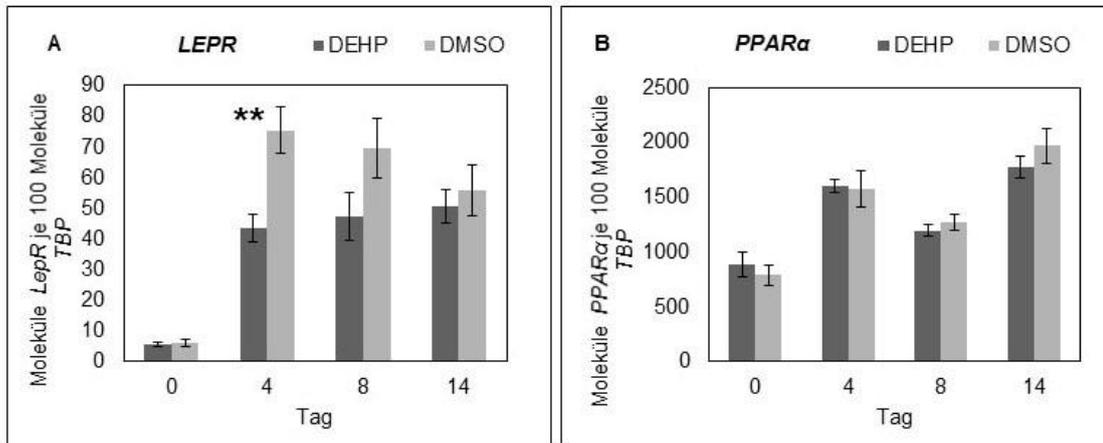
**Abbildung 9: Absolute Transkriptmengen von Adiponektin, AMPK und ACACB**

Die Transkriptmengen der Gene Adiponektin (A), AMPK (B) und ACACB (D) wurden von DEHP-exponierten SGBS-Zellen und DMSO-Kontrollen an den Tagen 0, 4, 8 und 14 mittels *qRT-PCR* quantifiziert. In (C) ist die Agarose-Gelelektrophorese einer Standard-PCR von Adiponektin dargestellt. Diese ergab kein Transkript an Tag 0, weshalb keine *qRT-PCR*-Daten erhoben wurden. ACACB (D) verhielt sich analog. Auf ein beispielhaftes Gelelektrophoresebild wurde hier verzichtet. Low Range = Low Range DNA Ladder; NTC = No-Template-Control; N=8 (Adiponektin); N=12 (AMPK); N=7 (ACACB);  $P \leq 0,05^*$ ;  $P \leq 0,01^{**}$ ; *student's T-test*.

#### 4.3.3 Genexpressionsanalyse von LEPR und PPAR $\alpha$

Die Transkriptmengen des Leptinrezeptors (LEPR) und des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) von DEHP-exponierten SGBS-Zellen und DMSO-Kontrollen wurden an den Tagen 0, 4, 8 und 14 mittels *qRT-PCR* quantifiziert (siehe Abbildung 10). Die Induktion der adipogenen Differenzierung bewirkte einen Anstieg der LEPR-Expression an Tag 4 verglichen mit Tag 0 um das 7-fache unter den DEHP-Proben und um das 12,5-fache unter den DMSO-Kontrollen. Der LEPR war unter DEHP-Exposition an Tag 4 gegenüber den DMSO-Kontrollen signifikant herunterreguliert. Diese Dysregulation war an Tag 8 und 14 nicht mehr messbar. Die

Expression des Transkriptionsfaktors *PPARα* ergab an keinem Tag signifikante Unterschiede zwischen den DEHP-exponierten SGBS-Zellen und den DMSO-Kontrollen.

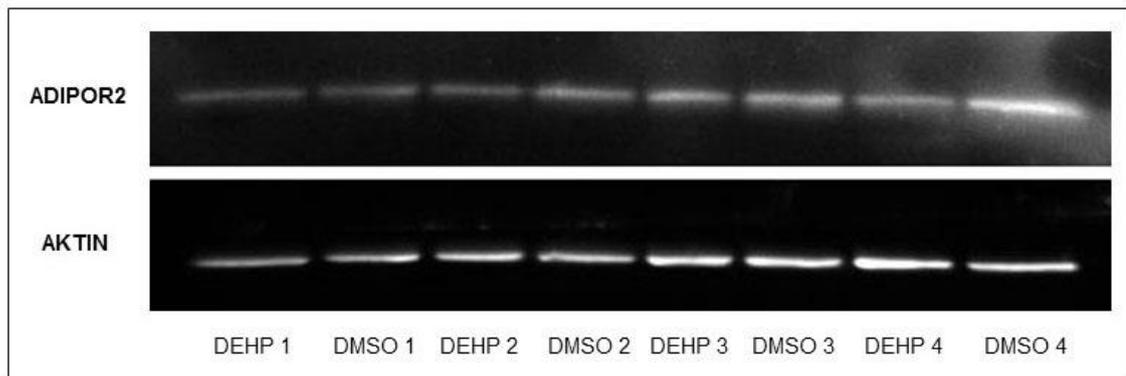


**Abbildung 10: Absolute Transkriptmengen von *LEPR* und *PPARα***

Die Transkriptmengen von *LEPR* (A) und *PPARα* (B) wurden von DEHP-exponierten SGBS-Zellen und DMSO-Kontrollen an den Tagen 0, 4, 8 und 14 mittels *qRT-PCR* quantifiziert. Der *LEPR* zeigte eine signifikante Herunterregulation an Tag 4. Die DEHP-Exposition hatte keinen Einfluss auf die Transkription von *PPARα*. *LEPR*: N=8;  $P \leq 0,01^{**}$ ; *student's T-test*.

#### 4.4 Proteinquantifizierung mittels *Western-Blot*-Analyse

Substrate, Rezeptoren und Enzyme der Adiponektinsignalkaskade wurden mittels *Western-Blot*-Analyse auf Proteinebene quantifiziert. An Tag 0 hatte noch keine Genexpression von Genen der Adiponektinsignalkaskade stattgefunden, an Tag 4 nur in sehr geringem Umfang, sodass keine *Western-Blots* der Tage 0 und 4 durchgeführt wurden.

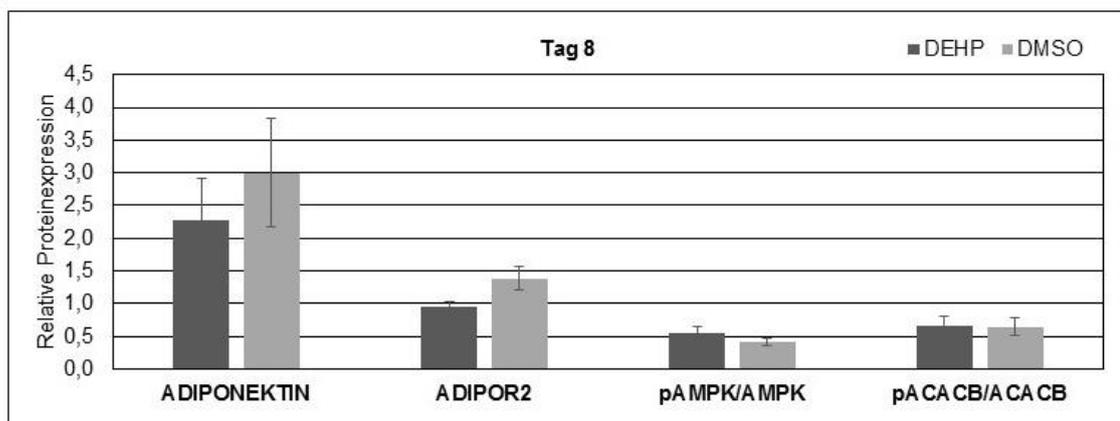


**Abbildung 11 - Beispielhafte Detektion anhand des *Western-Blot* von ADIPOR2**

Dargestellt ist eine *Western-Blot*-Detektionsaufnahme von DEHP-Proben und DMSO-Kontrollen des Tages 8 von N=4 Versuchen. Verwandt wurden die Primärantikörper ADIPOR2 und  $\beta$ -AKTIN (siehe Kapitel 3.7.5). ADIPOR2 = Adiponektin-Rezeptor 2.

#### 4.4.1 *Western-Blot*-Analysen von Tag 8

Eine DEHP-Exposition ergab für ADIPONEKTIN und für den Adiponektinrezeptor ADIPOR2 im *Western-Blot* von Tag 8 keine signifikante Dysregulation (siehe Abbildung 11). Die Ratio aus phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Form der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (pAMPK/AMPK) war unter DEHP-Exposition ebenso wenig signifikant verändert wie die Ratio aus der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form der Acetyl-CoA-Carboxylase  $\beta$  (pACACB/ACACB) (siehe Abbildung 12). Eine DEHP-Exposition hatte somit keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der AMPK und ACACB an Tag 8. Eine Detektion des ADIPOR1 von Tag 8 im *Western-Blot* war wiederholt nicht erfolgreich.



**Abbildung 12: Proteinquantifizierung an Tag 8**

*Western-Blots* der Proteine ADIPONEKTIN (N=6), ADIPOR2 (N=5), pAMPK/AMPK (N=5) und pACACB/ACACB (N=6) von Tag 8

#### 4.4.2 Western-Blot-Analysen von Tag 14

Eine DEHP-Exposition ergab für ADIPONEKTIN und für den Adiponektinrezeptor ADIPOR1 im *Western-Blot* von Tag 14 keine statistisch signifikanten Unterschiede. ADIPOR2 war unter DEHP-Exposition signifikant herunterreguliert, die Ratio aus pAMPK/AMPK signifikant hochreguliert.

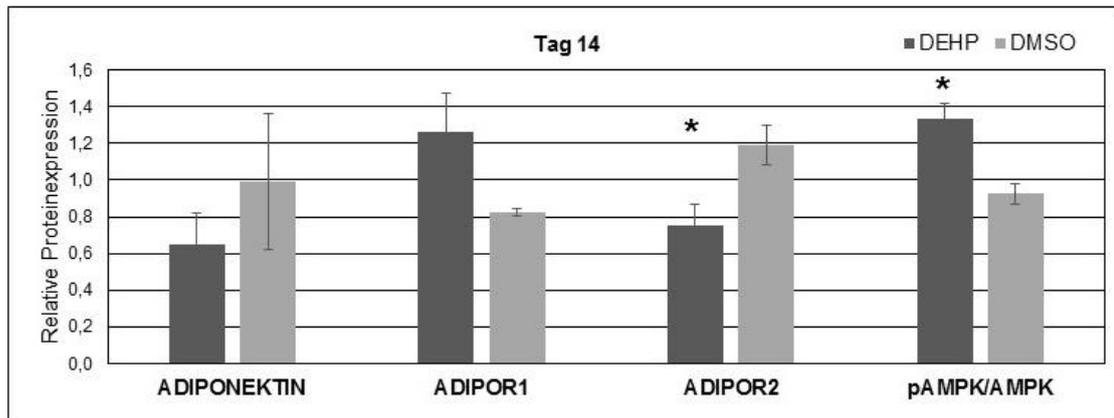


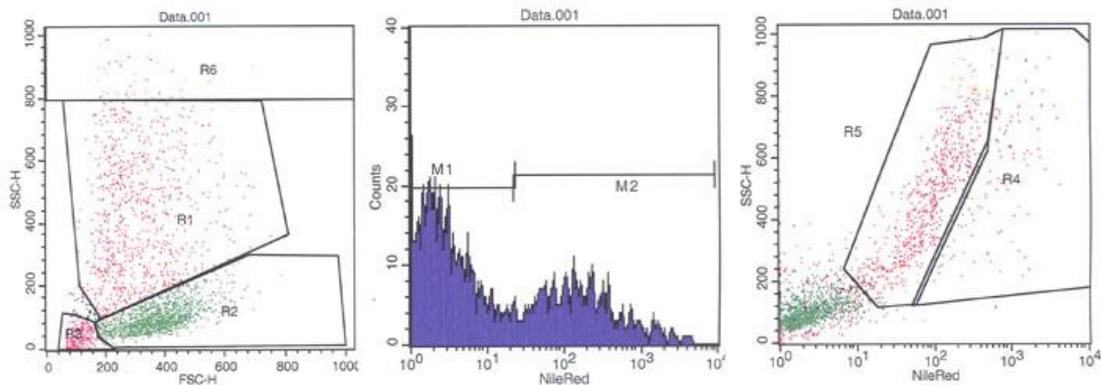
Abbildung 13: Proteinquantifizierung an Tag 14

Es wurden *Western-Blots* der Proteine ADIPONEKTIN (N=4), ADIPOR1 (N=4), ADIPOR2 (N=4) und pAMPK/AMPK (N=3) von Tag 14 durchgeführt.  $P \leq 0,05^*$ ;  $P \leq 0,01^{**}$ ;  $P \leq 0,001^{***}$ ; *student's T-test*.

#### 4.5 FACS-Analyse der Differenzierungseffizienz zu Adipozyten

Mit der Methode des *Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)* wurde die Differenzierungseffizienz von SGBS-Zellen zu Adipozyten untersucht. Von N=4 Versuchen von Tag 8 wurden DEHP-exponierte Zellen und DMSO-Kontrollen anhand ihrer *Nile Red*-Fluoreszenz und ihrer Granularität sortiert und gezählt. Das *Nile Red* ist ein lipophiler, fluoreszierender Vitalfarbstoff, der sich Lipiden anlagert. Tag 8 der Differenzierung wurde gewählt, weil SGBS-Zellen in einem späteren Stadium die mechanischen Beanspruchungen beim Ablösen und *FACSen* nicht überlebt hatten. Zellen gleicher Größe wurden in *Gates* zusammengefasst. Das *Gate M2* erfasste die differenzierten Adipozyten, welche im Gegensatz zu weniger differenzierten Zellen des *Gate M1* eine höhere *Nile Red*-Fluoreszenz aufwiesen. DEHP-exponierte SGBS-Zellen unterschieden sich bezogen auf den prozentualen Anteil der Adipozyten im *Gate M2* nicht von den Kontrollzellen. DEHP bewirkte nicht, dass mehr SGBS-Zellen zu reifen Adipozyten differenzierten. 30 % aller SGBS-Zellen lagen sowohl bei den DEHP-

exponierten Zellen als auch bei den DMSO-Kontrollen im *Gate* M2 (siehe Abbildung 14).

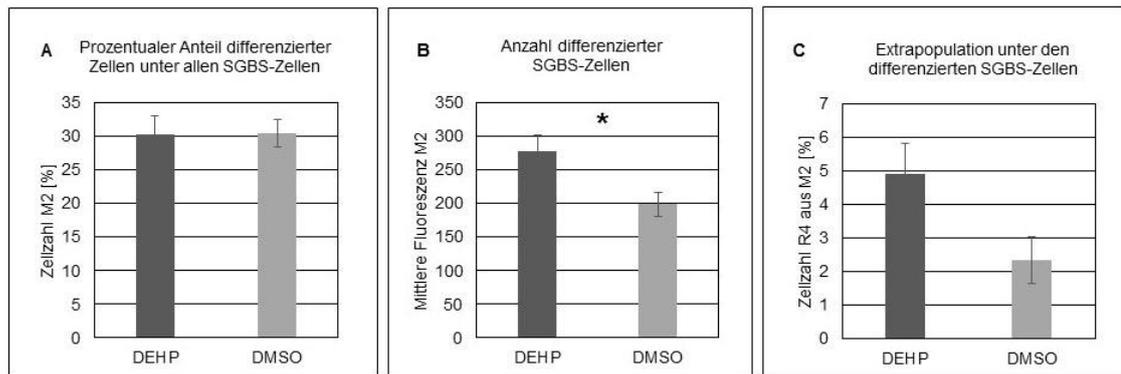


**Abbildung 14: Beispielhafte FACS-Analyse**

Die *Gates* M1 (Mitte) und R2 (links) erfassen die undifferenzierten SGBS-Zellen mit geringer *Nile Red*-Fluoreszenz, die *Gates* M2 (Mitte) und R1 (links) die differenzierten SGBS-Zellen mit höherer *Nile Red*-Fluoreszenz. Die *Gates* R6 (links) und R4 (rechts) erfassen eine Extrapopulation der am meisten differenzierten SGBS-Zellen. SSC = *side scatter* = Seitwärtsstreulicht, FSC = *forward scatter* = Vorwärtsstreulicht.

Die *Nile-Red*-Fluoreszenz gab Aufschluss über die Menge an in Vesikeln eingelagertem Fett einer Zelle. Die mittlere Fluoreszenz des *Gate* M2 war in DEHP-Zellen signifikant erhöht gegenüber DMSO-Kontrollen. Das heißt, dass die DEHP-Exposition zur Hypertrophie, zur vermehrten Einlagerung von Fett in Form von größeren oder mehr Fettvesikeln führte.

Es konnte eine Extrapopulation R4 maximal differenzierter SGBS-Zellen identifiziert werden (siehe Abbildung 14). Unter DEHP-Exposition waren in R4 zwar mehr Zellen gezählt worden als in R4 der DMSO-Kontrollen, dieser Unterschied war aber nicht statistisch signifikant (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15: FACS-Analyse der Differenzierungseffizienz zu Adipozyten**

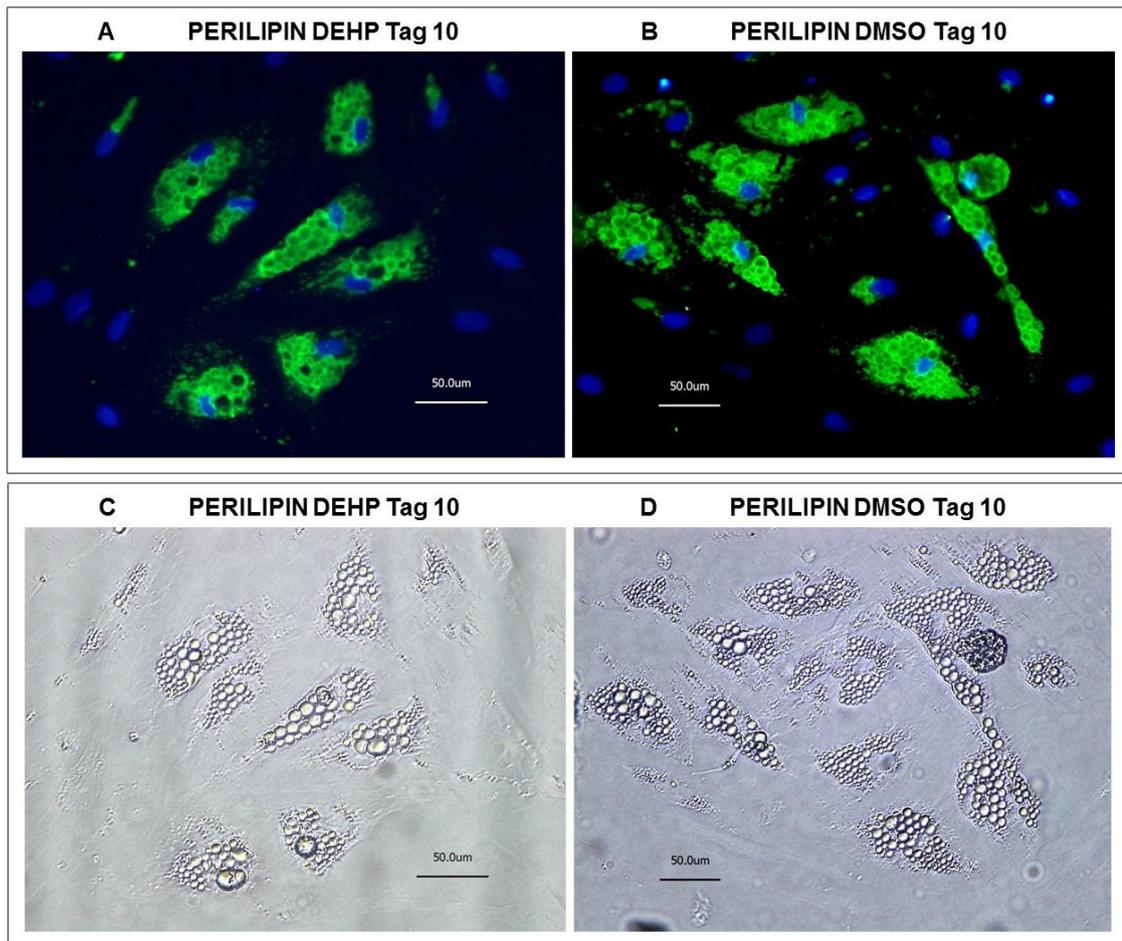
DEHP-exponierte SGBS-Zellen und DMSO-Kontrollen wurden an Tag 8 der Differenzierung mit *Nile Red* gefärbt und mittels FACS nach Granularität und Fluoreszenz sortiert und gezählt. N=4;  $P \leq 0,05^*$ ; *student's T-test*.

#### 4.6 Immunfluoreszenz von PERILIPIN und GLUT4

Mittels Immunfluoreszenzanalysen wurde die Lokalisation der Proteine PERILIPIN und GLUT4 in DEHP-exponierten SGBS-Zellen und DMSO-Kontrollen von Tag 10 untersucht. Die SGBS-Zellen waren an Tag 10 fixiert worden, da sie zu jenem Zeitpunkt einen für die Fixierungs- und Färbeschritte optimalen Fettgehalt aufwiesen. SGBS-Zellen von Tag 10 haben bereits einen hohen Grad der adipogenen Differenzierung erreicht. Sie sind jedoch noch nicht mit Fettvesikeln überladen. SGBS-Zellen von Tag 14 hingegen hatten den Arbeitsschritten der Immunfluoreszenz aufgrund platzender Fettvesikel nicht standgehalten.

##### 4.6.1 Lokalisation von PERILIPIN in SGBS-Zellen von Tag 10

PERILIPIN ist ein Hüllprotein auf der Oberfläche von Fettvesikeln. Das Protein PERILIPIN wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse in SGBS-Adipozyten von Tag 10 detektiert, um Unterschiede in Lokalisation, Anzahl und Größe von Fettvesikeln in DEHP-exponierten SGBS-Zellen und DMSO-Kontrollen darzustellen. Optisch sichtbare Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren gering. DEHP-exponierte Zellen wiesen minimal größere Fettvesikel auf als die DMSO-Kontrollen. Sowohl in DEHP- als auch in DMSO-Zellen füllten die Fettvesikel das gesamte Zytosol aus mit dichtester Lage um den Zellkern herum (siehe Abbildung 16).



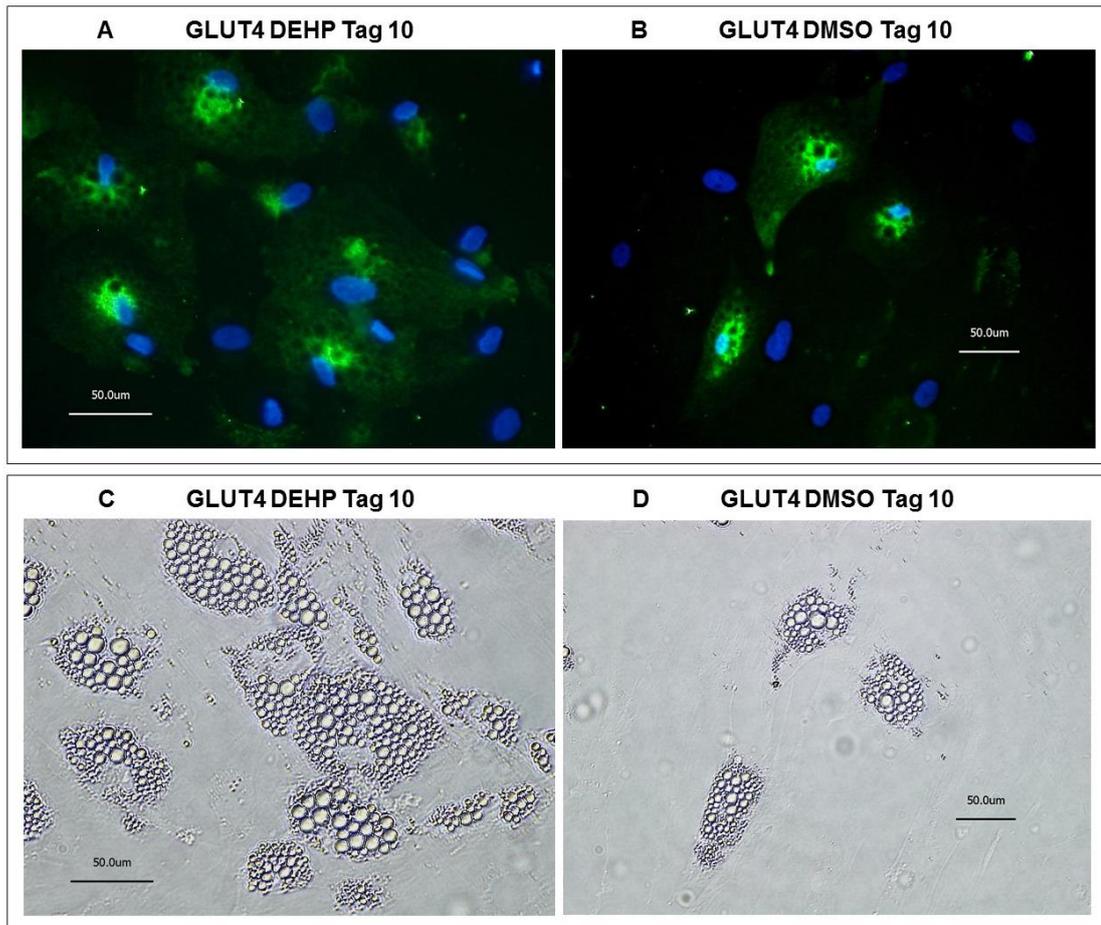
**Abbildung 16: Lokalisation von PERILIPIN und Lichtmikroskopie an Tag 10**

Mittels Immunfluoreszenz wurde das Protein PERILIPIN dargestellt: Grün fluoreszierend das PERILIPIN als Hüllprotein der Fettvesikel, blau fluoreszierend die Doppelstrang-DNA der Zellkerne. (A) zeigt die Lage der Fettvesikel DEHP-exponierter SGBS-Adipozyten, (B) jene der DMSO-Kontrollen. (C) ist die lichtmikroskopische Ansicht zu (A), (D) jene zu (B). Strukturell geborstene Vesikel imponieren als „schwarze Löcher“ inmitten des grün-fluoreszierenden Fetts in (A), als dunkel umrandete Vesikel in (C). Im rechten, oberen Quadranten von (D) stellt sich eine mechanisch destruierte Zelle als dunkle Verdichtung dar. Maßstab 50 µm.

#### 4.6.2 Lokalisation von GLUT4 in SGBS-Zellen von Tag 10

Das Glukosetransportprotein GLUT4 wird in humanen Myozyten und Adipozyten exprimiert. Es wird in Vesikelmembranen des Golgi-Apparates gespeichert. Als Antwort der Zellen auf Insulin verschmelzen die Vesikel mit der Zellmembran und GLUT4 transportiert Glukose von extrazellulär durch die Zellmembran nach intrazellulär. Die Immunfluoreszenz von GLUT4 diente der Analyse, ob eine DEHP-Exposition die Lage und folglich Aktivität von GLUT4 beeinflusst. Die Analyse ergab, dass sich Lage und Aktivität von GLUT4 in DEHP-exponierten SGBS-Zellen und DMSO-Kontrollen optisch

nicht unterschieden (siehe Abbildung 17). In beiden Fällen befand sich der Hauptanteil der Fluoreszenz im Golgi-Apparat. Das gesamte Zytosol DEHP-exponierter SGBS-Zellen und der DMSO-Kontrollen fluoreszierte schwach. Die Zellgrenzen waren in beiden Fällen in gleicher Intensität als schwach grün-fluoreszierender „Saum“ darstellbar. Das heißt, der Hauptanteil von GLUT4 befand sich in inaktiver Form im Zytosol. DEHP-exponierte SGBS-Zellen und DMSO-Kontrollen wiesen GLUT4 in äquivalentem Umfang in aktiver membranständiger Form auf.



**Abbildung 17: Lokalisation von GLUT4 und Lichtmikroskopie an Tag 10**

Mittels Immunfluoreszenz wurde das Membrantransportprotein GLUT4 dargestellt: Grün fluoreszierend das GLUT4, blau fluoreszierend die Doppelstrang-DNA der Zellkerne. (A) zeigt die Lage von GLUT4 in DEHP-exponierten SGBS-Zellen, (B) jene in DMSO-Kontrollen. (C) ist die lichtmikroskopische Ansicht zu (A), (D) jene zu (B). Der Hauptanteil der Fluoreszenz von GLUT4 liegt zellkernnah und zytosolisch, das gesamte Zytoplasma fluoresziert schwach, Zellgrenzen sind durch die membranständige Lage der aktiven Form von GLUT4 erkennbar. Die DEHP-Exposition führte zu keiner optisch darstellbaren, veränderten Lage und Aktivität von GLUT4. Maßstab 50 µm.

## 5 Diskussion

Welchen Einfluss hat der Weichmacher Di(2-ethylhexyl)phthalat auf die Adipogenese humaner Präadipozyten? Der vorliegenden liegt die Hypothese zugrunde, dass eine DEHP-Exposition in umweltrelevanter Konzentration während der Induktionsphase der Adipogenese humaner Präadipozyten einen langfristigen obesogenen Effekt verursacht. Die Arbeitshypothese wurde am Modell der SGBS-Zellen untersucht, welche von Tag 0 bis 4 mit DEHP [50µg/ml] exponiert wurden. Es galt zu beantworten, ob DEHP in der Zellkultur in MEHP umgewandelt wird, ob die DEHP-Exposition direkte oder langfristige die Adiponektinsignalkaskade dysregulierende Effekte hat und ob das DEHP eine Hyperplasie oder Hypertrophie der differenzierten Adipozyten bewirken kann.

Die Untersuchung der Adiponektinsignalkaskade, seiner Regulatoren und Substrate ergab, dass DEHP direkt dysregulierend auf die Gentranskription von Adiponektin, *AMPK* und *ACACB* (siehe Abbildung 9) wirkte, solange es im Medium vorlag. Ein langfristiger Effekt auf die Adiponektinsignalkaskade (an Tag 8 oder an Tag 14 statt an Tag 4) konnte auf *RNA*-Ebene nicht ermittelt werden. Jedoch zeigte der *LEPTIN-ELISA*, dass das Adipokin *LEPTIN* langfristig höher exprimiert wurde. Das Adipokin *ADIPONEKTIN* hingegen lag am 14. Tag der adipogenen Differenzierung nach DEHP-Exposition von Tag 0 bis Tag 4 in unveränderter Konzentration im Mediumüberstand DEHP-exponierter SGBS-Zellen vor. Die *FACS*-Analyse wiederum ergab eine signifikant erhöhte Fetteinlagerung in den DEHP-exponierten Adipozyten an Tag 8 (siehe Abbildung 15 B).

Daraus ist zu schließen, dass DEHP während der Induktionsphase der Differenzierung humaner Präadipozyten in einer Konzentration von 50 µg/ml ein obesogenes Potenzial hat.

### 5.1 DEHP wird in MEHP umgewandelt

Die *HPLC*-gekoppelte Massenspektrometrie lieferte den Nachweis, dass im Laufe der Differenzierung der SGBS-Zellen bei DEHP-Exposition Mono(2-ethylhexyl)phthalat (MEHP) entsteht und wirken kann (siehe Abbildung 6). Bereits am Ende der Induktionsphase war MEHP im Mediumüberstand in 25-fach höherer Konzentration als im Zelllysat messbar. Von Tag 4 bis Tag 14 nahm die MEHP-Konzentration signifikant zu und war auch an Tag 14 im Mediumüberstand höher konzentriert als im Zelllysat. Die gemessenen MEHP-Konzentrationen liegen im Nanogrammbereich und sind verglichen mit der DEHP-Exposition von 50 µg/ml um den Faktor  $10^{-3}$  niedriger. DEHP

wird folglich nur partiell in MEHP umgewandelt. Es kann nicht gesagt werden, ob die gemessenen obesogenen Effekte auf die DEHP-Exposition oder den Metaboliten MEHP zurückzuführen sind. Die Exposition war mit DEHP und nicht mit MEHP erfolgt, weil einerseits in unveröffentlichten Vorversuchen innerhalb der Arbeitsgruppe das MEHP im Gegensatz zum DEHP keine Effekte gezeigt hatte und andererseits DEHP die umweltrelevante Substanz ist, welche aufgrund seiner lipophilen Struktur in die Zellen gelangt, nicht das hydrophile MEHP (Kessler et al. 2012).

Sowohl in *in vitro*- als auch in *in vivo*-Studien erwies sich MEHP als ein aktiver obesogener Metabolit (Ellero-Simatos et al. 2011; Feige et al. 2007; Hao et al. 2012). Hao et al. wiesen 2012 einen obesogenen Effekt von MEHP *in vivo* nach. So hatte eine *in utero*-Exposition mit niedrig dosiertem MEHP (tägliche intraperitoneale Injektion von 0,05 mg/kgKG) gravider Mäuse bei männlichen Nachkommen am 60. Tag postnatal zu einem signifikanten Anstieg von Körpergewicht und Fettgewebsmasse geführt (Hao et al. 2012).

MEHP entsteht aus DEHP durch Hydrolyse. Nach Hanioka et al. geschieht dies intrazellulär durch eine Phase-I-Biotransformation (Hanioka et al. 2012). Da die in der vorliegenden Dissertation gemessenen MEHP-Konzentrationen im Mediumüberstand stets höher waren als im Zelllysate, kann von einer hochfrequenten Exozytose des Metaboliten MEHP nach intrazellulärer Hydrolyse ausgegangen werden. Wahrscheinlich ist auch die nicht-enzymatische spontane extrazelluläre chemische Hydrolyse von DEHP zu MEHP. Im menschlichen Körper wird DEHP sehr rasch durch Lipasen in Speichel und Blut zu MEHP umgewandelt (Koch 2006; Calafat et al. 2013).

Warum ist MEHP im Medium und Zelllysate der DMSO-behandelten SGBS-Zellen nachweisbar und warum ist es an Tag 4 in höherer Konzentration messbar als an Tag 14? Alle Adjuvanzen der Zellkulturmedien, welche in Weichmacher-enthaltenden Kunststoffflaschen gelagert werden, sowie die Zellkulturplastikgefäße tragen zusätzliches DEHP und sein Zerfallsprodukt MEHP als Hintergrundkontamination ins gemessene Medium und Zelllysate ein. Insbesondere das fetale Kälberserum (FKS) vermag MEHP einzutragen, denn das im FKS enthaltene Albumin bindet MEHP nachweislich und trägt wesentlich zu den in der HPLC-gekoppelten Massenspektrometrie gemessenen Hintergrundkontaminationen bei (Kessler et al. 2012). FKS ist im Basalmedium enthalten (siehe Abbildung 4), in welchem die Präadipozyten bis zum Tag 0 wachsen. Der Mediumwechsel an Tag 0 entfernt das im FKS an Albumin gebundene MEHP teilweise und der Mediumwechsel an Tag 8 sorgt für eine weitere MEHP-Mengenreduktion, sodass das MEHP an Tag 14 niedriger konzentriert ist als an Tag 4.

## 5.2 DEHP reguliert die Genexpression von Adiponektin herunter

Differenzierte Adipozyten sind der Hauptsyntheseort von Adiponektin (Schäffler et al. 1999; Yadav et al. 2013; Yokota et al. 2002). Die in der *qRT-PCR* untersuchte Genexpression von Adiponektin verhielt sich erwartungsgemäß: Präadipozyten von Tag 0 exprimierten kein Adiponektin. Während der adipogenen Differenzierung nahm die Expression von Adiponektin bis zum Tag 8 zu, um dann bis zum Differenzierungsende des Tages 14 tendenziell rückläufig exprimiert zu werden. Die Transkriptmengen der Tage 8 und 14 unterschieden sich nicht signifikant (siehe Abbildung 9). Auch *Western-Blot*-Daten der Tage 8 und 14 belegten eine höhere Proteinsynthese an Tag 8 als an Tag 14 (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13). Hingegen wurde die Genexpression von Adiponektin durch die DEHP-Exposition direkt beeinflusst. An Tag 4 war nach DEHP-Exposition in der *qRT-PCR* eine signifikante Herunterregulation der Adiponektinexpression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu verzeichnen. Diese Herunterregulation der Genexpression von Adiponektin ist möglicherweise durch eine DEHP-induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies begründet. Während der Entstehung vorliegender Dissertation konnte innerhalb der Arbeitsgruppe in einer Masterarbeit mit dem Titel "Untersuchungen zum oxidativen Stress in SGBS-Zellen nach DEHP-Exposition" durch Scarlett Gebauer nachgewiesen werden, dass das DEHP in SGBS-Zellen von Tag 4 oxidativen Stress verursacht. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass oxidativer Stress in Form von *Reactive Oxygen Species (ROS)* Einfluss auf die Genexpression von Adiponektin nimmt und dazu führt, dass Adiponektin herunterreguliert wird (Matsuda und Shimomura 2014). Durch eine DEHP-Exposition gebildete ROS regulieren in SGBS-Zellen die Genexpression von Adiponektin herunter.

Dieses Ergebnis ist konträr zu jenem von Biemann *et al.* 2014. Sie hatten eine Hochregulation der Adiponektin-Expression während der Behandlung muriner mesenchymaler Stammzellen C3H10T1/2 mit einem hochkonzentrierten Mix aus Bisphenol A, DEHP und Tributylzinn zeigen können. Einerseits könnte die Disruption bei der Maus anders erfolgen als beim Menschen. Andererseits ist die Adiponektin-heraufregulation bei Biemann *et al.* Ergebnis des zeitgleichen Wirkens dreier Disruptoren. So besteht die Möglichkeit, dass die Dysregulation des Adiponektins in jener Studie insbesondere aufgrund des Wirkens von Tributylzinn zusammen mit DEHP erfolgt war (Biemann et al. 2014). Nach Choi *et al.* ist der Transkriptionsfaktor PPAR $\alpha$  imstande, Adiponektin herunterzuregulieren (Choi et al. 2005). PPAR $\alpha$  war jedoch zu keiner Zeit dysreguliert. Bei Biemann *et al.* hatte eine Überexpression des

Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  vorgelegen, welche verantwortlich sein könnte für die in jener Studie ermittelte Dysregulation von Adiponektin.

Weder die *Western-Blots* der Tage 8 und 14 noch der ADIPONEKTIN-*ELISA* von Tag 14 ergaben signifikante Unterschiede in der Adiponektinmenge zwischen einer DEHP-Exposition und den entsprechenden DMSO-Kontrollen. Diese Ergebnisse der Proteinexpression fielen aufgrund der Datenlage zur Genexpression von Adiponektin erwartungsgemäß aus. Von der Transkription eines Gens über die Translation bis hin zur Prozessierung und möglichen Exozytose eines Proteins können mitunter 24 Stunden vergehen, keine 4 Tage. Auf Ebene der Genexpression waren an den Tagen 8 und 14 keine Signifikanzen zu verzeichnen. Folglich gehen die Transkriptmengen der DEHP-Proben und DMSO-Kontrollen konform mit der detektierten Proteinmenge an Tag 8 und 14 in *Western-Blot* und *ELISA*. Eventuell könnten ein ADIPONEKTIN-*Western-Blot* und ein ADIPONEKTIN-*ELISA* von Tag 4 die Signifikanz der *qRT-PCR* von Tag 4 belegen. Auf beides wurde verzichtet, da der Fokus der Arbeit auf Langzeiteffekten lag.

### 5.3 DEHP erhöht die Sekretion von LEPTIN langfristig

Leptin ist ein Adipokin und wird hauptsächlich von Adipozyten synthetisiert (Zhang et al. 1994). Mitchell *et al.* zeigten 1997 anhand der adipogenen Differenzierung von Präadipozyten der Ratte, dass Adipozyten umso mehr Leptin sezernieren, je höher ihr Lipidgehalt ist, folglich je reifer die Adipozyten sind (Mitchell et al. 1997). Adipozyten exprimieren Leptinrezeptoren (Ceddia 2005) mit der Folge, dass Leptin in Fettzellen autokrin wirken kann.

Die *qRT-PCR* des Leptinrezeptors (*LEPR*) (siehe Abbildung 10) ergab eine kaum vorhandene Expression an Tag 0 sowie eine direkte signifikante Herunterregulation des Rezeptors unter DEHP-Exposition an Tag 4. Präadipozyten an Tag 0 synthetisieren aufgrund ihrer noch nicht vorhandenen intrazellulären Fettvesikel noch kein Leptin. Die Expression des *LEPR* wird zu jenem Zeitpunkt physiologischer Weise inhibiert.

Das Ergebnis des LEPTIN-*ELISA* von Tag 14 (siehe Abbildung 7), welches den DEHP-induzierten Langzeiteffekt von mehr sezerniertem Protein LEPTIN belegt, steht in keiner Abhängigkeit zur Herunterregulation des *LEPR* an Tag 4. Zunächst einmal ist das Ergebnis des LEPTIN-*ELISA* konform mit der *FACS*-Analyse (siehe Kapitel 4.5). DEHP wirkt hypertroph und reife SGBS-Adipozyten der Tage 10 (*FACS*) und 14 (*ELISA*) sezernieren nach DEHP-Exposition mehr LEPTIN.

Der durch Frau Dr. Schädlich 2013 durchgeführte Adipogenese-spezifische *Polymerase Chain Reaction Array* hatte keine potenzielle Dysregulation des LEPTIN gezeigt. Jener *Array* war die Arbeitsgrundlage vorliegender Studie gewesen und hatte zur Untersuchung der Adiponektinsignalkaskade geführt (siehe Kapitel 1.1.2). Erst eine mittels *Western-Blot* erwiesene Dysregulation der *AMPK* (siehe Kapitel 3.4.2) bei unveränderter Adiponektin-Sekretion hatte zur Analyse des potenziellen Einflusses von Leptin auf die *AMPK*-Signalkaskade geführt. Tezapsidis *et al.* zufolge aktiviert Leptin das Enzym *AMPK* über den *LEPR* und den *JAK-STAT*-Mechanismus (Tezapsidis *et al.* 2009). Nach Minokoshi *et al.* stimuliert dies die  $\beta$ -Oxidation, zumindest im murinem Skelettmuskel (Minokoshi *et al.* 2002). Wang *et al.* berichten von einer autokrinen Aktivierung der *AMPK* durch Leptin im Fettgewebe sowie von einer Leptin-induzierten Blockierung dieser Reaktion bei Adipositas (Wang *et al.* 2005a). Kurz: Leptin kann die *AMPK* aktivieren und der obesogene DEHP-Effekt geht mit einer Dysregulation von Leptin einher.

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde mit der Genexpressionsanalyse von Leptin begonnen. Mit N=3 Proben konnte eine signifikante Hochregulation von Leptin an Tag 8 ermittelt werden.

Die *AMPK* war unter DEHP-Exposition in der *qRT-PCR* wie der *LEPR* direkt herunterreguliert (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Beides könnte rein spekulativ zurückzuführen sein auf DEHP-induzierte ROS.

#### **5.4 DEHP vermindert die Anzahl des Adiponektinrezeptors 2 an Tag 14**

Die Adiponektinrezeptoren 1 und 2 werden im Fettgewebe exprimiert (Seifi *et al.* 2013a; Yamauchi *et al.* 2007). Die Genexpression des Adiponektinrezeptors 2 (*ADIPOR2*) folgte einem exponentiellen Verlauf und war von der DEHP-Exposition unbeeinflusst (siehe Abbildung 8). Der *Western-Blot* des *ADIPOR2* von Tag 8 konnte die erfolgreiche Proteinsynthese und den ausgebliebenen DEHP-Einfluss unterstützend belegen (siehe Abbildung 12). Der *Western-Blot* des *ADIPOR2* von Tag 14 zeigte jedoch eine nach DEHP-Exposition signifikant verminderte Proteinmenge an *ADIPOR2*. Der *Western-Blot* des *ADIPOR1* von Tag 14 zeigte keinen DEHP-Effekt (siehe Abbildung 13).

Abweichungen von Ergebnissen auf Proteinebene und Genexpressionsebene wie die des Adiponektinrezeptors 2 sind nicht ungewöhnlich und erklärbar durch posttranslationale Modifikationen (Hydroxylierungen, Glykosylierungen) sowie einen veränderten Auf- und Abbau der Proteine. Eventuell ist das Protein *ADIPOR2* nach DEHP-Exposition aufgrund einer gesteigerten Polyubiquitylierung an Tag 14

vermindert. Ein vermehrter Abbau polyubiquitinylierter Proteine in den Zellkompartimenten der Proteasomen nach DEHP-Exposition ist bereits bekannt für das Protein SP3 (*Specificity Protein 3*) in Neuroblastomzellen (Guida et al. 2014). Ferner wiesen Liang et al. Interaktionen zwischen der Phthalsäure und Proteasomen in den Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 nach (Liang et al. 2014). DEHP und MEHP sind Phthalsäureester und könnten auch in SGBS-Zellen den Abbau spezifischer Proteine durch gesteigerte Ubiquitinylierung und Proteasomenaktivität beeinflussen.

### **5.5 DEHP dysreguliert die Genexpression der AMPK, der ACACB und des LEPR**

Die Genexpression von *LEPR*, *AMPK* und *ACACB* war an Tag 4 durch DEHP direkt herunterreguliert. Sobald das DEHP aus dem Medium entfernt wurde, lag keine Dysregulation mehr vor. Der durch Scarlett Gebauer nachgewiesene DEHP-induzierte oxidative Stress an Tag 4 könnte verantwortlich für die direkte Dysregulation der Gene *LEPR*, *AMPK* und *ACACB* sein, auch wenn in der Literatur diesbezüglich noch keine Angaben vorhanden sind. Eine Rezeptorbindung von DEHP an PPAR $\beta/\delta$  oder PPAR $\gamma$ 2, Transkriptionsfaktoren und Schlüsselregulatoren der adipogenen Differenzierung, ist wahrscheinlich, würde jedoch zu einer Hochregulation adipozytärer Gene führen und nicht wie in der vorliegenden Arbeit zu einer Herunterregulation. Lee und Kim zufolge aktiviert PPAR $\beta/\delta$  die AMPK (Lee und Kim 2010). Biemann et al. und Hao et al. zufolge wird PPAR $\gamma$ 2 durch eine DEHP-Exposition während der Induktionsphase der murinen mesenchymalen Stammzelllinie C3H10T1/2 und bei der Maus *in vivo* hochreguliert (Biemann et al. 2014; Hao et al. 2013).

Zur Dysregulation der Gene *AMPK* und *ACACB* muss hinzugefügt werden, dass die Aktivität beider Enzyme vor allem auf Proteinebene reguliert wird. So wird die Aktivität des Enzyms *ACACB* auf vierfache Weise reguliert: Die *ACACB* wird allosterisch durch Citrat stimuliert, allosterisch durch Palmitoyl-CoA und andere langkettige Fettsäuren gehemmt, hormonell durch Adrenalin und Glukagon durch Phosphorylierung inaktiviert sowie durch Insulin über eine Dephosphorylierung aktiviert (Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R 2008). Eine Dysregulation der *ACACB* auf Proteinebene hatte nicht vorgelegen (siehe Abbildung 12).

Das Enzym *AMPK* wird aktiviert durch AMP sowie durch drei verschiedene Adenosinmonophosphatkinasekinasen (*AMPKK*): *LKB1* (*Liver Kinase B1*; Synonym Serin-Threoninkinase 11), *PGC-1 $\alpha$*  (*PPAR $\gamma$ -Coaktivator 1 $\alpha$* ) und *TAK1* (*Transforming Growth Factor  $\beta$ -activated Kinase 1*) (McGee und Hargreaves 2008). Der *Western-Blot*

des Tages 14 zeigte eine gesteigerte Phosphorylierung der AMPK durch DEHP (siehe Abbildung 13). Einerseits könnte eine der drei AMPKK verantwortlich sein für diese Dysregulation auf Proteinebene. Wahrscheinlicher ist jedoch die autokrine Aktivierung der AMPK über Leptin (Wang et al. 2005a), da die Leptin-Sekretion an Tag 14 signifikant erhöht war.

*CPT1*, *GLUT4* und *PPAR $\alpha$*  waren in ihrer Expression nicht verändert (siehe Abbildung 8 bis Abbildung 10). Der Transkriptionsfaktor *PPAR $\alpha$*  ist der Adiponektinsignalkaskade vor- und nachgelagert (Kadowaki und Yamauchi 2005; Choi et al. 2014; Choi et al. 2005), jedoch selten durch DEHP dysreguliert (Hayashi et al. 2014).

### 5.6 DEHP wirkt auf SGBS-Zellen hypertroph

Die *FACS*-Analyse differenzierter Adipozyten von Tag 8 (siehe Abbildung 15 A) ergab zum einen, dass eine DEHP-Exposition die Anzahl terminal differenzierender SGBS-Zellen nicht veränderte. Die SGBS-Zellen waren nach dem Protokoll von Frau Dr. Fischer-Posovszky kultiviert worden (Fischer-Posovszky et al. 2008; Wabitsch et al. 2001) und hatten an Tag 0 eine Konfluenz von 80 % erreicht. Das DEHP hatte die klonale Expansion auch in einer anderen Studie nicht aktivieren können und keine Hyperplasie hervorgerufen (Otto und Lane 2005). Dies gilt für humane wie für murine Präadipozyten. Im murinen Modell der 3T3-L1-Zellen hat das DEHP ebenfalls keinen Effekt auf die Anzahl differenzierter Adipozyten (Hao et al. 2013).

Zum anderen konnte im *FACS* durch die *Nile Red*-Fluoreszenzintensität der obesogene Effekt des DEHP, bekannt aus *in vitro*-Studien an murinen mesenchymalen Stammzellen und aus murinen Tierversuchen (Biemann et al. 2014; Schmidt et al. 2012; Hao et al. 2012), bestätigt werden (siehe Abbildung 15 B). Die DEHP-Exposition bewirkte eine Hypertrophie an Tag 8. Dieser hypertrophe Effekt fettreicherer Zellen korreliert sehr gut mit der erhöhten Menge an Leptin im *ELISA* von Tag 14, denn generell verhalten sich Leptinspiegel direkt proportional zum Fettgehalt (siehe Kapitel 1.3.2). Der hypertrophe Effekt korreliert auch gut mit der gesteigerten Aktivität der AMPK, welche durch die erhöhte AMPK-Phosphorylierung an Tag 14 im *Western-Blot* erwiesen ist. Im Fettgewebe von Ratten führt Leptin autokrin zu einer gesteigerten Aktivität der AMPK (Wang et al. 2005a). Das DEHP führt schlussendlich entweder zu einer erhöhten Speicherung von Fett in SGBS-Zellen, zu einer erhöhten *de novo*-Lipogenese oder zu einer gestörten Lipolyse. Da es bei *ACACB* und *CPT1* auf Ebene der Genexpression an Tag 8 und 14 sowie bei der *ACACB* auf Proteinebene an Tag 8 keinen DEHP-Einfluss gab, scheint eine verminderte  $\beta$ -Oxidation für den obesogenen Effekt nicht ursächlich zu sein.

### 5.7 DEHP führt zu mehr PERILIPIN und lässt GLUT4 unbeeinflusst

Die Immunfluoreszenzanalyse des Fettvesikelhüllproteins PERILIPIN an Tag 10 (siehe Abbildung 16) war auf die FACS-Analyse gefolgt. Innerhalb der Arbeitsgruppe war ein *Western-Blot* von PERILIPIN von Tag 4 durchgeführt worden, in welchem PERILIPIN nach identischer DEHP-Exposition signifikant erhöht war. Jenes Ergebnis unterstützt den hypertrophen DEHP-Effekt.

Die Immunfluoreszenzanalyse von GLUT4 an Tag 10 zeigte keinen optisch sichtbaren DEHP-Effekt. Die Lokalisation und Aktivität von GLUT4 von DEHP-exponierten SGBS-Zellen und den DMSO-Kontrollen unterschieden sich nicht. Dies geht einher mit den Genexpressionsanalysen von *GLUT4* und Adiponektin. Die Gene *GLUT4* und Adiponektin waren im Zeitraum von Tag 8 bis Tag 14 von DEHP unbeeinflusst exprimiert worden. Hätte in diesem Zeitraum eine Dysregulation von Adiponektin vorgelegen, so wären Genexpression und Aktivität von GLUT4 womöglich auch dysreguliert gewesen. Denn zumindest in murinen 3T3-L1-Fibroblasten erhöht Adiponektin die zelluläre Insulinsensitivität durch eine gesteigerte Genexpression von *GLUT4* und Rekrutierung des Glukosetransporters zur Plasmamembran (Fu et al. 2005).

### 5.8 Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist festzustellen,

- dass eine frühe Exposition mit DEHP [50µg/ml] eine endokrine Disruption der humanen Adipogenese *in vitro* darstellt,
- dass DEHP ein obesogenes Potenzial im humanen Zellmodell hat,
- dass DEHP von humanen Präadipozyten der SGBS-Zellen aufgenommen und in MEHP umgewandelt wird,
- dass Adiponektin und Teile seiner Signalkaskade durch die DEHP-Exposition dysreguliert werden,
- dass die Leptinsekretion durch eine DEHP-Exposition langfristig erhöht wird und
- dass DEHP im Zeitfenster der Induktion der humanen adipogenen Differenzierung bei SGBS-Zellen hypertroph wirkt.

Hinter dem im *in vitro*-Modell belegten obesogenen Potenzial des DEHP steht die Gesundheitsgefährdung einer Exposition mit DEHP *in vivo*. Die Aufzählung obesogener Faktoren bestehend aus Bewegungsmangel, Überernährung und Stress sollte um die perinatale endokrine Disruption durch DEHP ergänzt werden. Ob *in utero*,

postnatal oder iatrogen, eine Exposition mit dem Weichmacher DEHP könnte mitverantwortlich dafür sein, dass jeder dritte Mensch der Welt übergewichtig ist.

## 5.9 Ausblick

Die vorliegende *in vitro*-Studie befasste sich mit der Fragestellung, welchen Einfluss der Weichmacher DEHP auf die Adipogenese humaner Präadipozyten im Zeitfenster der Induktion der Differenzierung hat. Die verwendeten SGBS-Zellen wurden in der 6. bis 17. Generation erfolgreich zu reifen Adipozyten differenziert und auf eine Dysregulation der Adiponektinsignalkaskade hin untersucht.

Für weitere Untersuchungen ist zunächst Leptin interessant. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde bereits mit der Genexpressionsanalyse begonnen und mit N=3 Proben konnte bereits eine signifikante Hochregulation von Leptin an Tag 8 ermittelt werden.

Ferner ist eine Untersuchung des Glukokortikoidrezeptors unter DEHP-Exposition geboten. Sargis *et al.* zufolge aktiviert eine dem DEHP sehr ähnliche Substanz, das Dicyclohexylphthalat (DCHP), jenen Rezeptor und hat einen obesogenen Effekt (Sargis *et al.* 2010).

Beruhet das obesogene DEHP-Potenzial auf einer Förderung der *de novo*-Lipogenese, der Neusynthese von Triacylglycerin (TAG)? Um dies zu erörtern, könnten folgende Schlüsselenzyme mit den in vorliegender Studie genutzten biochemischen Methoden untersucht werden: die Acyl-CoA-Synthetasen, welche sich in ihrer Spezifität für bestimmte Fettsäuren unterscheiden und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert sind, die Glycerin-3-phosphat-Acyltransferasen, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der TAG-Synthese von Glycerin-3-phosphat zu Lysophosphatidsäure katalysieren und ebenfalls im ER und in der äußeren mitochondrialen Membran vorliegen, die Phosphatidsäure-Phosphatase, welche die Synthese von 1,2-Diacylglycerinen katalysiert, sowie die mitochondriale Pyruvat-Dehydrogenase, welche das zur TAG-Synthese benötigte Acetyl-CoA synthetisiert (Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R 2008). Überdies zeigten Ellero-Simatos *et al.*, dass MEHP die *de novo*-Lipogenese durch eine Hochregulation der PEPCK auf Proteinebene stimuliert (Ellero-Simatos *et al.* 2011). Die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) ist ein Enzym der Glyceroneogenese und das Glycerin-3-phosphat wiederum Substrat der TAG-Synthese.

Die *Western-Blots* vom Leptinrezeptor, Adiponektinrezeptor 1 und Glukose-transporter Typ 4 sowie die vorgestellten *Western-Blot*-Ergebnisse des Tages 14 könnten mit höherer Versuchszahl wiederholt werden. Überdies könnte der in der *FACS*-Analyse ermittelte obesogene Effekt durch eine Messung des Triglyzeridgehaltes belegt werden, zum Beispiel mittels *HPLC*-gekoppelter Massenspektrometrie. Zu guter Letzt könnte das DEHP-Expositionsfenster wieder auf den gesamten Zellkulturzeitraum von 14 Tagen erweitert werden, da die Exposition des Menschen gegenüber dem DEHP kontinuierlich ist.

## 6 Zusammenfassung

Übergewicht, Adipositas und ihre Folgeerkrankungen gehören zu den größten gesundheitlichen Herausforderungen im 21. Jahrhundert. Umweltschadstoffe wie die in großen Mengen produzierten Phthalate bergen ein obesogenes Potenzial. So stehen der Weichmacher Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) und sein Metabolit Mono(2-ethylhexyl)phthalat (MEHP) unter Verdacht, die Adipogenese des Menschen während distinkter ontogenetischer Zeitfenster zu stimulieren. Zellen der humanen Präadipozytenlinie Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom (SGBS) wurden in einer 14-tägigen Zellkultur zu reifen Adipozyten differenziert. Während der Induktionsphase der Differenzierung von Tag 0 bis Tag 4 wurden sie DEHP gelöst im Induktionsmedium in einer umweltrelevanten Konzentration von 50 µg/ml ausgesetzt. Die Hydrolyse von DEHP zu MEHP wurde mittels *HPLC*-gekoppelter Massenspektrometrie nachgewiesen. Die Dysregulation der Adiponektinsignalkaskade wurde mittels *qRT-PCR*, *Western-Blot* und *ELISA* analysiert. Der Frage nach einer DEHP-induzierten Hypertrophie oder Hyperplasie wurde mittels *FACS* nachgegangen. Die intrazelluläre Lage von Perilipin und GLUT4 am Tag 10 wurde mittels Immunfluoreszenz ermittelt.

Die *qRT-PCR* ergab eine Dysregulation der Gene Adiponektin, Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (*AMPK*) und Acetyl-CoA-Carboxylase β (*ACACB*) an Tag 4. Die *ELISA* der Medienüberstände von Tag 14 ergaben eine langfristig erhöhte Proteinsynthese und -sekretion von LEPTIN, jedoch nicht von ADIPONEKTIN. Die *FACS*-Analyse am Tag 8 ergab eine signifikant erhöhte Fetteinlagerung in den DEHP-exponierten Adipozyten. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine DEHP-Exposition in umweltrelevanter Konzentration von humanen SGBS-Zellen während der Induktionsphase der Differenzierung ein obesogenes Potenzial aufweist.

## 7 Literaturverzeichnis

Abdullah, Asnawi; Peeters, Anna; Courten, Maximilian de; Stoelwinder, Johannes (2010): The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. In: *Diabetes Res. Clin. Pract.* 89 (3), S. 309–319. DOI: 10.1016/j.diabres.2010.04.012.

Atkinson, Laura L.; Fischer, Melanie A.; Lopaschuk, Gary D. (2002): Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis. In: *J. Biol. Chem.* 277 (33), S. 29424–29430. DOI: 10.1074/jbc.M203813200.

Baillie-Hamilton, Paula F. (2002): Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. In: *J Altern Complement Med* 8 (2), S. 185–192. DOI: 10.1089/107555302317371479.

Barker (2012): Sir Richard Doll Lecture. Developmental origins of chronic disease. In: *Public Health* 126 (3), S. 185–189. DOI: 10.1016/j.puhe.2011.11.014.

Bergman, R. N.; Mittelman, S. D. (1998): Central role of the adipocyte in insulin resistance. In: *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9 (2-4), S. 205–221. DOI: 10.1515/JBCPP.1998.9.2-4.205.

Biemann, Ronald; Fischer, Bernd; Navarrete Santos, Anne (2014): Adipogenic Effects of a Combination of the Endocrine-Disrupting Compounds Bisphenol A, Diethylhexylphthalate, and Tributyltin. In: *Obes Facts* 7 (1), S. 48–56. DOI: 10.1159/000358913.

Biemann, Ronald; Navarrete Santos, Anne; Navarrete Santos, Alexander; Riemann, Dagmar; Knelangen, Julia; Bluher, Matthias et al. (2012): Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows. In: *Biochem Biophys Res Commun* 417 (2), S. 747–752. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.028.

Boden-Albala, B.; Sacco, R. L. (2000): Lifestyle factors and stroke risk: exercise, alcohol, diet, obesity, smoking, drug use, and stress. In: *Curr Atheroscler Rep* 2 (2), S. 160–166. DOI: 10.1007/s11883-000-0111-3.

Bogers, Rik P.; Bemelmans, Wanda J E; Hoogenveen, Rudolf T.; Boshuizen, Hendriek C.; Woodward, Mark; Knekt, Paul et al. (2007): Association of overweight with increased risk of coronary heart disease partly independent of blood pressure and cholesterol levels: a meta-analysis of 21 cohort studies including more than 300 000

persons. In: *Arch. Intern. Med.* 167 (16), S. 1720–1728. DOI: 10.1001/archinte.167.16.1720.

Calafat, Antonia M.; Koch, Holger M.; Swan, Shanna H.; Hauser, Russ; Goldman, Lynn R.; Lanphear, Bruce P. et al. (2013): Misuse of blood serum to assess exposure to bisphenol A and phthalates. In: *Breast Cancer Res.* 15 (5), S. 403. DOI: 10.1186/bcr3494.

Castle, John C.; Hara, Yoshikazu; Raymond, Christopher K.; Garrett-Engele, Philip; Ohwaki, Kenji; Kan, Zhengyan et al. (2009): ACC2 is expressed at high levels in human white adipose and has an isoform with a novel N-terminus [corrected]. In: *PLoS ONE* 4 (2), S. e4369. DOI: 10.1371/journal.pone.0004369.

Ceddia, R. B. (2005): Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. In: *Int J Obes (Lond)* 29 (10), S. 1175–1183. DOI: 10.1038/sj.ijo.0803025.

Choi, K. C.; Ryu, O. H.; Lee, K. W.; Kim, H. Y.; Seo, J. A.; Kim, S. G. et al. (2005): Effect of PPAR-alpha and -gamma agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and TNF-alpha in visceral fat of OLETF rats. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336 (3), S. 747–753. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.08.203.

Choi, W. J.; Kwon, H. J.; Hong, S.; Lim, W. R.; Kim, H.; Kim, J. et al. (2014): Potential nonmonotonous association between di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposure and atopic dermatitis in Korean children. In: *Br. J. Dermatol.* DOI: 10.1111/bjd.12953.

Cristancho, Ana G.; Lazar, Mitchell A. (2011): Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (11), S. 722–734. DOI: 10.1038/nrm3198.

Decherf, Stéphanie; Demeneix, Barbara A. (2011): The obesogen hypothesis: a shift of focus from the periphery to the hypothalamus. In: *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 14 (5-7), S. 423–448. DOI: 10.1080/10937404.2011.578561.

Dehlendorff, Christian; Andersen, Klaus K.; Olsen, Tom S. (2014): Body Mass Index and Death by Stroke: No Obesity Paradox. In: *JAMA Neurol.* DOI: 10.1001/jamaneurol.2014.1017.

Dewalque, Lucas; Charlier, Corinne; Pirard, Catherine (2014): Estimated daily intake and cumulative risk assessment of phthalate diesters in a Belgian general population. In: *Toxicol. Lett.* DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.06.028.

dpa (2014): Jeder Dritte weltweit ist übergewichtig. Eine neue Studie zeigt, dass die Zahl der übergewichtigen Menschen weltweit in den vergangenen Jahrzehnten

drastisch gestiegen ist. Adipositas. In: *ÄrzteZeitung* 2014, 30.05.2014. Online verfügbar unter

<http://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/adipositas/?sid=862048>, zuletzt geprüft am 11.05.2015 um 16:20 Uhr.

Dua, A.; Hennes, M. I.; Hoffmann, R. G.; Maas, D. L.; Krakower, G. R.; Sonnenberg, G. E.; Kissebah, A. H. (1996): Leptin: a significant indicator of total body fat but not of visceral fat and insulin insensitivity in African-American women. In: *Diabetes* 45 (11), S. 1635–1637. DOI: 10.2337/diab.45.11.1635.

Ellero-Simatos, Sandrine; Claus, Sandrine P.; Benelli, Chantal; Forest, Claude; Letourneur, Franck; Cagnard, Nicolas et al. (2011): Combined transcriptomic-(1)H NMR metabonomic study reveals that monoethylhexyl phthalate stimulates adipogenesis and glyceroneogenesis in human adipocytes. In: *J. Proteome Res.* 10 (12), S. 5493–5502. DOI: 10.1021/pr200765v.

Fall, Caroline; Osmond, Clive (2013): Commentary: The developmental origins of health and disease: an appreciation of the life and work of Professor David J.P. Barker, 1938-2013. In: *Int J Epidemiol* 42 (5), S. 1231–1232. DOI: 10.1093/ije/dyt207.

Feige, Jérôme N.; Gelman, Laurent; Rossi, Daniel; Zoete, Vincent; Métivier, Raphaël; Tudor, Cicerone et al. (2007): The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. In: *J. Biol. Chem.* 282 (26), S. 19152–19166. DOI: 10.1074/jbc.M702724200.

Ferguson, Kelly K.; McElrath, Thomas F.; Ko, Yi-An; Mukherjee, Bhramar; Meeker, John D. (2014): Variability in urinary phthalate metabolite levels across pregnancy and sensitive windows of exposure for the risk of preterm birth. In: *Environ Int* 70, S. 118–124. DOI: 10.1016/j.envint.2014.05.016.

Fischer-Posovszky, Pamela; Newell, Felicity S.; Wabitsch, Martin; Tornqvist, Hans E. (2008): Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology. In: *Obes Facts* 1 (4), S. 184–189. DOI: 10.1159/000145784.

Frederiksen, Hanne; Skakkebaek, Niels E.; Andersson, Anna-Maria (2007): Metabolism of phthalates in humans. In: *Mol Nutr Food Res* 51 (7), S. 899–911. DOI: 10.1002/mnfr.200600243.

Fromme, H.; Lahrz, T.; Kraft, M.; Fembacher, L.; Dietrich, S.; Sievering, S. et al. (2013): Phthalates in German daycare centers: occurrence in air and dust and the

- excretion of their metabolites by children (LUPE 3). In: *Environ Int* 61, S. 64–72. DOI: 10.1016/j.envint.2013.09.006.
- Fu, Yuchang; Luo, Nanlan; Klein, Richard L.; Garvey, W. Timothy (2005): Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. In: *J. Lipid Res.* 46 (7), S. 1369–1379. DOI: 10.1194/jlr.M400373-JLR200.
- Gelsinger, Carmen; Tschoner, Alexander; Kaser, Susanne; Ebenbichler, Christoph F. (2010): Adipokine update – neue Moleküle, neue Funktionen. In: *Wien Med Wochenschr* 160 (15-16), S. 377–390. DOI: 10.1007/s10354-010-0781-6.
- Gillum, Nikki; Karabekian, Zaruhi; Swift, Luther M.; Brown, Ronald P.; Kay, Matthew W.; Sarvazyan, Narine (2009): Clinically relevant concentrations of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) uncouple cardiac syncytium. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236 (1), S. 25–38. DOI: 10.1016/j.taap.2008.12.027.
- Gray, L. E.; Ostby, J.; Furr, J.; Price, M.; Veeramachaneni, D. N.; Parks, L. (2000): Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. In: *Toxicol. Sci.* 58 (2), S. 350–365. DOI: 10.1093/toxsci/58.2.350.
- Grün, Felix; Blumberg, Bruce (2006): Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. In: *Endocrinology* 147 (6 Suppl), S. S50-5. DOI: 10.1210/en.2005-1129.
- Grün, Felix; Blumberg, Bruce (2007): Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. In: *Rev Endocr Metab Disord* 8 (2), S. 161–171. DOI: 10.1007/s11154-007-9049-x.
- Guida, Natascia; Laudati, Giusy; Galgani, Mario; Santopaolo, Marianna; Montuori, Paolo; Triassi, Maria et al. (2014): Histone deacetylase 4 promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of Sp3 in SH-SY5Y cells treated with di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), determining neuronal death. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 280 (1), S. 190–198. DOI: 10.1016/j.taap.2014.07.014.
- Hamilton, Mark P.; Gore, M. Odette; Ayers, Colby R.; Xinyu Wu; McGuire, Darren K.; Scherer, Philipp E. (2011): Adiponectin and cardiovascular risk profile in patients with type 2 diabetes mellitus: parameters associated with adiponectin complex distribution. In: *Diab Vasc Dis Res* 8 (3), S. 190–194. DOI: 10.1177/1479164111407784.
- Hanioka, Nobumitsu; Takahara, Yuusuke; Takahara, Yuka; Tanaka-Kagawa, Toshiko; Jinno, Hideto; Narimatsu, Shizuo (2012): Hydrolysis of di-n-butyl phthalate, butylbenzyl

- phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in human liver microsomes. In: *Chemosphere* 89 (9), S. 1112–1117. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.05.095.
- Hao, Chanjuan; Cheng, Xuejia; Guo, Jian; Xia, Hongfei; Ma, Xu (2013): Perinatal exposure to diethyl-hexyl-phthalate induces obesity in mice. In: *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 5, S. 725–733. DOI: 10.2741/E653.
- Hao, Chanjuan; Cheng, Xuejia; Xia, Hongfei; Ma, Xu (2012): The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. In: *Biosci. Rep.* 32 (6), S. 619–629. DOI: 10.1042/BSR20120042.
- Hardie, D. Grahame; Ross, Fiona A.; Hawley, Simon A. (2012): AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (4), S. 251–262. DOI: 10.1038/nrm3311.
- Hatch, Elizabeth E.; Nelson, Jessica W.; Qureshi, M. Mustafa; Weinberg, Janice; Moore, Lynn L.; Singer, Martha; Webster, Thomas F. (2008): Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999-2002. In: *Environ Health* 7, S. 27. DOI: 10.1186/1476-069X-7-27.
- Hauser, R.; Calafat, A. M. (2005): Phthalates and human health. In: *Occup Environ Med* 62 (11), S. 806–818. DOI: 10.1136/oem.2004.017590.
- Hayashi, Yumi; Ito, Yuki; Nakajima, Tamie (2014): Effects of exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate during fetal period on next generation. In: *Nihon Eiseigaku Zasshi* 69 (2), S. 86–91. DOI: 10.1265/jjh.69.86.
- Heindel, Jerrold J.; Vom Saal, Frederick (2009): Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. In: *Mol. Cell. Endocrinol.* 304 (1-2), S. 90–96. DOI: 10.1016/j.mce.2009.02.025.
- Heinemeyer, Gerhard; Sommerfeld, Christine; Springer, Andrea; Heiland, Astrid; Lindtner, Oliver; Greiner, Matthias et al. (2013): Estimation of dietary intake of bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by consumption of food in the German population. In: *Int J Hyg Environ Health* 216 (4), S. 472–480. DOI: 10.1016/j.ijheh.2013.01.001.
- Howe, Laura D.; Chaturvedi, Nishi; Lawlor, Debbie A.; Ferreira, Diana L S; Fraser, Abigail; Davey Smith, George et al. (2014): Rapid increases in infant adiposity and overweight/obesity in childhood are associated with higher central and brachial blood pressure in early adulthood. In: *J. Hypertens.* DOI: 10.1097/HJH.0000000000000269.

- Hurst, Christopher H.; Waxman, David J. (2003): Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. In: *Toxicol. Sci.* 74 (2), S. 297–308. DOI: 10.1093/toxsci/kfg145.
- Inoue, Koichi; Kawaguchi, Migaku; Yamanaka, Retsuji; Higuchi, Tae; Ito, Rie; Saito, Koichi; Nakazawa, Hiroyuki (2005): Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. In: *Clin. Chim. Acta* 358 (1-2), S. 159–166. DOI: 10.1016/j.cccn.2005.02.019.
- Janesick, Amanda; Blumberg, Bruce (2011): Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. In: *Birth Defects Res. C Embryo Today* 93 (1), S. 34–50. DOI: 10.1002/bdrc.20197.
- Jarfelt, Kirsten; Dalgaard, Majken; Hass, Ulla; Borch, Julie; Jacobsen, Helene; Ladefoged, Ole (2005): Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of di(2-ethylhexyl) phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate. In: *Reprod. Toxicol.* 19 (4), S. 505–515. DOI: 10.1016/j.reprotox.2004.11.005.
- Jéquier, Eric (2002): Leptin signaling, adiposity, and energy balance. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967, S. 379–388. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04293.x.
- Kadowaki, Takashi; Yamauchi, Toshimasa (2005): Adiponectin and adiponectin receptors. In: *Endocr. Rev.* 26 (3), S. 439–451. DOI: 10.1210/er.2005-0005.
- Kay, Vanessa R.; Bloom, Michael S.; Foster, Warren G. (2014): Reproductive and developmental effects of phthalate diesters in males. In: *Crit. Rev. Toxicol.* 44 (6), S. 467–498. DOI: 10.3109/10408444.2013.875983.
- Kessler, Winfried; Numtip, Wanwiwa; Völkel, Wolfgang; Seckin, Elcim; Csanády, György A.; Pütz, Christian et al. (2012): Kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate in blood and of DEHP metabolites in urine of male volunteers after single ingestion of ring-deuterated DEHP. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 264 (2), S. 284–291. DOI: 10.1016/j.taap.2012.08.009.
- Kitahara, Cari M.; Flint, Alan J.; Berrington de Gonzalez, Amy; Bernstein, Leslie; Brotzman, Michelle; MacInnis, Robert J. et al. (2014): Association between Class III Obesity (BMI of 40-59 kg/m<sup>2</sup>) and Mortality: A Pooled Analysis of 20 Prospective Studies. In: *PLoS Med.* 11 (7), S. e1001673. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001673.
- Koch, H. M.; Preuss, R.; Angerer, J. (2006): Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. In: *Int. J. Androl.* 29 (1), S. 155-65; discussion 181-5. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2005.00607.x.

- Koch, Holger (2006): Untersuchung der Di(-2-ethylhexyl)phthalat (DEHP)-Belastung der Allgemeinbevölkerung – Durchführung eines Human-Biomonitorings, S. S. 14. Online verfügbar unter <https://opus4.kobv.de/opus4-fau/files/393/HolgerMKochDissertation.pdf>, zuletzt geprüft am 12.05.2015 um 11:25Uhr.
- Koch, Holger M.; Angerer, Jürgen; Drexler, Hans; Eckstein, Reinhold; Weisbach, Volker (2005): Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) exposure of voluntary plasma and platelet donors. In: *Int J Hyg Environ Health* 208 (6), S. 489–498. DOI: 10.1016/j.ijheh.2005.07.001.
- Kranich, Selma K.; Frederiksen, Hanne; Andersson, Anna-Maria; Jørgensen, Niels (2014): Estimated Daily Intake and Hazard Quotients and Indices of Phthalate Diesters for Young Danish Men. In: *Environ. Sci. Technol.* 48 (1), S. 706–712. DOI: 10.1021/es402569k.
- Kuzawa, C. W. (1998): Adipose tissue in human infancy and childhood: an evolutionary perspective. In: *Am. J. Phys. Anthropol. Suppl* 27, S. 177–209. DOI: 10.1002/(SICI)1096-8644(1998)107:27+<177::AID-AJPA7>3.0.CO;2-B.
- Latini, G.; Felice, C. de; Presta, G.; Del Vecchio, A.; Paris, I.; Ruggieri, F.; Mazzeo, P. (2003a): Exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate in humans during pregnancy. A preliminary report. In: *Biol. Neonate* 83 (1), S. 22–24. DOI: 10.1159/000067012.
- Latini, Giuseppe; Felice, Claudio de; Presta, Giuseppe; Del Vecchio, Antonio; Paris, Irma; Ruggieri, Fabrizio; Mazzeo, Pietro (2003b): In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. In: *Environ. Health Perspect.* 111 (14), S. 1783–1785. DOI: 10.1289/ehp.6202.
- Lee, J. J.; Moon, Y. A.; Ha, J. H.; Yoon, D. J.; Ahn, Y. H.; Kim, K. S. (2001): Cloning of human acetyl-CoA carboxylase beta promoter and its regulation by muscle regulatory factors. In: *J. Biol. Chem.* 276 (4), S. 2576–2585. DOI: 10.1074/jbc.M007002200.
- Lee, Woo Hyung; Kim, Sang Geon (2010): AMPK-Dependent Metabolic Regulation by PPAR Agonists. In: *PPAR research 2010*. DOI: 10.1155/2010/549101.
- Liang, Shih-Shin; Wang, Tsu-Nai; Tsai, Eing-Mei (2014): Analysis of Protein-Protein Interactions in MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines Using Phthalic Acid Chemical. In: *International journal of molecular sciences* 15 (11), S. 20770–20788. DOI: 10.3390/ijms151120770.
- Liu, Qingqing; Gauthier, Marie-Soleil; Sun, Lei; Ruderman, Neil; Lodish, Harvey (2010): Activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway by adiponectin and

- insulin in mouse adipocytes: requirement of acyl-CoA synthetases FATP1 and Acs11 and association with an elevation in AMP/ATP ratio. In: *FASEB J.* 24 (11), S. 4229–4239. DOI: 10.1096/fj.10-159723.
- Main, Katharina M.; Mortensen, Gerda K.; Kaleva, Marko M.; Boisen, Kirsten A.; Damgaard, Ida N.; Chellakooty, Marla et al. (2006): Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. In: *Environ. Health Perspect.* 114 (2), S. 270–276. DOI: 10.1289/ehp.8075.
- Martinez-Arguelles, D. B.; Campioli, E.; Culty, M.; Zirkin, B. R.; Papadopoulos, V. (2013): Fetal origin of endocrine dysfunction in the adult: The phthalate model. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 137, S. 5–17. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2013.01.007.
- Matsuda, Morihiro; Shimomura, Ichihiro (2014): Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases. In: *Rev Endocr Metab Disord* 15 (1), S. 1–10. DOI: 10.1007/s11154-013-9271-7.
- McGee, Sean L.; Hargreaves, Mark (2008): AMPK and transcriptional regulation. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, S. 3022–3033. DOI: 10.2741/2907.
- Mensink; Schienkiewitz; Haftenberger; Lampert; Ziese; Scheidt-Nave (2013): Übergewicht und Adipositas in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). In: *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 56 (5-6), S. 786–794. DOI: 10.1007/s00103-012-1656-3.
- Minokoshi, Yasuhiko; Alquier, Thierry; Furukawa, Noboru; Kim, Yong-Bum; Lee, Anna; Xue, Bingzhong et al. (2004): AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. In: *Nature* 428 (6982), S. 569–574. DOI: 10.1038/nature02440.
- Minokoshi, Yasuhiko; Kim, Young-Bum; Peroni, Odile D.; Fryer, Lee G D; Müller, Corinna; Carling, David; Kahn, Barbara B. (2002): Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. In: *Nature* 415 (6869), S. 339–343. DOI: 10.1038/415339a.
- Mitchell, S. E.; Rees, W. D.; Hardie, L. J.; Hoggard, N.; Tadayyon, M.; Arch, J. R.; Trayhurn, P. (1997): ob gene expression and secretion of leptin following differentiation

- of rat preadipocytes to adipocytes in primary culture. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230 (2), S. 360–364. DOI: 10.1006/bbrc.1996.5964.
- Moreno-Navarrete, José María; Ortega, Francisco; Moreno, María; Ricart, Wifredo; Fernández-Real, José Manuel (2014): Fine-tuned iron availability is essential to achieve optimal adipocyte differentiation and mitochondrial biogenesis. In: *Diabetologia*. DOI: 10.1007/s00125-014-3298-5.
- Morris, David L.; Cho, Kae Won; Rui, Liangyou (2010): Critical role of the Src homology 2 (SH2) domain of neuronal SH2B1 in the regulation of body weight and glucose homeostasis in mice. In: *Endocrinology* 151 (8), S. 3643–3651. DOI: 10.1210/en.2010-0254.
- Münch et al. (2011): Weichmacherexposition über Blutproduktgabe in der Herzchirurgie. Hg. v. Herzchirurgische Klinik, Leitung Kardiotechnik. Universitätsklinikum Erlangen. Online verfügbar unter <http://www.dgfk.de/content/kardiotechnikoriginalausgaben/111/Muench.pdf>, zuletzt geprüft am 06.08.2014 um 06:54 Uhr.
- NCBI Blast (2014). Online verfügbar unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, zuletzt geprüft am 15.08.2014 um 07:12 Uhr.
- NCBI Nucleotide (2014). Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>, zuletzt geprüft am 15.08.2014 um 07:13 Uhr.
- Newbold, Retha R.; Jefferson, Wendy N.; Padilla-Banks, Elizabeth (2009a): Prenatal exposure to bisphenol a at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. In: *Environ. Health Perspect.* 117 (6), S. 879–885. DOI: 10.1289/ehp.0800045.
- Newbold, Retha R.; Padilla-Banks, Elizabeth; Jefferson, Wendy N. (2009b): Environmental estrogens and obesity. In: *Mol. Cell. Endocrinol.* 304 (1-2), S. 84–89. DOI: 10.1016/j.mce.2009.02.024.
- Ng, Marie; Fleming, Tom; Robinson, Margaret; Thomson, Blake; Graetz, Nicholas; Margono, Christopher et al. (2014): Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. In: *Lancet*. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8.
- Obregon, Maria-Jesus (2008): Thyroid hormone and adipocyte differentiation. In: *Thyroid* 18 (2), S. 185–195. DOI: 10.1089/thy.2007.0254.

- OECD (2013): Health at a Glance 2013. In: OECD Publishing. DOI: 10.1787/health\_glance-2013-en.
- Otto, Tamara C.; Lane, M. Daniel (2005): Adipose development: from stem cell to adipocyte. In: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40 (4), S. 229–242. DOI: 10.1080/10409230591008189.
- Parker-Duffen, Jennifer L.; Nakamura, Kazuto; Silver, Marcy; Kikuchi, Ryosuke; Tigges, Ulrich; Yoshida, Sumiko et al. (2013): T-cadherin is essential for adiponectin-mediated revascularization. In: *J. Biol. Chem.* 288 (34), S. 24886–24897. DOI: 10.1074/jbc.M113.454835.
- Pergola, Giovanni de; Silvestris, Franco (2013): Obesity as a major risk factor for cancer. In: *J Obes* 2013, S. 291546. DOI: 10.1155/2013/291546.
- Philippat, Claire; Botton, Jérémie; Calafat, Antonia M.; Ye, Xiaoyun; Charles, Marie-Aline; Slama, Rémy (2014): Prenatal exposure to phenols and growth in boys. In: *Epidemiology* 25 (5), S. 625–635. DOI: 10.1097/EDE.0000000000000132.
- Rasmussen, Maria S.; Lihn, Aina S.; Pedersen, Steen B.; Bruun, Jens M.; Rasmussen, Mads; Richelsen, Bjørn (2006): Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. In: *Obesity (Silver Spring)* 14 (1), S. 28–35. DOI: 10.1038/oby.2006.5.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Biochemie. 50 Tabellen. 2., aktualisierte Aufl.* Stuttgart: Thieme (Duale Reihe), 2008, S. 232.
- Rigamonti, Alessandra; Brennand, Kristen; Lau, Frank; Cowan, Chad A. (2011): Rapid cellular turnover in adipose tissue. In: *PLoS ONE* 6 (3), S. e17637. DOI: 10.1371/journal.pone.0017637.
- Rosen, Evan D.; MacDougald, Ormond A. (2006): Adipocyte differentiation from the inside out. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (12), S. 885–896. DOI: 10.1038/nrm2066.
- Sargis, Robert M.; Johnson, Daniel N.; Choudhury, Rashikh A.; Brady, Matthew J. (2010): Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. In: *Obesity (Silver Spring)* 18 (7), S. 1283–1288. DOI: 10.1038/oby.2009.419.
- Schaedlich, Kristina; Knelangen, Julia M.; Navarrete Santos, Alexander; Fischer, Bernd; Navarrete Santos, Anne (2010): A simple method to sort ESC-derived adipocytes. In: *Cytometry A* 77 (10), S. 990–995. DOI: 10.1002/cyto.a.20953.

- Schäffler, A.; Orsó, E.; Palitzsch, K. D.; Büchler, C.; Drobnik, W.; Fürst, A. et al. (1999): The human apM-1, an adipocyte-specific gene linked to the family of TNF's and to genes expressed in activated T cells, is mapped to chromosome 1q21.3-q23, a susceptibility locus identified for familial combined hyperlipidaemia (FCH). In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260 (2), S. 416–425. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0865.
- Schmidt, Juliane-Susanne; Schaedlich, Kristina; Fiandanese, Nadia; Pocar, Paola; Fischer, Bernd (2012): Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on female fertility and adipogenesis in C3H/N mice. In: *Environ Health Perspect* 120 (8), S. 1123–1129. DOI: 10.1289/ehp.1104016.
- Seifi, Samira; Nazifi, Saeed; Tabandeh, Mohammad Reza; Saeb, Mehdi (2013a): AdipoR1 and AdipoR2 gene expression are regulated by thyroid hormones in adipose tissue. In: *Mol Cell Biochem* 377 (1-2), S. 55–63. DOI: 10.1007/s11010-013-1570-5.
- Seifi, Samira; Nazifi, Saeed; Tabandeh, Mohammad Reza; Saeb, Mehdi (2013b): AdipoR1 and AdipoR2 gene expression are regulated by thyroid hormones in adipose tissue. In: *Mol Cell Biochem* 377 (1-2), S. 55–63. DOI: 10.1007/s11010-013-1570-5.
- Shehzad, Adeeb; Iqbal, Waqas; Shehzad, Omer; Lee, Young Sup (2012): Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. In: *Hormones (Athens)* 11 (1), S. 8–20. DOI: nicht verfügbar.
- Simmons, Amber L.; Schlezinger, Jennifer J.; Corkey, Barbara E. (2014): What Are We Putting in Our Food That Is Making Us Fat? Food Additives, Contaminants, and Other Putative Contributors to Obesity. In: *Curr Obes Rep* 3 (2), S. 273–285. DOI: 10.1007/s13679-014-0094-y.
- Song, Y.; Hauser, R.; Hu, F. B.; Franke, A. A.; Liu, S.; Sun, Q. (2014): Urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites and weight change: a prospective investigation in US women. In: *Int J Obes (Lond)*. DOI: 10.1038/ijo.2014.63.
- Spalding, Kirsty L.; Arner, Erik; Westermark, Pål O.; Bernard, Samuel; Buchholz, Bruce A.; Bergmann, Olaf et al. (2008): Dynamics of fat cell turnover in humans. In: *Nature* 453 (7196), S. 783–787. DOI: 10.1038/nature06902.
- Swan, Shanna H. (2008): Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. In: *Environmental Research* 108 (2), S. 177–184. DOI: 10.1016/j.envres.2008.08.007.
- Tezapsidis, Nikolaos; Johnston, Jane M.; Smith, Mark A.; Ashford, J. Wesson; Casadesus, Gemma; Robakis, Nikolaos K. et al. (2009): Leptin: a novel therapeutic

strategy for Alzheimer's disease. In: *J. Alzheimers Dis.* 16 (4), S. 731–740. DOI: 10.3233/JAD-2009-1021.

Umweltbundesamt (2005): Stoffmonographie Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP)—Referenzwerte für 5oxo-MEHP und 5OH-MEHP im Urin. Stellungnahme der Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes. Bekanntmachung des Umweltbundesamtes. In: *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 48 (6), S. 706–722. DOI: 10.1007/s00103-005-1086-6.

Europäische Union (2011): Verordnung (EU) Nr. 143/2011 der Kommission vom 17. Februar 2011 zur Änderung von Anhang XIV der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH). Amtsblatt der Europäischen Union. Online verfügbar unter <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:044:0002:0006:de:PDF>, zuletzt geprüft am 06.08.2014 um 08:27 Uhr.

Villanueva, E. C.; Myers, M. G. (2008): Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. In: *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7, S. S8-12. DOI: 10.1038/ijo.2008.232.

Völkel, Wolfgang; Kiranoglu, Mandy; Schuster, Ralph; Fromme, Hermann (2014): Phthalate intake by infants calculated from biomonitoring data. In: *Toxicol. Lett.* 225 (2), S. 222–229. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.12.012.

Wabitsch, M.; Brenner, R. E.; Melzner, I.; Braun, M.; Möller, P.; Heinze, E. et al. (2001): Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. In: *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25 (1), S. 8–15. DOI: 10.1038/sj.ijo.0801520.

Wabitsch, Martin; Moss, Anja; Kromeyer-Hauschild, Katrin (2014): Unexpected plateauing of childhood obesity rates in developed countries. In: *BMC Med* 12, S. 17. DOI: 10.1186/1741-7015-12-17.

Wang, May-Yun; Orci, Lelio; Ravazzola, Mariella; Unger, Roger H. (2005a): Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (50), S. 18011–18016. DOI: 10.1073/pnas.0509001102.

Wang, Youfa; Rimm, Eric B.; Stampfer, Meir J.; Willett, Walter C.; Hu, Frank B. (2005b): Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of

type 2 diabetes among men. In: *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (3), S. 555–563. DOI: nicht verfügbar.

Wang, Yu; Lam, Karen S L; Chan, Lawrence; Chan, Kok Weng; Lam, Janice B B; Lam, Michael C. et al. (2006): Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. In: *J. Biol. Chem.* 281 (24), S. 16391–16400. DOI: 10.1074/jbc.M513907200.

Yadav, Amita; Kataria, Megha A.; Saini, Vandana; Yadav, Anil (2013): Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. In: *Clin. Chim. Acta* 417, S. 80–84. DOI: 10.1016/j.cca.2012.12.007.

Yamaguchi, Shinya; Katahira, Hiroshi; Ozawa, Sachihiko; Nakamichi, Yoko; Tanaka, Toshiaki; Shimoyama, Tatsuhiro et al. (2005): Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. In: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289 (4), S. E643-9. DOI: 10.1152/ajpendo.00456.2004.

Yamauchi, T.; Kamon, J.; Waki, H.; Terauchi, Y.; Kubota, N.; Hara, K. et al. (2001): The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. In: *Nat. Med.* 7 (8), S. 941–946. DOI: 10.1038/90984.

Yamauchi, Toshimasa; Kamon, Junji; Ito, Yusuke; Tsuchida, Atsushi; Yokomizo, Takehiko; Kita, Shunbun et al. (2003): Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. In: *Nature* 423 (6941), S. 762–769. DOI: 10.1038/nature01705.

Yamauchi, Toshimasa; Nio, Yasunori; Maki, Toshiyuki; Kobayashi, Masaki; Takazawa, Takeshi; Iwabuchi, Masato et al. (2007): Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. In: *Nat Med* 13 (3), S. 332–339. DOI: 10.1038/nm1557.

Yokota, Takafumi; Meka, C S Reddy; Medina, Kay L.; Igarashi, Hideya; Comp, Phillip C.; Takahashi, Masahiko et al. (2002): Paracrine regulation of fat cell formation in bone marrow cultures via adiponectin and prostaglandins. In: *J. Clin. Invest.* 109 (10), S. 1303–1310. DOI: 10.1172/JCI14506.

Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J. M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. In: *Nature* 372 (6505), S. 425–432. DOI: 10.1038/372425a0.

## 8 Thesen

1. Di(2-ethylhexyl)phthalat wirkt als endokriner Disruptor der humanen Adipogenese.
2. Di(2-ethylhexyl)phthalat wird von SGBS-Zellen aufgenommen und in das metabolisch aktivere Mono(2-ethylhexyl)phthalat umgewandelt.
3. Bei SGBS-Zellen werden Adiponektin und Teile seiner Signalkaskade durch eine Exposition mit Di(2-ethylhexyl)phthalat dysreguliert.
4. Leptin wird durch eine Exposition mit Di(2-ethylhexyl)phthalat langfristig dysreguliert.
5. Di(2-ethylhexyl)phthalat wirkt bei SGBS-Zellen hypertroph, nicht hyperplastisch.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Luise Hunger
Geburtsdatum	10.09.1990
Geburtsort	Berlin
Familienstand	ledig

## Promotion und Studium

Promotion	Institut für Anatomie und Zellbiologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer im Rahmen des Halleschen Promotionskollegs Medizin 10/2013 – 09/2014
Famulaturen	Innere Medizin, Allgemeinmedizin, Tropenmedizin, Gynäkologie, Kinderheilkunde
Physikum	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5) 08/2012 – 09/2012
Studium	Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg seit 10/2010, derzeit im 4. Studienjahr

## Schulische Ausbildungen

Landesrettungsschule	Rettungssanitäterin der DRK- und ASB-Landesverbände Sachsen-Anhalt e.V., Halle/Saale 09/2009 – 09/2010
Gymnasium	Staatliches Gymnasium „Klosterschule“ Roßleben, Thüringen, allgemeine Hochschulreife (Note 1,0) 2001 – 2009
Grundschule	Allstedt, Sachsen-Anhalt 1997 – 2001

Halle/Saale,

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter, wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet.

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

Halle/Saale,

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich habe an keiner Universität, weder im In- noch im Ausland frühere Promotionsversuche unternommen.

Halle/Saale,

## **Danksagung**

Ich möchte danken, danken allen Menschen, die mich mit Druck und Freuden gelehrt haben, was es heißt, zu promovieren. Die Doktorandenzeit im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg war ein Abschnitt meines Lebens, den ich nicht missen möchte.

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Prof. Fischer, meinem Doktorvater, dessen Betreuung es an nichts gefehlt hat.

Ich danke Frau Dr. Kristina Schädlich, meiner Mentorin, welche noch jede meiner Fragen mit Witz und Tat beantwortet hat.

Dank an Christine Fröhlich für die Lernerfolge im Labor, für jeden kleinen Hüpfen.

Dank an das Trio aus Scarlett, Sandra und Jovita. Ihr wart die Masterstudentinnen!

Dank an alle Mitarbeiter des Anatomischen Instituts. Das Jahr war schön.

Vielen Dank dem Promotionskolleg, Herrn Prof. Stang und Herrn Prof. Bucher.

Ich danke meinen Freunden fürs Durchhalten mit mir.

Ich danke meiner Familie, meinen Eltern.

Clemens, hab dank.