

**Einfluss endokrin aktiver Nahrungsmittelkontaminanten
auf die Entstehung von Fettzellen**

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftler Ronald Biemann
Geb. am 12.05.1983 in Merseburg

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Fischer
Prof. Dr. Matthias Blüher
Prof. Dr. Gabriele I. Stangl

Verteidigung am: 27.10.2014

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1. Einleitung	1
1.1 Weltweite Zunahme der Adipositasprävalenz	1
1.1.1 Korrelation der zunehmenden Adipositasprävalenz mit der weltweit steigenden Kunststoffproduktion.....	2
1.2 Hormonell wirksame Umweltkontaminanten (EDC).....	2
1.2.1 Nicht-monotone Dosis-Wirkungs-Beziehungen	3
1.2.2 Tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI)	4
1.2.2.1 Kritik an der toxikologischen Bewertung von EDC	5
1.2.3 Pränatale Programmierung	5
1.2.4 „Obesogen“-Theorie	6
1.2.5 Bisphenol A (BPA)	7
1.2.6 Diethylhexylphthalat (DEHP)	9
1.2.7 Tributylzinn (TBT).....	12
1.3 Adipogenese	13
1.3.1 Adipogene Differenzierung von embryonalen Stammzellen	15
2. Zielstellung der Arbeit	18
3. Material und Methoden	20
3.1 Zelllinien und Zellkultur	25
3.1.1 C3H10T1/2-Zellen	25
3.1.1.1 Kultivierung der C3H10T1/2	25
3.1.1.2 Adipogene Differenzierung der C3H10T1/2	25
3.1.1.3 Vereinzelung der C3H10T1/2.....	26
3.1.2 CGR8-Zellen	26
3.1.2.1 Kultivierung der CGR8.....	26
3.1.2.2 Adipogene Differenzierung der CGR8.....	27
3.1.2.3 Vereinzelung der Stammzellaggregate	28
3.1.3 Kryokonservierung.....	28
3.1.4 Behandlung der Zellen mit BPA, DEHP und TBT	29
3.1.5 Proliferations- und Zytotoxizitätsassay	29
3.2 Durchflusszytometrie (FACS).....	30

3.3	Triglyzeridbestimmung	31
3.4	Genexpressionsanalyse mittels Real-time RT-PCR	32
3.4.1	RNA-Isolierung	32
3.4.1.1	RNA-Quantifizierung und Visualisierung	33
3.4.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA	33
3.4.3	DNase-Behandlung	34
3.4.4	Reverse Transkriptase (RT-) Reaktion.....	34
3.4.4.1	Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	35
3.4.4.2	Primer für die PCR.....	36
3.4.4.3	Quantitative Real-time RT-PCR	38
3.5	Klonierung und Sequenzierung	39
3.5.1	Isolation und Ligation von DNA-Fragmenten	39
3.5.2	Transformation und Selektion	39
3.5.2.1	Selektionsplatten	40
3.5.2.2	Mini-Plasmid-Präparation	40
3.5.3	Restriktionsverdau.....	41
3.5.4	Sequenzierung	41
3.6	Bestimmung der Induzierbarkeit von PPAR γ	42
3.7	PPAR γ -Knockdown	44
3.8	Proteinchemie	45
3.8.1	Proteinisolation	45
3.8.2	Proteinquantifizierung.....	46
3.8.3	Western Blot.....	46
3.8.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.8.3.2	Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran	48
3.8.3.3	Antikörper-Hybridisierung und -Detektion.....	48
3.9	Pluripotenznachweis mittels Immunfluoreszenz	49
3.10	MEHP-Bestimmung.....	51
3.11	Statistische Auswertung	51
4.	Ergebnisse	52
4.1	Pluripotenznachweis	52
4.2	Bestimmung geeigneter Expositionskonzentrationen	53
4.3	Einfluss der EDC auf die adipogene Differenzierung von C3H10T1/2-MS-CGR8-ESC	54
4.3.1	Einfluss NOAEL-orientierter Konzentrationen auf die adipogene Differenzierung von C3H10T1/2-MS-CGR8-ESC	54
4.3.1.1	Einfluss auf die Adipozytenmenge (Hyperplasie)	55
4.3.1.2	Einfluss auf den Triglyzeridgehalt (Hypertrophie).....	55

4.3.1.3	Einfluss auf die mRNA-Expression adipogener Markergene	56
4.3.2	Einfluss umweltrelevanter EDC-Konzentrationen auf die adipogene Differenzierung von C3H10T1/2-MSK	57
4.3.2.1	Einfluss auf die Adipozytenmenge (Hyperplasie)	57
4.3.2.2	Einfluss auf den Triglyzeridgehalt (Hypertrophie)	57
4.3.3	Wirkung der EDC auf unterschiedliche Stadien der Adipogenese von C3H10T1/2-MSK	58
4.3.3.1	Stadienspezifischer Einfluss auf die Adipozytenmenge (Hyperplasie) ...	59
4.3.3.2	Stadienspezifischer Einfluss auf den Triglyzeridgehalt (Hypertrophie) ..	60
4.3.3.3	Stadienspezifischer Einfluss auf die mRNA-Expression adipogener Markergene	60
4.4	Metabolisierung von DEHP zu MEHP in C3H10T1/2-MSK	61
4.5	Einfluss der EDC auf die adipogene Differenzierung pluripotenter CGR8-ESC	62
4.5.1	Einfluss auf die Adipozytenmenge (Hyperplasie)	62
4.5.2	Einfluss auf den Triglyzeridgehalt (Hypertrophie)	63
4.6	Induzierbarkeit von PPAR γ	64
4.6.1	Induzierbarkeit von PPAR γ in undifferenzierten C3H10T1/2-MSK	64
4.6.2	Induzierbarkeit von PPAR γ in Pparg2 überexprimierenden C3H10T1/2-MSK	65
4.7	Expressionsprofil adipogener Markergene während der adipogenen Differenzierung von C3H10T1/2-MSK	65
4.7.1	mRNA-Expression und Proteinmenge von PPAR γ 1 und PPAR γ 2	66
4.7.2	mRNA-Expression von Fabp4	66
4.8	Wirkung von TBT auf die Determinierungsphase von C3H10T1/2-MSK	68
4.8.1	Einfluss von TBT auf Gene der Determinierung	68
4.8.2	Wirkung von TBT auf die nachgeschaltete adipogene Differenzierung	68
4.9	Knockdown von PPAR γ	70
4.10	Einfluss eines PPAR γ -Knockdown auf die adipogene Wirkung von TBT in C3H10T1/2-MSK	71
4.10.1	Einfluss von TBT auf Gene der adipogenen Determinierung	71
4.10.2	Wirkung von TBT auf die adipogene Differenzierung	73
5.	Diskussion	74
5.1	Konzentrationsbereich und zytotoxische Dosis-Wirkungs-Beziehung von BPA, DEHP und TBT in embryonalen Stammzellen	74
5.2	Einfluss umweltrelevanter EDC-Konzentrationen auf die Entstehung von Fettzellen	75
5.3	Einfluss von BPA, DEHP und TBT auf die adipogene Differenzierung pluripotenter embryonaler Stammzellen	77

5.4	BPA, DEHP und TBT beeinflussen die Entstehung von Adipozyten konzentrations- und stadienabhängig.....	78
5.4.1	BPA vermindert die adipogene Determinierung von MSC.....	80
5.4.2	DEHP fördert die hormonell induzierte adipogene Differenzierung von MSC.....	82
5.4.3	TBT fördert die Entstehung von Fettzellen.....	85
5.4.3.1	TBT steigert die adipogene Differenzierung über einen PPARg- abhängigen Mechanismus	85
5.4.3.2	TBT fördert die adipogene Determinierung von MSC	86
5.4.3.3	Der adipogene Einfluss von TBT während der Determinierungsphase von MSC ist PPARg-unabhängig.....	88
6.	Zusammenfassung.....	90
6.1	Summary.....	92
7.	Literaturverzeichnis.....	94
8.	Anhang.....	108
8.1	Sequenzierung der Real-time RT PCR-Produkte.....	108
8.1.1	Sequenzierung 18S rRNA	108
8.1.2	Sequenzierung Adipoq.....	108
8.1.3	Sequenzierung Col2a1	109
8.1.4	Sequenzierung Fabp4	109
8.1.5	Sequenzierung Lpl.....	110
8.1.6	Sequenzierung Ppara	110
8.1.7	Sequenzierung Pparg1.....	111
8.1.8	Sequenzierung Pparg2.....	111
8.1.9	Sequenzierung Dlk1	112
8.1.10	Sequenzierung Runx2	112
8.1.11	Sequenzierung Sox5.....	113
8.1.12	Sequenzierung Sox6.....	113
8.1.13	Sequenzierung Sox9.....	114
8.2	Sequenzierung des Pparg2-Plasmids.....	114
8.3	Sequenzierung des PPRE	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturelle Ähnlichkeit zwischen Bisphenol A, Östradiol und Diethylstilbestrol (DES).....	7
Abbildung 2: Metabolismus von Diethylhexylphthalat (DEHP)	10
Abbildung 3: Strukturformel des metallorganischen Tributylzinn (TBT)	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Entstehung von Fettzellen	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung des adipogenen Differenzierungsprotokolls multipotenter embryonaler Stammzellen der Linie C3H10T1/2	16
Abbildung 6: Schematische Darstellung des adipogenen Differenzierungsprotokolls pluripotenter embryonaler Stammzellen der Linie CGR8.....	17
Abbildung 7: Bestimmung der Fettzellmenge und Darstellung eines positiv sortierten Adipozyten.....	31
Abbildung 8: Schematischer Aufbau der verwendeten Vektoren sowie Darstellung der durch die Luziferasen katalysierten Reaktionen	44
Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Western Blot	48
Abbildung 10: Nachweis der pluripotenzassoziierten Antigene SSEA1 und Oct-4 in undifferenzierten CGR8-ESC.....	52
Abbildung 11: MTT-Test	54
Abbildung 12: Quantitative und lichtmikroskopische Bestimmung der Anzahl an Adipozyten von langzeitbehandelten C3H10T1/2-MS.C.....	55
Abbildung 13: Gesamt-Triglyzeridgehalt von langzeitbehandelten C3H10T1/2-MS.C.....	56

Abbildung 14: mRNA-Expression der adipogenen Markergene Fabp4, Pparg2, Lpl und Adipoq von langzeitbehandelten C3H10T1/2-MSC.	57
Abbildung 15: Anzahl an Adipozyten von mit umweltrelevanten Expositionskonzentrationen behandelten C3H10T1/2-MSC.	58
Abbildung 16: Gesamt-Triglyzeridgehalt von mit umweltrelevanten Expositionskonzentrationen behandelten C3H10T1/2-MSC.	58
Abbildung 17: Bestimmung der Anzahl an Adipozyten von stadienspezifisch behandelten C3H10T1/2-MSC.	59
Abbildung 18: Gesamt-Triglyzeridgehalt von stadienspezifisch behandelten C3H10T1/2-MSC.	60
Abbildung 19: mRNA-Expression der adipogenen Markergene Fabp4, Pparg2, Lpl und Adipoq von stadienspezifisch behandelten C3H10T1/2-MSC.	61
Abbildung 20: MEHP-Konzentration im Zelllysat von C3H10T1/2-MSC nach Exposition mit DEHP.	62
Abbildung 21: Bestimmung der Anzahl an Adipozyten von langzeitbehandelten CGR8-ESC.	63
Abbildung 22: Gesamt-Triglyzeridgehalt von langzeitbehandelten CGR8-ESC.	63
Abbildung 23: Induzierbarkeit von PPARg in undifferenzierten C3H10T1/2-MSC.	64
Abbildung 24: Induzierbarkeit von PPARg in Pparg2-überexprimierenden C3H10T1/2-MSC.	65
Abbildung 25: mRNA-Menge und Proteinmenge von PPARg1 und PPARg2 während verschiedener Phasen der adipogenen Differenzierung von C3H10T1/2-MSC.	67
Abbildung 26: mRNA-Menge von Fabp4 während verschiedener Phasen der adipogenen Differenzierung von C3H10T1/2-MSC.	67

Abbildung 27: mRNA-Menge von Genen der Determinierung von C3H10T1/2-MSC	69
Abbildung 28 Quantitative und lichtmikroskopische Bestimmung der Anzahl an Adipozyten von undifferenziert TBT-exponierten C3H10T1/2-MSC.....	69
Abbildung 29 mRNA-Menge und Proteinmenge von Genen und Proteinen der Determinierung von C3H10T1/2-MSC nach PPARg-Knockdown	70
Abbildung 30: mRNA-Menge von Genen der adipogenen Determinierung von C3H10T1/2-MSC nach PPARg-Knockdown.....	72
Abbildung 31: Quantitative und lichtmikroskopische Bestimmung der Anzahl an Adipozyten von Pparg-siRNA behandelten C3H10T1/2-MSC	73
Abbildung 32: Synopsis der Wirkung von Tributylzinn auf die adipogene Determinierung und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen	88
Abbildung 33: Vergleich der Sequenz des 18S rRNA PCR-Produkts mit der 18S rRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NR_003278.3)	108
Abbildung 34: Vergleich der Sequenz des Adipoq PCR-Produkts mit der Adipoq mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_009605.4).....	108
Abbildung 35: Vergleich der Sequenz des Col2a1 PCR-Produkts mit der Col2a1 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_001113515.2)	109
Abbildung 36: Vergleich der Sequenz des Fabp4 PCR-Produkts mit der Fabp4 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_024406.2)	109
Abbildung 37: Vergleich der Sequenz des Lpl PCR-Produkts mit der Lpl mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_008509.2).....	110
Abbildung 38: Vergleich der Sequenz des Ppara PCR-Produkts mit der Ppara mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_011144.6)	110

Abbildung 39: Vergleich der Sequenz des Pparg1 PCR-Produkts mit der Pparg1 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_001127330.1)	111
Abbildung 40: Vergleich der Sequenz des Pparg2 PCR-Produkts mit der Pparg2 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_011146.3)	111
Abbildung 41: Vergleich der Sequenz des Dlk1 PCR-Produkts mit der Dlk1 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_010052.5)	112
Abbildung 42: Vergleich der Sequenz des Runx2 PCR-Produkts mit der Runx2 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: XM_006523540.1)	112
Abbildung 43: Vergleich der Sequenz des Sox5 PCR-Produkts mit der Sox5 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_011444.3)	113
Abbildung 44: Vergleich der Sequenz des Sox6 PCR-Produkts mit der Sox6 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_011445.4)	113
Abbildung 45: Vergleich der Sequenz des Sox9 PCR-Produkts mit der Sox9 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_011448.4)	114
Abbildung 46: Vergleich der Sequenz des Pparg2-Plasmids mit der Pparg2 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_011146.3)	116
Abbildung 47: Sequenzierung des PPRE-Konstrukts im PGL2-Vektor	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Primersequenzen für die RT-PCR.....	37
Tabelle 2: Liste der Primersequenzen für die Sequenzierung der Plasmide	43
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primärantikörper für den Western-Blot	49
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immunhistologie	50

Abkürzungsverzeichnis

3T3-L1	Murine unipotente Präadipozyten
BMI	Body-Mass-Index
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BPA	Bisphenol A
C57Bl/6	Mausinzuchtstamm
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
C3H10T1/2	Murine multipotente embryonale Stammzelllinie
CGR8	Murine pluripotente embryonale Stammzelllinie
COL2A1	<i>Collagen type II, alpha 1</i>
DEHP	Diethylhexylphthalat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DES	Diethylstilbestrol
DLK1	<i>Delta-like 1 homolog alias Preadipocyte factor 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOHaD	<i>Developmental origins of health and disease hypothesis</i>
EAA	<i>Essential amino acids</i>
EB	<i>Embryoid body</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EDC	<i>Endocrine disrupting compound</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERR γ	<i>Estrogen-related receptor gamma</i>
ESC	<i>Embryonic stem cells</i>
EU	Europäische Union
FABP4	<i>Fatty acid binding protein 4</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>

GMEM	<i>Glasgow Minimum Essential Medium</i>
GPR-30	<i>G protein-coupled receptor 30</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
K _d	Dissoziationskonstante
LIF	<i>Leukaemia inhibitory factor</i>
LD50	Letale Dosis 50
LOAEL	<i>Lowest observed adverse effect level</i>
LPL	<i>Lipoprotein lipase</i>
MEHP	Monoethylhexylphthalat
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MSC	<i>Multipotent stem cells</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NEAA	<i>Non essential amino acids</i>
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PVC	Polyvinylchlorid
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	<i>PPAR response element</i>
REACH	EU-Chemikalienverordnung (EG) Nr. 1907/2006
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
RXRα	<i>Retinoid-X-receptor alpha</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOX	<i>Sry-related HMG box gene</i>
SSEA1	<i>Stage-specific embryonic antigen 1</i>
TBT	Tributylzinn
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TDI	<i>Tolerable daily intake</i>

TG	Triglyzeride
WHO	<i>Word Health Organisation</i>
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>

1. Einleitung

1.1 Weltweite Zunahme der Adipositasprävalenz

Die Adipositasprävalenz hat sich weltweit in den vergangenen dreißig Jahren nahezu verdoppelt [1]. Allein in Deutschland gelten heute 66% der Männer und 51% der Frauen als übergewichtig (BMI > 25) beziehungsweise jeweils 21% als adipös (BMI > 30) [2]. Der Anstieg der Adipositasprävalenz ist besonders stark bei Kindern und Jugendlichen ausgeprägt [3]. In den USA hat sich der Anteil adipöser Kinder in den letzten 30 Jahren fast verdreifacht [4]. Obwohl die weltweite Zunahme der Adipositasprävalenz bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen einem sozioökonomischen Gefälle unterliegt [5], fallen die Unterschiede, welche durch Geschlecht, Ethnie, Einkommen und Bildung bedingt sein könnten, innerhalb einer Nation, am Beispiel der USA, verhältnismäßig gering aus [6]. Die rasante Verbreitung der Adipositas, von der *World Health Organisation* (WHO) auch als „Adipositas-Pandemie“ bezeichnet, gehört damit zu einer der größten Herausforderungen der öffentlichen Gesundheitssysteme weltweit [7].

Die Entstehung von Adipositas ist multikausal und kann nur selten auf einzelne Risikofaktoren zurückgeführt werden. Vielmehr wird Adipositas durch eine komplexe Interaktion genetischer, Verhaltens- und Umweltfaktoren verursacht, welche neben Adipositas meist auch die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskulären Erkrankungen, Bluthochdruck und Dyslipidämien begünstigen. Genetische Faktoren bedingen eine Prädisposition und bilden die Grundlage, im Lauf des Lebens einen adipösen Phänotyp zu entwickeln. Umweltbedingungen wie beispielsweise exzessive Nahrungsaufnahme, anhaltender Stress, inaktiver Lebensstil, Infektionen [8] sowie die Zunahme der Exposition mit ubiquitär vorkommenden hormonell wirksamen Umweltkontaminanten [9,10] sind an der Entstehung und der schnellen Verbreitung der Adipositas beteiligt. Epidemiologische Daten zeigen, dass nahezu alle Volkskrankheiten mit Adipositas assoziiert und durch Vermeidung von Adipositas drastisch reduziert werden können [11-13].

1.1.1 Korrelation der zunehmenden Adipositasprävalenz mit der weltweit steigenden Kunststoffproduktion

Der weltweite Anstieg der Adipositasprävalenz geht mit der Zunahme von Kunststoffen in unserer Umwelt einher. Durch den direkten Kontakt mit industriellen und landwirtschaftlichen Produkten, durch veränderte Lebensgewohnheiten und durch die zunehmende Umweltverschmutzung wird unser Alltag heute von einer Vielzahl chemischer Substanzen bestimmt [9]. Die jährliche Produktion und Verwendung von Kunststoffen steigt kontinuierlich an. Wurden 1950 noch eine halbe Million Tonnen Kunststoffe produziert, lag die Produktion 2012 bereits bei knapp 300 Millionen Tonnen [14].

Die anhaltend steigende Nachfrage nach polymeren Kunststoffen hat viele Gründe. Kunststoffe sind kostengünstig, leicht, elastisch, korrosionsbeständig und haben eine lange Lebenszeit. Zur Verbesserung ihrer chemischen Eigenschaften werden Zusatzstoffe (Additive) eingesetzt, welche dazu führen, dass Kunststoffe zudem weich, hitzebeständig, UV-resistent oder schwer entzündbar sind. Rund 60% aller weltweit hergestellten Additive entfallen dabei allein auf die Klasse der Weichmacher [15]. Kunststoffadditive können sich aus dem Polymerverbund lösen oder über Abbauprozesse in die Umwelt freigesetzt werden. Freie Additive können vom Menschen über die Nahrung, Haut und Atmung aufgenommen werden.

1.2 Hormonell wirksame Umweltkontaminanten (EDC)

Besitzen natürliche oder xenobiotische Substanzen hormonelle Eigenschaften, dann werden sie als Umwelthormone oder hormonell wirksame Umweltkontaminanten (EDC, *endocrine disrupting compounds*) bezeichnet. EDC stellen aufgrund ihrer hormonellen Wirksamkeit eine spezielle Klasse gefährlicher Verbindungen dar. Die Exposition mit einzelnen EDC oder einem EDC-Gemisch aus verschiedenen Chemikalien kann endokrine Funktionen vielfältig beeinflussen.

Das endokrine System des Körpers reguliert durch Hormone die Entwicklung und die Aufrechterhaltung der Homöostase von Zellen und Organen. EDC imitieren oder beeinflussen die Wirkung natürlicher Hormone [16]. Um ihre Wirkung zu entfalten, binden

EDC, wie natürliche Hormone, an Rezeptoren. Ihre unmittelbaren, spezifischen Effekte variieren abhängig von Zelltyp, Rezeptortyp, Rezeptordichte, Vorhandensein von Cofaktoren, Lebenszyklus und anderen Faktoren. Zudem verursachen viele EDC komplexe Effekte, die nicht auf eine einzelne Wirkung zurückführbar sind [17]. Durch ihre hormonelle Wirksamkeit können EDC das Hormonsystem in bestimmten sensitiven Entwicklungsstadien stören und nachhaltig prägen [17].

Als besonders empfindlich erweist sich dabei die embryonale und fetale Entwicklung, da hier das Immunsystem und der Leber- und Fremdstoffmetabolismus noch unreif und die Blut-Hirn-Schranke nicht voll entwickelt sind. Da sich der Einfluss von EDC auf mehrere Generationen auswirken kann, werden insbesondere epigenetischen Veränderungen als Mechanismus der langfristigen EDC-Wirkung angenommen [18].

Im Februar 2013 veröffentlichte die WHO gemeinsam mit dem Umweltprogramm der Vereinten Nationen eine Stellungnahme, die Bezug zu zahlreichen wissenschaftlichen Studien über Wirkung und Gefährdung durch EDC nahm. Kernaussage des Berichts ist die Feststellung, dass hormonell wirksame Chemikalien eine globale Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen [19]. Wissenschaftler aus zehn Nationen bestätigen einen weltweiten Anstieg endokrin verursachter Erkrankungen, welcher mit der steigenden Belastung durch EDC in Verbindung gebracht werden kann. Solche Störungen betreffen Fertilität, Schwangerschaft, Metabolismus, Entwicklung sowie die Entstehung von Tumoren. Gefahren während der fetalen und frühkindlichen Entwicklung werden dabei besonders hervorgehoben, da sich Stoffwechsel und Vulnerabilität des sich entwickelnden Organismus zum Teil sehr vom Adulten unterscheiden.

Von den Vertretern der Chemieunternehmen (*American Chemistry Council*) werden diesbezügliche Studien häufig in Frage gestellt und deren Ergebnisse als nicht valide bewertet [20].

1.2.1 Nicht-monotone Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Die Wirkung von Hormonen ist von der Sensitivität des Rezeptors zum Liganden, der Anzahl von Rezeptoren, der Anzahl von Hormonen und dem Vorhandensein von Co-Faktoren abhängig. Sie ist konzentrationsabhängig, wobei die maximale Wirkung eines Hormons

üblicherweise in einem Konzentrationsbereich eintritt, der weit unter dem der Rezeptorsättigung liegt [16]. Eine Rezeptorsättigung kann zur Herunterregulation der Rezeptormenge führen und so die hormonelle Sensitivität von Zellen senken oder sogar hemmen [16]. Hormonelle Regelkreise, in der geringe Konzentrationen des Hormons starke und hohe Konzentrationen schwache Effekte aufweisen, sind ein Beispiel nicht-monotoner Dosis-Wirkungs-Beziehungen [17]. Der Effekt einer geringen Dosis eines Hormons oder eines EDC ist daher nicht mit dem einer hohen Dosis vorhersagbar und umgekehrt. Da Hormone ihre eigentliche Wirkung bereits in geringen Konzentrationen ausüben, können bereits kleine Konzentrationsänderungen große Wirkungen nach sich ziehen. Diese Tatsache erschwert die Festlegung von Schwellenwerten für die Voraussage des Gefährdungspotentials von EDC [17,21]. Hinzu kommt, dass EDC in Zellen und Geweben bereits in geringen Konzentrationen durch Interaktionen untereinander sowie mit verschiedenen Rezeptortypen andere Effekte hervorrufen können als natürliche Hormone [16].

Da die alltägliche Exposition mit EDC nicht einzeln sondern als Stoffgemisch auftritt, können sich Einzelwirkungen ähnlicher EDC auch verstärken. Dieser Prozess wird als „Prinzip der Konzentrationsadditivität“ bezeichnet [22]. Ein weiteres Prinzip, das der "Unabhängigen Wirkung", setzt voraus, dass die Bestandteile der Mischung verschiedene Wirkungsmechanismen aufweisen [22]. Beide Konzepte beziehen sich jedoch auf solche Fälle, in denen alle Substanzen in einer Mischung auf denselben experimentellen Endpunkt hinwirken. Die Komplexität der Wirkmechanismen und Vielfalt der Endpunkte machen es schwierig, Richtlinien festzulegen, um Mensch, Tier und Umwelt vor dem schädlichen Einfluss solcher Stoffe zu schützen. Auch können längst nicht alle hormonellen Prozesse mit gängigen toxikologischen Testsystemen erfasst werden, zumal der schädigende Einfluss von EDC stark vom Zeitpunkt der Exposition und der Vulnerabilität des Organismus abhängig ist [17].

1.2.2 Tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI)

Die tolerierbare tägliche Aufnahme (TDI, *tolerable daily intake*) bezeichnet auf der Basis des Körpergewichts die Dosis einer Substanz, wie etwa eines EDC, Pestizids oder eines Medikaments, welche bei lebenslanger täglicher Einnahme als medizinisch unbedenklich betrachtet wird. Grundlage für die Erhebung des TDI sind meist Fütterungsversuche an

Ratten und Mäusen. Die Dosis, bei der 50% der Versuchstiere überleben, wird als Letale Dosis 50 (LD50) bezeichnet. Die Konzentration, bei welcher keine toxische Schädigung beobachtet wird, bezeichnet man als *no observed adverse effect level* (NOAEL). Dieses dividiert durch einen Sicherheitsfaktor von üblicherweise 100 ergibt den TDI. Die Risikobewertung wird auf europäischer Ebene durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority*, EFSA) und auf nationaler Ebene in Deutschland vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) durchgeführt.

1.2.2.1 Kritik an der toxikologischen Bewertung von EDC

In der klassischen Toxikologie wird die schädliche Wirkung einer Substanz ausgehend von seiner toxischen Konzentration nach dem „*Top-Down*“-Prinzip untersucht, da man die Wirkmechanismen und die resultierenden Folgereaktionen der zu untersuchenden Chemikalien nicht kennt [23]. Ausgehend von toxischen Endpunkten, wie beispielsweise einer gesteigerten Abort- und Fehlbildungsrate bei reproduktionstoxischen Effekten, wird der NOAEL- und TDI-Wert ermittelt. Mögliche synergistische Effekte mit anderen Substanzen, Wirkungen außerhalb untersuchter Endpunkte (z.B. epigenetische Effekte) und Effekte niedrigster Konzentrationen werden dabei jedoch nicht oder nur teilweise berücksichtigt.

Im Gegensatz dazu geht die endokrinologische Betrachtungsweise von der geringstmöglichen Konzentration aus, in welcher ein Hormon an einen Rezeptor bindet und eine Wirkung verursacht („*Bottom-Up*“-Prinzip). Im Fall von EDC können die Konzentrationen, in denen Substanzen hormonelle Wirkung haben, um ein Vielfaches unter denen liegen, welche als toxikologisch unbedenklich gelten [16].

1.2.3 Pränatale Programmierung

Auf der Grundlage retrospektiver Kohortenstudien wurde in den 80er Jahren von Prof. David Barker und Kollegen die Hypothese der entwicklungsbedingten Ursachen metabolischer Erkrankungen, „*developmental origins of health and disease*“ (DOHaD), etabliert [24]. Demnach prägt bereits der mütterliche Ernährungszustand über hormonelle Mechanismen den Metabolismus des sich entwickelnden Embryos und schafft somit die Veranlagungen für

bestimmte metabolische Erkrankungen im späteren Leben. Mehrere Studien haben seitdem gezeigt, dass Umweltfaktoren während früher kritischer Entwicklungsphasen von Embryo, Fötus und Säugling die Entstehung von Adipositas, Insulinresistenz und des Metabolischen Syndroms beeinflussen [25]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher jedoch kaum verstanden. Steigende Adipositasraten bei Kindern deuten darauf hin, dass die Grundlagen für einen adipösen Phänotyp bereits pränatal und während der frühen Kindheit geschaffen werden [26,27].

1.2.4 „Obesogen“-Theorie

Üblicherweise geht man davon aus, dass Adipositas primär das Resultat einer positiven Energiebilanz ist, da Energie nur dann gespeichert werden kann, wenn die Aufnahme die Abgabe übersteigt. Dieses Axiom erklärt die Grundlage der Entstehung von Übergewicht in seiner einfachsten Form. Jedoch ist ein komplexes Zusammenspiel physiologischer Faktoren notwendig, um die Regulation des Körpergewichts außerhalb des individuell normalen Bereichs zu verschieben [28]. Eine mögliche Erklärung für das Phänomen der weltweit rasant zunehmenden Adipositasprävalenz lieferten Grun und Blumberg 2006 im Zusammenhang mit ihrer „Obesogen“-Theorie [29]. Nach dieser Hypothese können bestimmte EDC an der schnellen Ausbreitung von Adipositas teilhaben, da sie während sensibler Entwicklungsstadien die Entstehung eines adipösen Phänotyps herbeiführen [30,31]. Solche EDC, als Obesogene bezeichnet, könnten Adipositas fördern, indem sie zu einer verstärkten Entstehung, Vermehrung und Vergrößerung von Fettzellen beitragen, die basale metabolische Stoffwechselrate beeinflussen, den Metabolismus in Richtung Energiespeicherung verschieben, die Regulation von Hunger und Sättigung stören und/oder die Vererbbarkeit solcher Veränderungen beeinflussen [28].

Die Exposition von EDC während kritischer Phasen der Entwicklung könnte also bereits *in utero* zu einer dauerhaften Veränderung des Metabolismus über mehrere Generationen führen und so die Entstehung und Verbreitung von Adipositas fördern [32]. Diese Hypothese wird von dem Umstand gestützt, dass die Adipositasprävalenz bereits bei Kleinkindern stark ansteigt [3,4]. Darüber hinaus sind steigende Adipositasraten nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Tieren, welche in unmittelbarer Nähe zum Menschen bzw. in industriellen Zonen leben, zu beobachten. Klimentidis und Kollegen untersuchten die

Gewichtsentwicklung von Tieren aus 24 Populationen [33]. Sie fanden in allen untersuchten Stämmen, sowohl bei freilebenden Mäusen und Ratten, bei domestizierten Hunden und Katzen als auch bei Primaten und Nagetieren, welche streng kontrolliert in Forschungslaboren gehalten wurden, eine signifikante mittlere Körpergewichtszunahme [33].

Folgende chemische Additive stehen seither in Verdacht, die Entstehung von Adipositas zu beeinflussen: Östrogen-wirkende EDC wie Bisphenol A (BPA) [34] oder Diethylstilbestrol (DES) [35], Organozinnverbindungen wie Tributylzinn (TBT) oder Triphenylzinn [31], Weichmacher wie Diethylhexylphthalat (DEHP) bzw. dessen Metabolit Monoethylhexylphthalat (MEHP) [36] sowie Perfluorooctansäure [37] und persistente organische Verbindungen wie polybromierte Diphenylether [38].

1.2.5 Bisphenol A (BPA)

1891 wurde BPA erstmals von A. P. Dianin synthetisiert [39]. Auf der Suche nach synthetischen Östrogenen wurde es in den 30er Jahren weiter erforscht. Die Verwendung von BPA als synthetisches Östrogen wich jedoch dem potenteren, strukturähnlichen DES [39] (Abbildung 1). Zur Prävention von Aborten und Frühgeburten wurde DES bis 1971 schwangeren Frauen verabreicht [40]. Diese Praxis wurde jedoch eingestellt, da in den Töchtern DES behandelter Mütter bereits in jungen Jahren vermehrt Gebärmutterhalskrebs auftrat [40].

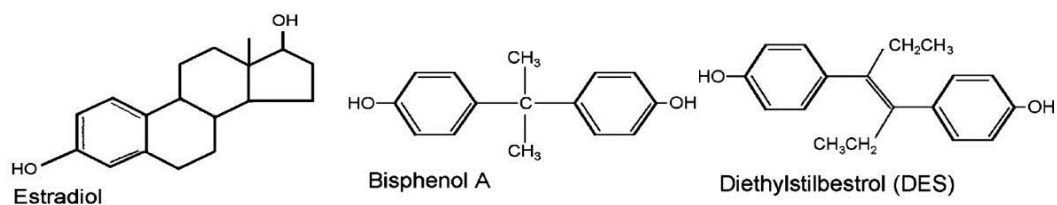


Abbildung 1: **Strukturelle Ähnlichkeit zwischen Bisphenol A, Östradiol und Diethylstilbestrol (DES) (Rubin und Soto, 2009).**

In den 40er und 50er Jahren wurde BPA schließlich als essentieller Baustein für die Herstellung von Polycarbonaten entdeckt. Heute gilt BPA der chemischen Industrie als eine der wichtigsten und unentbehrlichsten Chemikalien. Allein in Deutschland werden ca.

400.000 Tonnen pro Jahr vermarktet. BPA wird für die Herstellung polymerer Kunststoffe wie Polysulfone, Polyetherketone, Polycarbonate und Epoxidharze verwendet und ist beispielsweise in Plastikflaschen oder der Innenbeschichtung von Konserven enthalten. Monomere von BPA können sich aus dem Polymerverbund lösen und über die Nahrung aufgenommen werden. Schätzungen gehen davon aus, dass BPA zu 99% über den Verzehr von Lebensmitteln aufgenommen wird [41]. Daten aus den USA belegen, dass in ca. 92,6% der Bevölkerung BPA bzw. BPA-Metabolite im Urin nachweisbar sind, wobei die gemessenen Konzentrationen im Schnitt am höchsten bei Kindern und am geringsten bei Erwachsenen sind [42].

Der TDI für BPA wurde 2006 durch die EFSA von 10 µg/kg Körpergewicht/Tag auf 50 µg angehoben. Wegen zahlreicher Studien über einen möglichen gesundheitsschädigenden Einfluss von BPA ist dessen Verwendung in Babyflaschen in Frankreich und Dänemark im Rahmen des vorsorglichen Verbraucherschutzes bereits 2010 verboten worden. Dieses Verbot wurde durch die Europäische Kommission 2011 auf alle EU-Mitgliedsstaaten ausgeweitet. Aufgrund neuer Studien, welche einen schädigenden Einfluss von BPA auf die sexuelle Entwicklung [43] und die Entstehung von Brustkrebs [44,45] belegen, wurde 2013 seitens der EFSA eine Neubewertung von BPA vorgenommen [46]. Dabei kam die EFSA zu dem Schluss, dass es wahrscheinlich ist, dass BPA schädigende Effekte auf Niere, Leber und Brustdrüse ausübt. Darüber hinaus räumt die Kommission ein, dass BPA verschiedene biologische Systeme wie Reproduktion, Metabolismus, Immun- und Nervensystem beeinflussen und Krebs verursachen könnte. Aufgrund dieser wahrscheinlichen und möglichen Risiken empfiehlt die Expertenkommission der EFSA seit 2014, den TDI von 50 µg/kg Körpergewicht/Tag auf 5 µg/kg Körpergewicht/Tag herabzusetzen [47]. Im Rahmen der EU-Chemikalienverordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH-Verordnung) ist auf nationaler Ebene das BfR für Fragen zu gesundheitlichen Aspekten von BPA sowie der Bewertung von Risikominderungsmaßnahmen zuständig.

Obwohl viele Hersteller aktuell mit BPA-freien Produkten werben, tauchen immer wieder Berichte auf, nach denen manche dieser Produkte dennoch BPA enthalten [48]. Auch wird BPA häufig durch Bisphenol-S ersetzt [49], dessen östrogene Wirkung jedoch mit der von BPA vergleichbar ist [50].

Pharmakokinetische Studien belegen, dass freies BPA in der Leber mit Glucuronsäure konjugiert und über den Urin mit einer Eliminationshalbwertszeit von ca. 4 h ausgeschieden wird [51]. Darüber hinaus wurde jedoch auch gezeigt, dass BPA die Blut-Plazenta-Schranke passiert [52]. BPA kann ab dem dritten Schwangerschaftsmonat in humanen Plazenten und fetalen Leberproben nachgewiesen werden [53]. Zudem wandelt die plazentäre β -Glucuronidase bereits konjugiertes BPA wieder in freies BPA um [54]. Freies BPA kann in fetalen humanen Lebern in dreifach höherer Konzentration nachgewiesen werden als die gebundene Form [55]. Die schnelle Elimination von BPA trifft daher nicht auf den fetalen Stoffwechsel zu. Als sich entwickelnder Organismus sind Embryo und Fetus durch EDC jedoch besonders gefährdet, denn hormonelle Einflüsse verändern die Regulation der Entwicklung und bewirken möglicherweise eine Fehlprägung des Metabolismus.

Freies BPA besitzt östrogene Aktivität und bindet an die klassischen Östrogenrezeptoren alpha (ERa) und beta (ERb) sowie an den Östrogenrezeptor ähnlichen Rezeptor ERRg und den membrangebundenen Östrogenrezeptor GPR-30 [39]. Erhöhte Plasmaöstrogenspiegel gehen mit einer verminderten Nahrungsaufnahme und einer Verringerung des Körpergewichts einher [56]. So kommt es beispielsweise in der Menopause durch den Verlust der ovariellen Östrogenproduktion zu einer Gewichtszunahme. Während kritischer Phasen der fetalen Entwicklung können Östrogene jedoch auch zur Förderung, also Programmierung, der Entstehung von Adipositas führen [57].

1.2.6 Diethylhexylphthalat (DEHP)

Als niedermolekularer Ester der Phthalsäure ist DEHP einer der wichtigsten Weichmacher auf Phthalatbasis. DEHP ist farb-, geruch- und geschmacklos, macht polymere Kunststoffe elastisch und geschmeidig und kommt in nahezu jedem auf PVC basierenden Kunststoffprodukt vor. Von allen weltweit verwendeten Weichmachern auf Phthalatbasis, etwa 2 Mio. t/Jahr, macht DEHP etwa 50% aus [58]. Der Gehalt von DEHP in phthalathaltigen Polymermaterialien macht im Mittel ca. 30% aus [58] und kann, beispielsweise in bestimmten Medizinprodukten, sogar bei 80% liegen [59]. Da DEHP nicht kovalent gebunden wird, dünstet es ständig aus und gelangt so unkontrolliert in die Umwelt und den menschlichen Körper. Vor allem in prozessierten und verpackten Lebensmitteln sind erhöhte Mengen an Phthalaten nachweisbar [60]. Phthalate kommen zudem auch als

Trägersubstanzen für Duftstoffe, Komponenten in Nagellack und Haarspray, Lösungsmitteln in der Pestizidanwendung, industriellen Lösungsmitteln und Schmierstoffen oder als Additive in der Textilindustrie zum Einsatz [61].

Aufgenommenes DEHP wird zum Monoester MEHP gespalten, welcher in der Leber metabolisiert und hauptsächlich über den Urin ausgeschieden wird [62] (Abbildung 2). Die Eliminationshalbwertszeit von DEHP beträgt ca. 12 Stunden [63]. Die der einzelnen Metabolite liegt zwischen 10 Stunden und 24 Stunden [62]. Bei einer permanenten chronischen Aufnahme besteht daher die Gefahr einer Akkumulation von DEHP und dessen hormonell aktiven Metaboliten im Körper [62].

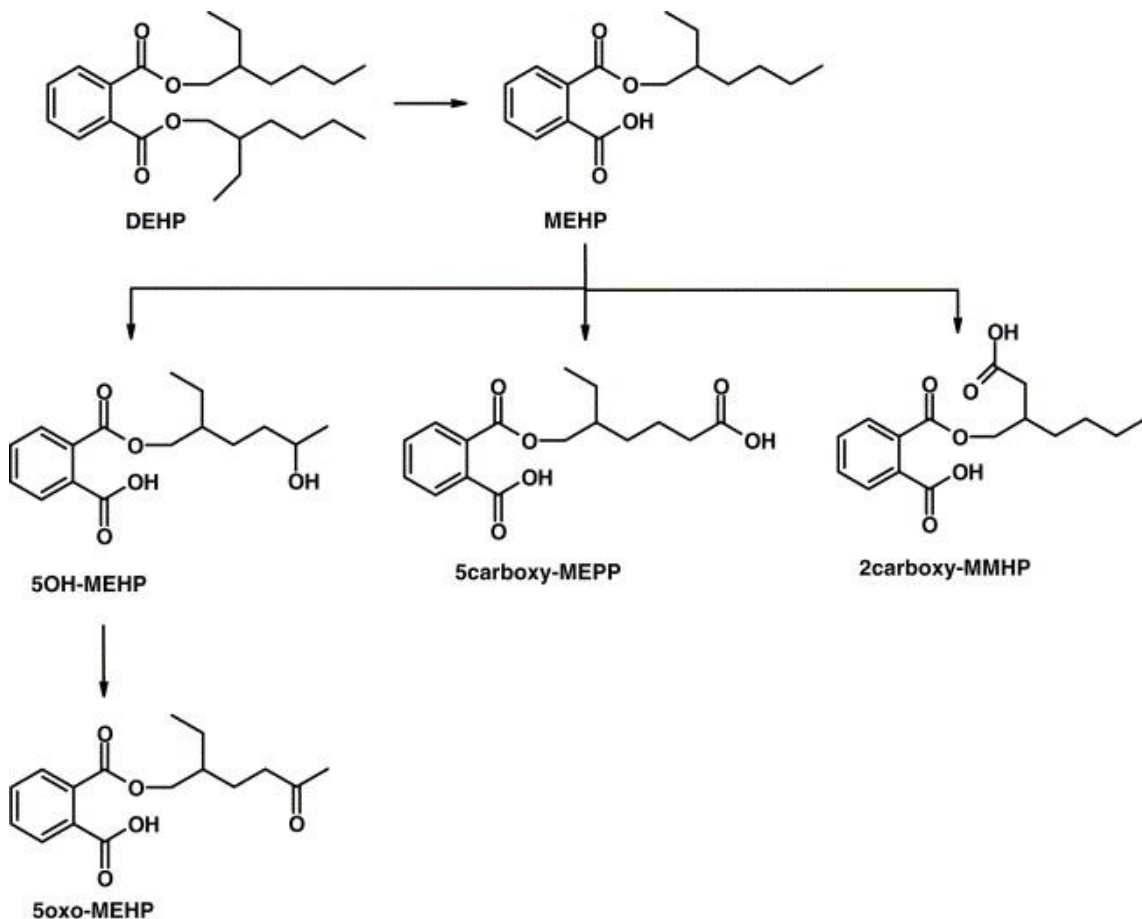


Abbildung 2: **Metabolismus von Diethylhexylphthalat (DEHP) (Preuss *et al.*, 2005).** Aufgenommenes DEHP wird zum Monoester Monoethylhexylphthalat (MEHP) gespalten, welcher in der Leber oxidiert und über den Urin als MEHP, Mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalat (5OH-MEHP), Mono-(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalat (5oxo-MEHP), Mono-(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalat (5carboxy-MEPP) und Mono(2-carboxymethylhexyl) phthalat (2carboxy-MMHP) ausgeschieden wird.

Der von der EFSA festgelegte TDI für DEHP beträgt 50 µg/kg Körpergewicht/Tag und basiert auf einer Mehrgenerationenstudie mit Sprague-Dawley-Ratten, in welcher ein NOAEL-Wert von 4,8 mg DEHP/kg Körpergewicht/Tag hinsichtlich reproduktionstoxischer Endpunkte beobachtet wurde [64]. In Ratten konnte gezeigt werden, dass Phthalatmetabolite plazentagängig sind und somit auch zum Embryo gelangen [65]. Des Weiteren sind DEHP und MEHP in humanem Nabelschnurblut [66] und Muttermilch nachweisbar [67]. Eine Querschnittsstudie aus den USA, bei welcher der Gehalt von Phthalatmetaboliten im Rahmen der *National Health and Nutrition Examination Survey* im Urin untersucht wurde, gibt an, dass in 99% der Proben Phthalatmetabolite und in 78% der aktive DEHP-Metabolit MEHP nachweisbar war [68]. Auswertungen epidemiologischer Daten belegen, dass erhöhte Konzentrationen von Weichmachern auf Phthalatbasis im Urin mit einem erhöhten BMI korrelieren [69]. Als Agonist der *peroxisome proliferator-activated receptors alpha* (PPARα) und gamma (PPARγ) beeinflusst MEHP den Energiestoffwechsel und induziert Leberkrebs in Nagetieren [70,71]. DEHP und MEHP stehen außerdem im Verdacht, reproduktionstoxische Effekte auszulösen und die Fertilität zu senken [72]. Eine adipogene Wirkung von Phthalaten konnte darüber hinaus sowohl im Tiermodell [73,74] als auch in murinen 3T3-Präadipozyten [70,73] beobachtet werden.

Im Rahmen einer Neubewertung wurde DEHP 2005 unter Einbehaltung des TDI von der EFSA als unbedenklich eingestuft [75]. Ausgehend von gemessenen Phthalatmetaboliten im Urin haben Koch *et al.* jedoch gezeigt, dass die tägliche DEHP-Aufnahme zum Teil wesentlich über dem von der Europäischen Kommission festgesetzten Grenzwert liegt [62]. Dabei zeigte sich, dass Kinder im Mittel stärker exponiert sind als Erwachsene. Werte oberhalb des 95% Perzentils überstiegen den vorgeschriebenen TDI dabei teilweise um ein Vielfaches. Besonders in der medizinischen Versorgung von Früh- und Neugeborenen stellt die Exposition mit DEHP aufgrund phthalathaltiger Medizinprodukte ein großes Problem dar [76,77]. So werden bei intensivmedizinisch behandelten Säuglingen zum Teil 100-fach erhöhte DEHP-Konzentrationen beobachtet [62].

2006 wurde die Verwendung von DEHP in Spielzeug und Babyartikeln verboten [78]. In Medizinprodukten besteht seit 2007 eine Kennzeichnungspflicht für DEHP. Seit dem 28. Oktober 2008 ist DEHP auf der sogenannten „Kandidatenliste“ der Europäischen Chemikalienagentur ECHA geführt, welche sich mit der Bewertung und Zulassung von

besorgniserregenden Chemikalien in der EU beschäftigt. DEHP wurde 2011 in der EU-Verordnung Nr. 143/2011 als reproduktionstoxisch klassifiziert und das Inverkehrbringen und der Gebrauch unterliegen ab 21. Januar 2015 einer Zulassungspflicht unter REACH [75].

1.2.7 Tributylzinn (TBT)

Organische Zinnverbindungen sind lipophil und persistent. Sie kommen in Lebensmitteln, humanen Proben [79] und Hausstaub vor [80]. Die metallorganische Zinnverbindung TBT (Abbildung 3) wird als Fungizid und Akarizid in der Ernte- und Forstwirtschaft sowie als Stabilisator und Katalysator in der Kunststoffindustrie (insbesondere PVC-Produkte) verwendet. Die Aufnahme erfolgt hauptsächlich über die Nahrung durch Lebensmittelverpackungen oder der Akkumulation in Seefischen [29,81,82]. Monobutylzinn wurde darüber hinaus sogar in Trinkwasser aus PVC-haltigen Wasserrohren nachgewiesen (4.6 ng/l) [83]. Weitere Quellen organischer Zinnverbindungen im Haushalt sind Backpapier, Windeln und Wickelunterlagen aus Polyurethan oder Polyester, Zellophanfolie, Handschuhe oder Textilien [82,84]. Die wenigen verfügbaren Human-Biomonitoring-Studien weisen auf eine mittlere Serumkonzentration von 27 nM hin (< 3-260 nM) [85]. Aufgenommenes TBT wird als Mono- bzw. Dibutylzinn in Leber, Gehirn und Fettgewebe gespeichert [86].

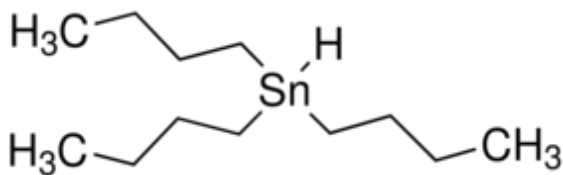


Abbildung 3: **Strukturformel des metallorganischen Tributylzinn (TBT, Sigma Aldrich).**

In tierexperimentellen Kurz- und Langzeituntersuchungen sind verschiedene toxische Wirkungen organischer Zinnverbindungen beschrieben worden, welche die Leber, das hämatologische sowie das endokrine System betreffen [82]. Diese werden auch als Ursache für die kanzerogene Eigenschaft von TBT gesehen [82]. Die Wirkungen auf das Immunsystem, insbesondere auf die Immunreaktion im *host resistance assay* (*Trichinella spiralis*), wird als einer der sensitivsten Parameter der Toxizität bei der Ratte angesehen [82].

Der TDI für TBT wurde auf Grundlage seiner immunotoxischen Wirkung in diesem Testsystem von der EFSA auf 0,27 µg/kg Körpergewicht /Tag festgelegt [75]. Aufgrund der hormonellen Aktivität, welche dazu führte, dass bei zahlreichen Tierarten fortpflanzungsunfähige Imposexe entstanden [87], wurde TBT 2003 weltweit für die Verwendung in bewuchshemmenden Schiffsanstrichen verboten.

Grun *et al.* haben TBT außerdem als Obesogen in Wirbeltieren identifiziert [31], welches bereits in nanomolarer Konzentration in der Lage ist, die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und Retinoid-X-Rezeptor alpha (RXR α) zu aktivieren [31,88]. Die dabei gemessene Dissoziationskonstante K_d , die Konzentration, bei der die Hälfte eines Liganden an einen Rezeptor bindet, liegt für RXR α bei 12,5 nM und für PPAR γ bei 20 nM [31].

Eine sechswöchige Exposition adulter Mäuse mit TBT führte zur Entstehung von Adipositas, Fettleber und erhöhten Insulin- und Leptinspiegeln im Serum [89]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TBT bereits pränatal die Fettgewebsbildung fördert und die Entstehung von Adipositas bewirkt [30,31]. Die beobachteten adipogenen Effekte von TBT werden dabei auf dessen Eigenschaft, an PPAR γ zu binden und diesen Transkriptionsfaktor zu aktivieren, zurückgeführt [30].

1.3 Adipogenese

Spätestens seit der Entdeckung von Fettgewebshormonen wie Adiponektin und Leptin gilt das Fettgewebe nicht mehr nur als Energiespeicher, sondern als endokrines Organ. Dieses gibt Hormone ab, reguliert physiologische Prozesse und ist an der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase beteiligt. Die Entstehung von Fettgewebe, als Adipogenese bezeichnet, untergliedert sich in die Prozesse der Fettzellhyperplasie und Fettzellhypertrophie. Fettzellhyperplasie bezeichnet die mengenmäßige Vermehrung von Fettzellen, also die Rekrutierung von Stammzellen zu Präadipozyten (Determinierung) sowie deren Proliferation. Unter Fettzellhypertrophie versteht man den Prozess der Ausreifung von Fettzellen, welcher durch eine steigende Akkumulation von Triglyzeriden (TG) gekennzeichnet ist. Fettzellen befinden sich in einem ständigen dynamischen Umbauprozess und erneuern ihren TG-Pool im Mittel alle 1,66 Jahre [90]. Mit steigendem Differenzierungs- und Füllungsgrad verschiebt sich das Sekretionsprofil reifer Fettzellen in Richtung inflammatorischer Zytokine wie Leptin,

Resistin und Interleukin 6, welchen eine Rolle bei der Ätiologie und damit auch der Morbidität und Mortalität zahlreicher Erkrankungen, allen voran denen des Metabolischen Syndroms, zugeschrieben wird [91].

Die Anzahl an Fettzellen bleibt im Erwachsenenalter annähernd konstant [92]. Das Ausgangsreservoir an adipogenen Vorläuferzellen, welches die Grundlage für die Entstehung von Fettgewebe bildet, wird bereits während der adipogenen Determinierung multipotenter mesenchymaler Stammzellen (MSC) gebildet [93,94]. Diese Determinierung erfolgt innerhalb sensibler Entwicklungsstadien prä- und postnatal, während der frühen Kindheit und der Pubertät [92,93].

Die Entstehung von Fettzellen erfolgt in einer Abfolge ontogenetischer Schritte (Abbildung 4). Aus pluripotenten Stammzellen entstehen über mesodermale Vorläuferzellen multipotente MSC. Diese differenzieren zu unipotenten Präadipozyten bzw. zu Chondroblasten, Osteoblasten oder Myoblasten. Präadipozyten können sich mitotisch vermehren (*mitotic clonal expansion*) und in einer anschließenden Differenzierungsphase, gesteuert durch PPAR γ und *CCAAT/enhancer-binding protein alpha* (C/EBP α), zu Adipozyten heranreifen [95].

Der Prozess der Determinierung von MSC wird über das Verhältnis von Signalmolekülen wie *delta-like 1 homolog* (DLK1, alias *Preadipocyte factor 1*), und linienspezifischen Transkriptionsfaktoren wie *Sry-related HMG box gene 9* (SOX9) und *runt-related transcription factor 2* (RUNX2) reguliert [96].

DLK1 ist ein Transmembranprotein, welches in MSC und Präadipozyten vorkommt, in reifen Adipozyten jedoch nicht mehr nachweisbar ist [96]. Es enthält eine extrazelluläre *epidermal growth factor-like* Domäne, welche nach Abspaltung vom Transmembranprotein das lösliche DLK1-Protein ergibt. Lösliches DLK1 induziert den Transkriptionsfaktor SOX9 [97], welcher an die Promotorregionen von C/EBP β und C/EBP δ bindet und so die adipogene Determinierung von MSC hemmt. Die Determinierung von MSC bildet den Ausgangspunkt für die anschließende adipogene, chondrogene oder osteogene Differenzierung [98,99].

Bei der adipogenen Differenzierung von Präadipozyten bindet C/EBP β an regulatorische Elemente der Promotorregionen von C/EBP α und PPAR γ . Der Transkriptionsfaktor

PPARg existiert in zwei Splicevarianten, PPARg1 und PPARg2, welche im Proteinkomplex als Heterodimer mit RXRa an *response elements* (PPRE) in den Promotorregionen ihrer Zielgene binden [100]. Dem Transkriptionsfaktor PPARg2 wird als Masterregulator der adipogenen Differenzierung eine besondere Rolle innerhalb der Adipogenese zugeschrieben [100,101]. C/EBPa hält die Expression von PPARg in einem positiven Schleifenmechanismus aufrecht [102]. PPARg wiederum induziert die Transkription einer Vielzahl adipozytenspezifischer Gene, was letztendlich zur Entwicklung reifer Adipozyten führt.

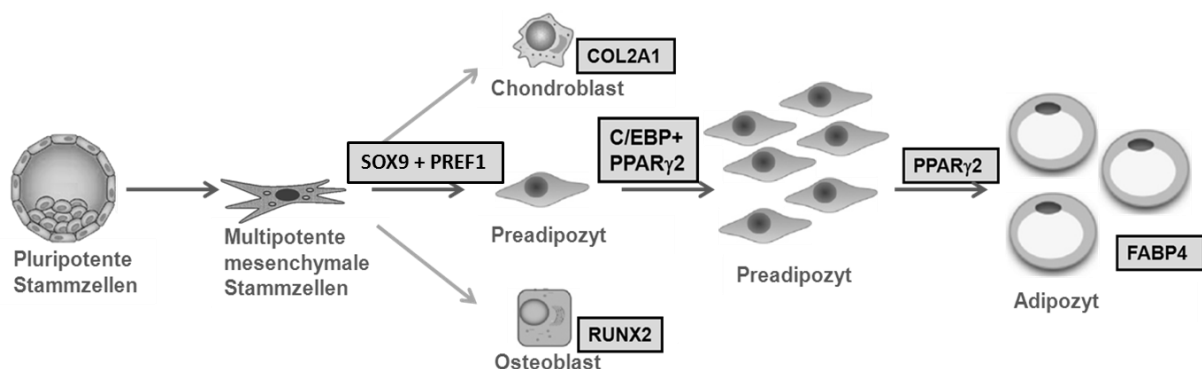


Abbildung 4: **Schematische Darstellung der Entstehung von Fettzellen.** Pluripotente embryonale Stammzellen differenzieren zu multipotenten mesenchymalen Stammzellen. Signalmoleküle wie *preadipocyte factor 1* (PREF1, alias *Delta-like 1 homolog, DLK1*) und *Sry-related HMG box gene 9* (SOX9) regulieren die Determinierung dieser Zellen. Die adipogene Differenzierung der Zellen wird durch die Aktivierung von *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP) induziert und schließlich durch *peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2* (PPARg2) reguliert. *Fatty acid binding protein 4* (FABP4), *collagen type II, alpha 1* (COL2A1) und *runt-related transcription factor 2* (RUNX2) sind Marker der adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierung.

1.3.1 Adipogene Differenzierung von embryonalen Stammzellen

Die *in vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen durchläuft verschiedene Stadien, welche mit der *in vivo* Entwicklung im Embryo vergleichbar sind [95,98]. Embryonale Stammzellmodelle eignen sich daher für die Untersuchung von Differenzierungsprozessen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien [103]. Um den Prozess der adipogenen Differenzierung abzubilden und die molekularen Mechanismen der EDC-Wirkung untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit murine pluripotente embryonale

Stammzellen der Linie CGR8 und multipotente embryonale MSC der Linie C3H10T1/2 *in vitro* zu Adipozyten differenziert.

Bisherige wissenschaftliche Untersuchungen zum Einfluss von Nahrungsmittelkontaminanten auf die Entstehung von Adipozyten verwendeten als Modell meist die murine Präadipozytenzelllinie 3T3-L1 [104,105]. Da es sich bei diesen Zellen bereits um Präadipozyten handelt, reflektieren 3T3-L1-Zellen den terminalen, durch den Transkriptionsfaktor PPAR γ gesteuerten Prozess der adipogenen Differenzierung [100]. Die Entstehung von Fettzellen beginnt jedoch bereits im Stadium der Festlegung multipotenter MSC und der Formation von Präadipozyten [98]. Durch die Verwendung embryonaler MSC bietet sich die Möglichkeit, auch diesen frühen Prozess der Adipogenese zu untersuchen [95].

C3H10T1/2-Zellen stammen aus Embryonen des Mausstammes C3H, neigen nicht zur Transformation und haben einen multipotenten Charakter [106]. Kontaktsensitiv lassen sich C3H10T1/2 in Knorpel-, Knochen-, Muskel oder Fettzellen differenzieren [95] und bieten damit die Möglichkeit, zwischen den Prozessen der adipogenen Determinierung von MSC (Proliferationsphase) und der sich anschließenden adipogenen Differenzierung zu unterscheiden (hormonelle Induktion und terminale Differenzierung). Um zu untersuchen, in welchem Stadium BPA, DEHP und TBT die adipogene Differenzierung beeinflussen, wurden C3H10T1/2 während verschiedener Phasen der adipogenen Differenzierung mit umweltrelevanten und NOAEL-orientierten Konzentrationen dieser EDC behandelt.

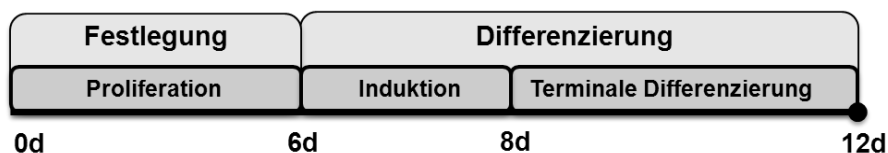


Abbildung 5: **Schematische Darstellung des adipogenen Differenzierungsprotokolls multipotenter embryonaler Stammzellen der Linie C3H10T1/2.** C3H10T1/2-Zellen wurden für 6 Tage kultiviert (Tag 0-6; Proliferation). 2 Tage postkonfluent wurde die adipogene Differenzierung induziert (Tag 6-8; Induktion) und die Zellen zu Adipozyten differenziert (Tag 8-12; Terminale Differenzierung).

Um zu untersuchen, ob die Nahrungsmittelkontaminanten BPA, DEHP und TBT die Entstehung von Adipozyten noch vor der Determinierung von MSC beeinflussen, wurde in dieser Arbeit außerdem mit der pluripotenten embryonalen Stammzelllinie CGR8 gearbeitet. Diese Zelllinie stammt aus Embryonen des Mausstammes 129 [107]. Zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz wurden diese Zellen während der Stammzellkultivierung mit dem Zytokin *leukaemia inhibitory factor* (LIF) behandelt, dessen Entfernung eine sofortige Differenzierung zur Folge hat [108]. Als pluripotente Zelllinie können CGR8-Zellen über die Formation von *embryoid bodies* (EB) in Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren. Zur adipogenen Differenzierung wurde ein Protokoll von Dani *et al.* verwendet [109]. Die Verwendung dieser pluripotenten Stammzelllinie ermöglicht es zu verstehen, in welchem Entwicklungsstadium die untersuchten EDC ihre adipogene Wirkung entfalten und welche Mechanismen dieser Wirkung zugrunde liegen.

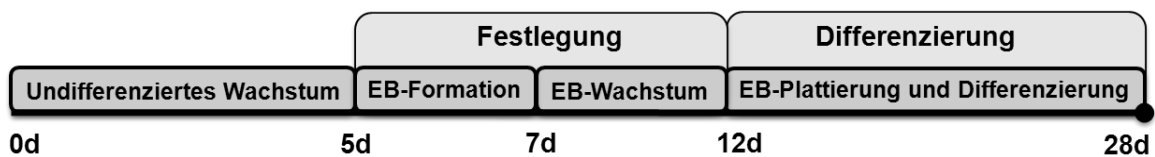


Abbildung 6: **Schematische Darstellung des adipogenen Differenzierungsprotokolls pluripotenter embryonaler Stammzellen der Linie CGR8.** Die Zellen wurden für 5 Tage kultiviert (Tag 0-5; Undifferenziertes Wachstum). Zur adipogenen Differenzierung wurden die Zellen im hängenden Tropfen aggregiert (Tag 5-7; EB-Formation). Die entstandenen *embryoid bodies* (EB) wurden in Suspension kultiviert (Tag 7-12; EB-Wachstum), ausplattiert und zu Adipozyten differenziert (Tag 12-28; Differenzierung).

2. Zielstellung der Arbeit

In Hinblick auf den weltweit steigenden Einsatz von Kunststoffen und der damit einhergehend steigenden Adipositasprävalenz, insbesondere bei Kindern und Jugendlichen, wurde der Einfluss ubiquitär vorkommender und hormonell wirksamer Umweltfaktoren wie BPA, DEHP und TBT auf die Entstehung von Adipozyten untersucht.

Durch die Verwendung der murinen embryonalen Stammzelllinien CGR8 und C3H10T1/2 war es möglich, unterschiedliche zelluläre Differenzierungsstadien der Adipogenese in einem standardisierten *in vitro* Modell zu unterscheiden. In den beiden Stammzelllinien wurde der NOAEL der EDC in Bezug auf Zytotoxizität und Zellproliferation bestimmt. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Stadien während der adipogenen Differenzierung mit umweltrelevanten Konzentrationen (10 nM BPA; 100 nM DEHP; 1 nM TBT) bzw. mit den ermittelten NOAEL-Konzentrationen (10 µM BPA; 100 µM DEHP; 100 nM TBT) behandelt. Zugrundeliegende Mechanismen der adipogenen Wirkung der EDC wurden mittels molekularbiologischer Methoden untersucht. Die Differenzierungseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie, TG-Quantifizierung und *Oil-Red-O*-Färbung analysiert. Mittels Real-time RT-PCR wurde außerdem der Einfluss der EDC auf Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren der mesenchymalen Determinierung und der adipogenen Differenzierung bestimmt.

Folgende Fragen wurden dabei bearbeitet:

- Können Stammzellen DEHP in den aktiven Metaboliten MEHP umwandeln?
- Haben BPA, DEHP und TBT in embryonalen Stammzellen einen Einfluss auf die Entstehung von Adipozyten?
- Ist der Einfluss dieser EDC auf die Entstehung von Adipozyten konzentrationsabhängig?
- Ist die adipogene Wirkung der EDC vom Zeitpunkt der Exposition während der Fettzellreifung abhängig?

Ausgehend von dem Ergebnis, dass TBT ein potentes Obesogen ist, dessen Wirkung alle untersuchten Stadien der adipogenen Zelldifferenzierung erfasst, wurde der molekulare Wirkmechanismus von TBT genauer analysiert.

Da TBT PPAR γ , den Masterregulator der adipogenen Differenzierung, in nanomolarer Konzentration als Ligand aktiviert, wurde die Rolle von PPAR γ 1 und PPAR γ 2 in der TBT-induzierten adipogenen Differenzierung von C3H10T1/2-MSC in unterschiedlichen Stadien der Adipogenese untersucht. Um zu ermitteln, durch welche Mechanismen die adipogene Wirkung von TBT während der Determinierungsphase von MSC vermittelt wird, wurde die mRNA-Expression von PPAR γ mittels siRNA gehemmt. Der Einfluss von TBT auf die Entstehung von Adipozyten sowie auf Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren wie DLK1 und SOX9, welche die Determinierung von MSC regulieren, wurde in Relation zum klassischen PPAR γ -Aktivator Rosiglitazon analysiert.

Dabei wurde folgende Fragestellung bearbeitet:

- Welchen Einfluss hat TBT auf PPAR γ , speziell auf PPAR γ 2, den Masterregulator der adipogenen Differenzierung?
- Wird der adipogene Effekt von TBT durch PPAR γ vermittelt?
- Wird die adipogene Wirkung von TBT durch einen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus vermittelt?
- Über welchen Mechanismus steigert TBT die adipogene Festlegung von MSC?

3. Material und Methoden

Verbrauchsmaterialien

Wenn nicht anders gekennzeichnet, stammen die verwendeten Materialien, Geräte und Software aus der Bundesrepublik Deutschland.

2-Mercaptoethanol	Serva GmbH, Heidelberg
3-Isobutyl-1-methylxanthin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Agar-Agar	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bradford Protein Assay-Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BPA	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Cryotubes	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht
DAPI	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Deckgläschen	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DEHP	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Dexamethason	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
DNA-Leiter	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNase I	Life Technologies GmbH, Darmstadt
dNTP-Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Dual-Glo® Luciferase Assay	Promega GmbH, Mannheim
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
EAA	Invitrogen, Karlsruhe
ECL-Detektionsreagenz	Merck KGaA, Darmstadt

Eindeckelmedium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Einwegspritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Eisessig	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
EZ4U-Kit	Biomedica, Wien, Österreich
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
FCS	Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Gelextraktion-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Gelatine	Invitrogen, Karlsruhe
GMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Serva GmbH, Heidelberg
Guanidiniumthiocyanat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Insulin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Keramikkügelchen 1,4 mm	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
LIF	Millipore, Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
MACS® Dissociation-Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mycoplasma Test-Kit	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumacetat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Na-Pyruvat	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Natriumlaurosylsarcosinat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NEAA	Invitrogen, Karlsruhe
Nilrot	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Objektträger	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

ON-TARGETplus siRNA	Fisher Scientific, Schwerte
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
PBS	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Pepton	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin /Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Phosphatase-Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Plasmid-Miniprep-Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pGEM®-T Vektor-Kit	Promega GmbH, Mannheim
Ponceau S	Serva GmbH, Heidelberg
Primer	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
PGL2-Vektor	Promega GmbH, Mannheim
pRL-SV40-Vektor	Promega GmbH, Mannheim
Protease Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Retinsäure	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Reverse Transkriptase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNase Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim
Rosiglitazon	Cayman Chemicals, Biomol GmbH, Hamburg
SDS	Serva GmbH, Heidelberg
Sequenzier-Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
siRNA Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SYBR® Green Mastermix	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Taq-DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
TBT	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
TEMED	Serva GmbH, Heidelberg

Transfektionsreagenz	Promega GmbH, Mannheim
Triglycerides FS-Kit	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim
Tris-Base	Serva GmbH, Heidelberg
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Serva GmbH, Heidelberg
Tween 20	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Ziegenserum	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Geräte

Durchflusszytometer	BD FACS Vantage®; BD Biosciences, Heidelberg
ELISA Plattenreader	SLT Labinstruments, Crailsheim
Fluoreszenzmikroskop	BZ 8000; Keyence GmbH, Neu-Isenburg
Gewebehomogenisator	Precellys®24; Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gelkammern	Invitrogen, Karlsruhe & Biometra, Göttingen
Inkubatoren	Haereus GmbH, Hanau
Kühlzentrifugen	Haereus GmbH, Hanau
Lumineszenzdetektor	Infinite®2000 Plattenreader; Tecan GmbH, Crailsheim
Neubauer-Zählkammer	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Real-time PCR-Cycler	StepOnePlus®; Life Technologies GmbH, Darmstadt
Spektralphotometer	NanoVue; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Thermocycler	TRIO-Thermoblock; Biometra, Göttingen
Ultraschallhomogenisator	Sonoplus HD; Bandelin, Berlin
UV-Detektionssystem	LTF Labortechnik, Wasserburg

Zell-Dissoziator GentleMAC® Dissociator, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Software

Blast-Software National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA

Durchflusszytometrie FACSDiva® Version 5.0.3; BD Biosciences, Heidelberg

Fluoreszenzmikroskopie BZ-Analyzer; Keyence GmbH, Neu-Isenburg

Geldokumentationssoftware VWR International GmbH, Darmstadt

Lichtmikroskopie NIS-Elements; Nikon GmbH, Düsseldorf

Primerdesign Primer3Plus; Free Software Foundation, Boston, MA, USA

Statistikprogramm SigmaPlot v.11.0; Systat Software GmbH, Ekrath

3.1 Zelllinien und Zellkultur

In dieser Studie wurde der adipogene Einfluss von BPA, DEHP und TBT in einer multipotenten murinen embryonalen Fibroblasten- und einer pluripotenten murinen embryonalen Stammzelllinie, C3H10T1/2 [106] und CGR8 [107], untersucht.

3.1.1 C3H10T1/2-Zellen

3.1.1.1 Kultivierung der C3H10T1/2

C3H10T1/2-Zellen (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) wurden auf 94 mm-Zellkulturschalen in MSC-Kulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und subkonfluent alle 48 Stunden passagiert. Dafür wurde verbrauchtes Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (37°C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin und 0,05% EDTA in 37°C erwärmtem PBS behandelt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen durch Klopfen gelöst, in 5 ml frischem Medium vereinzelt und mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurden je 2×10^5 Zellen auf neue Zellkulturschalen ausgesät.

MSC-Kulturmedium

DMEM	89 ml
FCS (hitzeinaktiviert)	10 ml
Penicillin/Streptomycin(100 x)	1 ml

3.1.1.2 Adipogene Differenzierung der C3H10T1/2

Zur adipogenen Differenzierung (Abbildung 5) wurden 2×10^5 C3H10T1/2-Zellen (Passage 11-14) ausgesät. Das Medium wurde alle 48 Stunden ersetzt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach 6 Tagen wurde ein 2-Tage postkonfluenten Wachstumszustand erreicht (Proliferationsphase). Zur adipogenen Differenzierung wurden die Zellen für 48 Stunden mit adipogenem MSC-Induktionsmedium versetzt (Induktionsphase). Anschließend wurden die

Zellen für weitere 48 Stunden mit 10 µg/ml Insulin behandelt und in den folgenden 48 Stunden ohne Zusätze zu Adipozyten differenziert (terminale Differenzierung).

MSC-Induktionsmedium

MSC-Kulturmedium	100 ml
Insulin	10 µg/ml
Dexamethason	1 µM
3-Isobutyl-1-methylxanthin	500 µM

3.1.1.3 Vereinzlung der C3H10T1/2

Die Zellen wurden enzymatisch mittels Trypsin vereinzelt, wobei die Trypsininaktivierung mit 10% FCS in 75% PBS erfolgte. Durch Pipettieren erfolgte eine zusätzliche manuelle Vereinzlung. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert, der FCS-haltige Überstand abgenommen und die Zellen in 1 ml 75% PBS aufgenommen. Für eine sich anschließende Triglyzerid (TG)-Bestimmung und Durchflusszytometrie (FACS) wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.1.2 CGR8-Zellen

3.1.2.1 Kultivierung der CGR8

Pluripotente, embryonale Zellen der Linie CGR8, welche aus 3,5 Tage alten Mausblastozysten stammen, wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau Prof. Anna Wobus (Leibnizinstitut für Pflanzengenetik, Gatersleben) bezogen. CGR8-Zellen wurden auf 0,5% gelatinebeschichteten (doppelautoklaviert) Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 24 Stunden wurden 1×10^5 CGR8-Zellen mittels 0,25% Trypsin und 0,01% EDTA in 5 ml ESC-Kulturmedium subkultiviert. Zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz wurde das Medium mit 1.000 U/ml *Leukemia inhibitory factor* (LIF) komplettiert.

ESC-Kulturmedium

GMEM	83 ml
FCS (hitzeinaktiviert)	10 ml
L-Glutamin (200 mM)	1 ml
EAA (50 x)	2 ml
NEAA (100 x)	1 ml
Na-Pyruvat (100 mM)	1 ml
2-Mercaptoethanol	1 ml
Penicillin/Streptomycin (100 x)	1 ml

3.1.2.2 Adipogene Differenzierung der CGR8

CGR8-Zellen wurden 5 Tage subkultiviert. Zur adipogenen Differenzierung (Abbildung 6) wurden die Zellen trypsiniert und in adipogenem ESC-Differenzierungsmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt und 1×10^3 Zellen/20 μ l Zellsuspension auf die Deckelunterseite von 94 mm-Petrischalen getropft. Die Tropfen wurden hängend für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die entstandenen Zellaggregate, *embryoid bodies* (EB), wurden mit ESC-Differenzierungsmedium von den Deckeln gespült und als Suspensionskultur (50 EB/10 ml) für weitere 3 Tage inkubiert. Dabei wurden die EB alle 24 Stunden mit 0,1 μ M Retinsäure behandelt, um die mesenchymale Differenzierung zu induzieren. Anschließend wurden die EB in ESC-Induktionsmedium überführt und weitere 48 Stunden ohne Retinsäure inkubiert. Durch Zugabe von 85 nM Insulin und 2 nM Triiodthyronin wurde das ESC-Induktionsmedium zu adipogenem Differenzierungsmedium komplettiert. Anschließend wurden 10 EB/5 ml adipogenem Differenzierungsmedium in gelatinebeschichteten Zellkulturschalen ausplattiert und innerhalb von 16 Tagen zu Adipozyten differenziert, wobei das Medium im Abstand von 2 Tagen gewechselt wurde.

ESC-Differenzierungsmedium

GMEM	74 ml
FCS (hitzeinaktiviert)	20 ml
L-Glutamin (200 mM)	1 ml
EAA (50 x)	2 ml
Na-Pyruvat (100 mM)	1 ml
2-Mercaptoethanol	1 ml
Penicillin/Streptomycin (100 x)	1 ml

3.1.2.3 Vereinzelnung der Stammzellaggregate

Die Vereinzelnung der EB erfolgte entsprechend der Anweisung des Herstellers (MACS™ Dissociation Kit). Die EB wurden mit PBS gewaschen, nach Zugabe von 2 ml des vorgewärmten Enzymmix 1 in gentleMACS-C-Tubes überführt und rotierend für 15 Minuten inkubiert. Mittels gentleMACS-Dissociator und Enzymmix 2 wurden die EB in eine Einzelzellsuspension aufgetrennt. Die Einzelzellsuspension wurde in 75% PBS aufgenommen und für die nachfolgende TG-Bestimmung und Durchflusszytometrie verwendet.

3.1.3 Kryokonservierung

Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Dafür wurden die Zellen enzymatisch vereinzelt (Kap. 3.1.1.1, 3.1.2.1), in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (300 g, 5 Minuten). Der Überstand wurde abgenommen und je 1×10^6 C3H10T1/2-Zellen in 2 ml MSC-Kulturmedium, komplettiert mit 8% DMSO, in Kryoröhrchen aliquotiert. Zur Kryokonservierung von CGR8-Zellen wurde das ESC-Kulturmedium zusätzlich mit 20% FCS versetzt. Die Zellsuspension wurde in Kryoeinfriergefäßen langsam auf -80°C (mit $1^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$) abgekühlt. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Zur Entfernung von DMSO wurde die Zellsuspension in ein mit 10 ml Kulturmedium befülltes Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 300 g abzentrifugiert, das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert und die Zellen kultiviert.

3.1.4 Behandlung der Zellen mit BPA, DEHP und TBT

Die EDC BPA, DEHP und TBT wurden in DMSO gelöst. Folgende Konzentrationen wurden erreicht: BPA (2 µM, 20 µM, 200 µM, 2 mM, 20 mM, 200 mM, 2 M), DEHP (2 µM, 20 µM, 200 µM, 2 mM, 20 mM, 200 mM), TBT (2 µM, 10 µM, 20 µM, 100 µM, 200 µM, 1 mM). Bei den im Ergebnisteil beschriebenen Expositionsversuchen wurden die Stammlösungen 2.000-fach in Zellkulturmedium verdünnt, so dass immer mit 0,05% DMSO gearbeitet wurde. Korrespondierende Kontrollen wurden als Lösungsmittelkontrolle analog mit 0,05% DMSO versetzt.

3.1.5 Proliferations- und Zytotoxizitätsassay

Für die Bestimmung der Proliferations- und Zytotoxizität von BPA, DEHP und TBT wurde der EZ4U Cell Proliferation Assay entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Dieser MTT-Test basiert auf der Reduktion eines schwach gefärbten Tetrazoliumsalzes in ein intensiv gefärbtes Formazanderivat durch die mitochondriale Aktivität lebender Zellen. Der Test wurde während der Proliferationsphase durchgeführt und erlaubt einen Rückschluss auf die Proliferationsrate der Zellen. Eine Verringerung der mitochondrialen Aktivität durch Zugabe von Agenzien deutet auf eine verminderte Proliferation hin. Bei einer extrem verminderten mitochondrialen Aktivität kann von einer zytotoxischen oder proliferationshemmenden Wirkung ausgegangen werden.

Für den Assay wurden 1×10^3 Zellen der Zelllinien C3H10T1/2 und CGR8 ausgezählt und auf unbeschichtete (C3H10T1/2) beziehungsweise gelatinebeschichtete (CGR8) 96-Well-Mikrotiterplatten in 200 µl Kulturmedium ausgesät. Das Kulturmedium wurde dafür mit BPA (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM), DEHP (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM), TBT (1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM) oder 0,05% DMSO (Lösungsmittelkontrolle) versetzt. Um Effekte des DMSO auszuschließen, wurde als zusätzliche Kontrolle mit Kulturmedium ohne DMSO-Zusätze gearbeitet. Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Substrat hinzugegeben (20 µl/Well) und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Substratumsatz wurde durch die Messung der Extinktion bei 450 nm und 620 nm als Referenz

spektralphotometrisch bestimmt. Die ermittelten Werte der Kontrollgruppe ohne DMSO-Behandlung wurden als Standardproliferation 100% gesetzt.

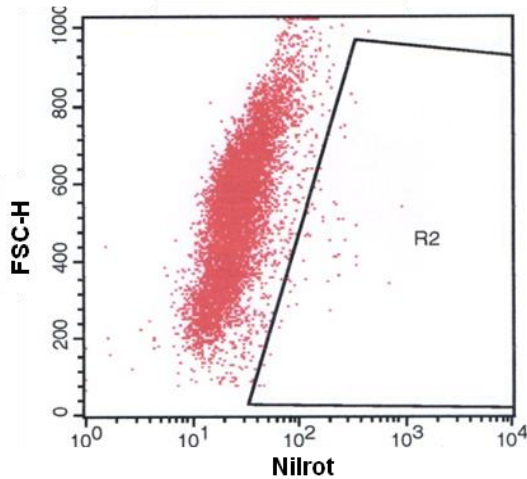
3.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Bestimmung der Adipozytenanzahl wurde die aus CGR8 und C3H10T1/2 generierte Einzelzellsuspension (Kap. 3.1.1.3, 3.1.2.3) mittels Durchflusszytometrie nach Knelangen und Schädlich [110] analysiert. Die vereinzelt Zellen wurden ausgezählt, filtriert, in 75% PBS aufgenommen (5×10^5 Zellen/ml) und für 5 Minuten mit 2,5 µl/ml Nilrot inkubiert (100 µg/ml DMSO). Dieser lipophile Farbstoff reichert sich in den intrazellulären Lipidvesikeln an. Die Zellen wurden anschließend 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert und der nilrothaltige Überstand wurde abgenommen. Die Zellen wurden in 75% PBS aufgenommen und lichtgeschützt auf Eis gelagert.

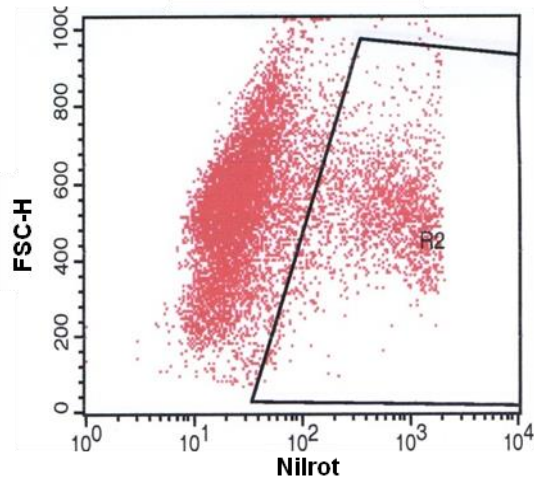
Die sich anschließenden FACS-Analysen wurden in Kooperation mit Herr Dr. Alexander Navarrete Santos (Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle) und Frau Dr. Dagmar Riemann (Institut für Medizinische Immunologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle) durchgeführt. Das dafür verwendete Durchflusszytometer (FACS Vantage™) ist mit drei Lasern (351, 488 und 633 nm) ausgestattet. Der Farbstoff Nilrot wurde bei 488 nm angeregt und das Signal mittels des Bandbreitenfilters BP-585/42 aufgenommen. Gleichzeitig wurde mit Hilfe des Vorwärtsstreulichts die Größe und mittels Seitwärtsstreulicht die Granularität der Zellen bestimmt. Charakteristischerweise erzeugen große Zellen dabei ein starkes Vorwärtsstreulicht, wohingegen granulierten Zellen ein vermehrtes Seitwärtsstreulicht bilden. Daher können mit dem Verfahren der Durchflusszytometrie Zellpopulationen im Punktdiagramm unterschieden und Zelltrümmer, tote Zellen sowie Zellaggregate aus der Analyse ausgeschlossen werden. Anhand des Nilrotgehalts und der Größe der Zellen (Vorwärtsstreulicht, FSC-H), wurde der prozentuale Adipozytenanteil ermittelt. Positiv sortierte Zellen wurden nach Kernfärbung mittels 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) in einer 120-fachen Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop zur Verifizierung untersucht (Abbildung 7). DAPI interkaliert mit Nukleinsäuren der DNA und lagert sich bevorzugt an Adenin-Thymin-reiche Regionen an. In

Verbindung mit doppelsträngiger DNA liegt das Absorptionsmaximum von DAPI bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm.

A)



B)



C)

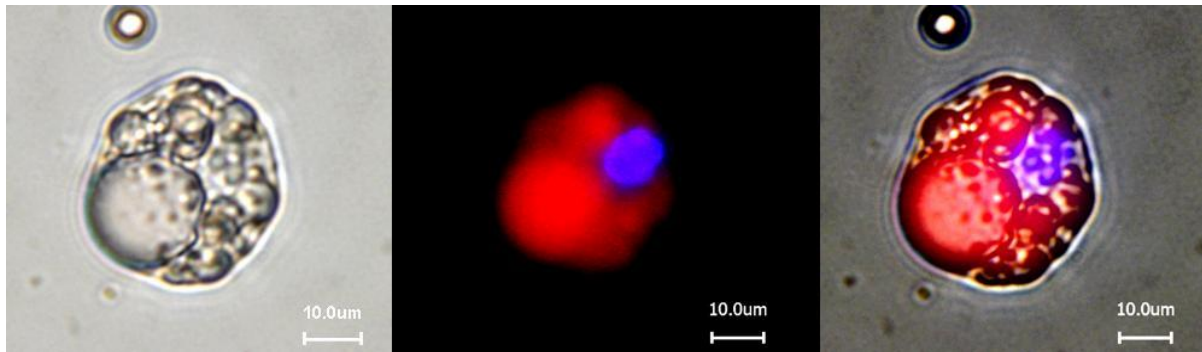


Abbildung 7: **Bestimmung der Fettzellmenge und Darstellung eines positiv sortierten Adipozyten.** (A) Nicht-differenzierte und (B) adipogen-differenzierte C3H10T1/2-Zellen. (C) Adipozyt nach Nilrot- und DAPI-Färbung bei 120-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop. FSC-H=Vorwärtsscatter, Nilrot=Farbstoff, Links: Hellfeld, Mitte: Fluoreszenz, Rechts: Overlay. Maßstab \triangleq 200 μ m.

3.3 Triglyzeridbestimmung

Die quantitative Bestimmung des TG-Gehalts erfolgte mit Hilfe eines enzymatischen Tests. Der Test beruht auf einer enzymatischen Freisetzung von Glycerin durch Abspaltung der

Fettsäuren mittels Lipoproteinlipase. Frei werdendes Glycerin wird enzymatisch zu Glycerin-3-Phosphat umgesetzt, welches in einer Folgereaktion zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert wird. Das bei diesem Reaktionsschritt entstehende H_2O_2 wird in Gegenwart einer Peroxidase mit Phenol und 4-Aminophenazon zu Chinonimin, einem roten Farbstoff, umgesetzt. Anhand einer Eichreihe wurde die TG-Konzentration spektralphotometrisch bei 546 nm bestimmt.

Für die TG-Bestimmung wurden 2×10^5 Zellen mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in 1 ml PBS aufgenommen. Zur Isolation der Gesamtlipide wurden die Zellen im Ultraschallbad aufgeschlossen, mit 200 μ l Chloroform versetzt und 24 Stunden geschüttelt. Das Gemisch wurde für 1 Minute bei 8.000 g zentrifugiert, die lipidhaltige Chloroformphase abgenommen und Lösungsmittelreste über Nacht verdampft. Die Proben wurden anschließend mit 20 μ l Triton X-100 /Chloroform (1:1) versetzt. Nach Verdampfen des Chloroforms wurde die TG-Menge enzymatisch mittels Triglycerides FS-Kit bestimmt.

3.4 Genexpressionsanalyse mittels Real-time RT-PCR

3.4.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi [111]. Die Zellen wurden dafür in 500 μ l TRIzol® aufgenommen und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit 1,4 mm Keramikkügelchen im Homogenisator (2 x 15 Sekunden, 5.000 g) aufgeschlossen. Anschließend wurden 100 μ l Chloroform hinzugegeben, gemischt und für weitere 3 Minuten bei RT inkubiert. Die Phasentrennung wurde mittels 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 g und 4°C unterstützt. Die wässrige Phase wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene RNA durch Zugabe von 250 μ l Isopropanol bei RT für 10 Minuten ausgefällt. Der isopropanolhaltige Überstand wurde nach Zentrifugation für 25 Minuten bei 13.000 g und 4°C abgenommen. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und für 10 Minuten bei 13.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des ethanolhaltigen Überstandes wurde die RNA in 20 μ l DEPC-Wasser resuspendiert.

DEPC-Wasser

DEPC	1 ml
<i>aqua dest.</i>	1 l

Die Lösung wurde für 4 Stunden bei RT inkubiert und anschließend zur DEPC-Inaktivierung autoklaviert.

3.4.1.1 RNA-Quantifizierung und Visualisierung

Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde bei 280 nm die Proteinmenge ermittelt. Der Quotient der gemessenen optischen Dichte von $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm sollte dabei zwischen 1,7-2,0 liegen. Die Integrität der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines 1,2% Agarosegels elektrophoretisch mittels UV-Detektionssystem überprüft. Dabei wurden die für RNA typischen Doppelbanden (entsprechend der ribosomalen Untereinheiten) nachgewiesen.

3.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA

Großporige Agarosegele eignen sich zur analytischen und präparativen Trennung von RNA- und DNA-Fragmenten (PCR-Produkte, Plasmide, Restriktionsfragmente). Diese wandern in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch ein Gleichspannungsfeld. Es wurden Agarosegele zwischen 1,2 und 2,0 % Agarose (w/v) mit TAE-Puffer in DEPC- (RNA) oder Reinstwasser (DNA) und 0,001 % Ethidiumbromid hergestellt. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert bei Anregung durch UV-Strahlung. Die Auftrennung erfolgte in einer Gelkammer mit 1 x TAE-Puffer. Für die Auftrennung von RNA wurde ein 1,2% Agarosegel, für die Auftrennung von DNA je nach zu erwartender Bandengröße ein 1,5-2% Agarosegel verwendet. Zur Bestimmung der Größe der RNA- oder DNA-Fragmente wurde zusätzlich eine 100 bp DNA-Leiter aufgetragen. Zur Probenvorbereitung wurden RNA- und DNA-Proben mit einem bromphenolblauhaltigen Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte mit einer Stromstärke von 70 mA. Die Auswertung erfolgte qualitativ mittels UV-Detektionssystem.

10 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA; pH 8,0)

Tris-Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5M, pH 8,0)	100 ml
<i>aqua dest.</i>	ad 5 l

Agarosegel (1,2-2%)

Agarose	1,2-2 g
TAE-Puffer (10 x)	10 ml
DEPC- oder Reinstwasser	90 ml
Ethidiumbromid	3 µl

3.4.3 DNase-Behandlung

Die Beseitigung möglicher DNA-Reste erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers mittels des Ambion TURBO DNA-free-Kit. Dazu wurden 3 µg RNA in 10 µl DEPC-Wasser mit 1 µl DNase versetzt und für 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Enzym durch eine Stopplösung inaktiviert, die RNA nach 1-minütiger Zentrifugation bei 13.000 g zurückgewonnen und die Konzentration der RNA erneut spektralphotometrisch bestimmt. Der Abbau genomischer DNA wurde anhand einer PCR, welche das Haushaltsgen GAPDH nachweist, sowie anschließender Gelelektrophorese überprüft.

DNase-Verdau

RNA	3 µg
DEPC-H ₂ O	ad 10 µl
DNase I Puffer (10 x)	1,2 µl
DNase I (2 U/µl)	1 µl
Stopplösung	1,5 µl

3.4.4 Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion

Die Synthese eines zur RNA komplementären DNA-Strangs (cDNA) wird als Umkehrreaktion der RNA-Transkription verstanden. Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wurde aus der zuvor isolierten RNA ein cDNA-Strang synthetisiert. Zur Herstellung dieser cDNA wurde 1 µg der aufgereinigten RNA in 11,5 µl DEPC-H₂O mit 1 µl Random-Primer (60 µM) versetzt und für 10 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Hierdurch wurden einerseits Sekundärstrukturen der RNA aufgeschmolzen, andererseits erfolgte die Anlagerung der

Primer. Nach Zugabe des RT-Ansatzes wurden die Proben im Thermocycler zuerst für 10 Minuten bei 20°C und im Weiteren für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Mittels 10-minütiger Hitzeinaktivierung bei 70°C wurde die Reaktion gestoppt. Die erhaltene cDNA wurde mit PCR-Wasser auf 100 µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert. Die Verifizierung der erfolgreichen cDNA-Synthese erfolgte mittels 18S rRNA-PCR (Kap. 3.4.4.1).

RT-Ansatz

Reaktionspuffer (5 x)	4 µl
dNTP-Mix (10mM)	2 µl
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
Reverse Transkriptase	1 µl

RT-Protokoll

10 Minuten 25°C
50 Minuten 42°C
10 Minuten 70°C
Kühlung 4°C

PCR-Wasser

1 ml Reinstwasser
30 Minuten UV-Bestrahlung
Autoklavierung

3.4.4.1 Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Für den qualitativen Nachweis bestimmter Genprodukte wurde die Methode der PCR verwendet. Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung einer definierten DNA-Sequenz durch Anlagerung zweier Oligonukleotide (Primer), welche komplementär zur amplifizierenden Sequenz sind. Die Reaktion ist durch mehrere sich wiederholende Zyklen gekennzeichnet, wobei in jedem Zyklus eine Denaturierung der doppelsträngigen Template-DNA (95°C), die Anlagerung der komplementären genspezifischen Primer (60°C) und die Verlängerung der Primer durch die thermostabile DNA-Polymerase (Elongation, 72°C) stattfindet. Die gebildeten PCR-Produkte wurden durch Auftrennung im Agarosegel anhand ihrer Größe (Kap. 3.4.2) und durch anschließende Sequenzierung (Kap. 3.5) hinsichtlich der genauen Basenabfolge überprüft.

RT-PCR-Ansatz

Reaktionspuffer (10 x)	5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
Primer fw (10 pM)	1 µl
Primer rw (10 pM)	1 µl
Taq-DNA Polymerase (5U/µl)	0,25 µl
cDNA Template	1 µl
PCR-Wasser	40,75 µl

RT-PCR-Protokoll

3 Minuten 95°C

40 Zyklen:

1 Minuten 95°C Denaturierung

1 Minuten 60°C Annealing

1 Minuten 72°C Elongation

10 Minuten 72°C

3.4.4.2 Primer für die PCR

Zur selektiven Amplifizierung bestimmter mRNA-Sequenzen wurden Primer mittels Primer3Plus Software erstellt [112]. Als Grundlage wurden die in der NCBI-Datenbank hinterlegten murinen mRNA-Sequenzen der zu amplifizierenden Gene genutzt. Die Primer wurden so gelegt, dass sie eine optimale Annealingtemperatur bei 60°C aufwiesen, die Anteile an den Nukleotiden möglichst gleichverteilt waren und das amplifizierte Produkt möglichst eine Intron-Exon-Grenze enthielt. Die Primer wurden so designt, dass sie für den Nachweis aller bekannten Transkriptvarianten des jeweiligen Gens geeignet waren (Tabelle 1). Für den Nachweis von Pparg-mRNA wurde zwischen den beiden Isoformen Pparg1 und Pparg2 unterschieden, da Pparg2 als spezifischer Marker der adipogenen Differenzierung genutzt wurde, wohingegen Pparg1 in fast allen Geweben exprimiert wird.

Tabelle 1: Liste der Primersequenzen für die RT-PCR

Name	Sequenz (5'→3')	bp	Intron/Exon
18S NR_003278.3	F: AGA AAC GGC TAC CAC ATC CAA R: CCT GTA TTG TTA TTT TTC GTC ACT ACC T	91	nein
Adipoq NM_009605.4	F: TGT TGG AAT GAC AGG AGC TG R: CGA ATG GGT ACA TTG GGA AC	147	nein
Col2a1 (1,2) NM_031163.3 NM_001113515.2	F: CAG AGG TGA TCG TGG TGA CA R: CCT TCT CGT CAT ACC CTC CA	176	ja ja
Fabp4 NM_024406.2	F: TGG AAG CTT GTC TCC AGT GA R: TCG ACT TTC CAT CCC ACT TC	283	ja
Lpl NM_008509.2	F: GTC GAA GTA TTG GAA TCC AG R: AGC AGG GAG TCA ATG AAG AG	187	ja
Ppara (1,2) NM_011144.6 NM_001113418.1	F: ATG CCA GTA CTG CCG TTT TC R: GGC CTT GAC CTT GTT CAT GT	220	ja ja
Pparg1 NM_001127330.1	F: CGG TGA ACC ACT GAT ATT CAG G R: CAA AGG AAT GCG AGT GGT CT	152	ja
Pparg2 NM_011146.3	F: CTC CTG TTG ACC CAG AGC AT R: AAT GCG AGT GGT CTT CCA TC	153	ja
Dlk1 (1-4) NM_010052.5 NM_001190703.1 NM_001190704.1 NM_001190705.1	F: AGA AAG GCC AGT ACG AAT GCT CCT R: TTG CGG CTA CGA TCT CAC AGA AGT	198	ja ja ja ja
Runx2 (1-3) NM_001146038.1 NM_001145920.1 NM_009820.4	F: CGC ATT CCT CAT CCC AGT AT R: TGG CTC AGA TAG GAG GGG TA	176	ja ja ja
Sox5 (1-3) NM_011444.3 NM_001113559.2 NM_001243163.1	F: GCC ATG GAA TGA TGG ATT TC R: AGG CCT GAA GGA TTT TCC TC	177	ja ja ja
Sox6 (1-3) NM_011445.3 NM_001025559.2 NM_001025560.1	F: CAG CGT TCT GTC ATC TCA GC R: TCT CCT CCA GCT TCT TCT GC	215	ja ja ja
Sox9 NM_011448.4	F: AAG TCG GTG AAG AAC GGA CAA R: GCG CCT TGA AGA TAG CAT TAG G	82	nein

3.4.4.3 Quantitative Real-time RT-PCR

Die quantitative Bestimmung von mRNA-Transkriptmengen wurde mittels Real-time RT-PCR durchgeführt. Dabei wird die amplifizierte DNA-Menge mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green in jedem PCR-Zyklus detektiert. Die PCR wurde für 5 Minuten bei 95°C initialisiert. Die folgenden 40 Zyklen bestanden jeweils aus einer Denaturierungs- (15 Sekunden, 95°C), Primer-Anlagerungs- (15 Sekunden, 60°C) und Elongationsphase (20 Sekunden, 72°C). Der Ansatz wurde in Doppelbestimmung durchgeführt und Kontaminationen wurden durch das Mitführen einer PCR-Wasser-Kontrolle erfasst. Die PCR-Produkte wurden durch Analyse der Schmelzkurve, mittels DNA-Gelelektrophorese (Kap. 3.4.2) und durch Sequenzierung der entstandenen DNA-Fragmente (Kap. 3.5) verifiziert.

Für die Quantifizierung der enthaltenen mRNA-Transkriptmengen wurde mit den von der Analysesoftware ausgegebenen *cycle threshold* (Ct)-Werten gearbeitet. Der Ct-Wert beschreibt den PCR-Zyklus an dem die exponentielle Zunahme des Fluoreszenzsignals erstmals über den Hintergrundwert ansteigt. Der Ct-Wert liefert somit eine quantitative Aussage über die Menge eines spezifischen Genprodukts. Die spezifische mRNA-Transkriptmenge der cDNA wurde anhand einer Verdünnungsreihe primerspezifischer Plasmid-DNA bekannter Konzentration ermittelt (Kap. 3.5). Zur Normalisierung der cDNA-Syntheseeffizienz wurde 18S rRNA als Standard amplifiziert.

Real-time RT-PCR -Ansatz

SYBR® Green Mastermix (2 x)	10 µl
Primer fw (10 pM)	1 µl
Primer rw (10 pM)	1 µl
cDNA Template	2 µl
PCR-Wasser	6 µl

Real-time RT-PCR -Protokoll

5 Minuten 95°C

40 Zyklen:

15 Sekunden 95°C Denaturierung

15 Sekunden 60°C Primer-Anlagerung

20 Sekunden 72°C Elongation + SYBR® Green Detektion

10 Minuten 72°C

Schmelzkurvenanalyse

3.5 Klonierung und Sequenzierung

3.5.1 Isolation und Ligation von DNA-Fragmenten

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte wurden entsprechend ihrer spezifischen Größe aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Das PCR-Produkt wurde mittels des QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dabei wird DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silica-Membran adsorbiert und Verunreinigungen werden durch Waschen entfernt. Die DNA wurde anschließend in 30 μ l *aqua dest.* eluiert. Für die Ligation wurde das pGEM[®]-T-Vektor Kit verwendet. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend für die Transformation eingesetzt.

Ligation

Vektor (50 ng)	1 μ l
Rapid Ligation Buffer (2 x)	10 μ l
PCR-Produkt	8 μ l
T4 DNA-Ligase (3 weiss U/ μ l)	1 μ l

3.5.2 Transformation und Selektion

Die rekombinanten Plasmide wurden in den Bakterienstamm E.coli XI 1 blue transformiert. Die kompetenten Zellen wurden dafür auf Eis aufgetaut und mit dem gesamten Ligationsansatz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten auf Eis wurde ein zusätzlicher Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C durchgeführt, um die Aufnahme der fremden DNA zu erhöhen [113]. Die E.coli wurden für 2 Minuten auf Eis abgekühlt, mit 300 μ l LB (Luria-Bertani)-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien zu 100 μ l und 200 μ l auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Transformierte E.coli weisen aufgrund des pGEM[®]-T-Vektors eine Ampicillinresistenz auf und besitzen eine funktionsfähige β -Galaktosidase, die im Wirtstamm XI 1 blue entfernt wurde. Transformierte Bakterien setzen daher in Gegenwart des Induktors Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) X-Gal enzymatisch um und bilden neben Galaktose den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol, wodurch die Kolonien blau erscheinen. Durch die Ligation von Fremd-DNA in die *multiple cloning site* des

pGEM[®]-T-Vektors kommt es zur Zerstörung des Leserasters des lacZ-Gens. Dadurch kann keine funktionsfähige β -Galaktosidase gebildet werden, so dass die betreffenden Bakterienkolonien in Gegenwart von X-Gal farblos (weiß) bleiben. Weiße Kolonien wurden von den Selektionsplatten mit einer sterilen 200 μ l Pipettenspitze gepickt und in 3 ml LB Medium mit Ampicillin (1 ml/100 ml LB Medium) über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

LB-Medium (pH 6,4-7,5)

Pepton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Natriumchlorid	10 g
<i>aqua dest.</i>	ad 1l

Das flüssige Medium wurde unmittelbar nach Herstellung autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugefügt.

3.5.2.1 Selektionsplatten

Agarhaltiges LB-Medium wurde durch Erwärmen verflüssigt und langsam abgekühlt. 200 ml Medium wurden mit 200 μ l Ampicillin (50 mg/ml), 400 μ l X-Gal (20 mg/ml Dimethylformamid) und 40 μ l IPTG (200 mg/ml) komplettiert und auf 94 mm-Petrischalen aufgeteilt.

3.5.2.2 Mini-Plasmid-Präparation

Die Plasmidpräparation wurde mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. 2 ml der Übernachtskultur (Kap. 3.5.1) wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 8.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 150 μ l Lösung I resuspendiert. 150 μ l Lösung II wurden zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 2 Minuten wurden 300 μ l Lösung III zugegeben und erneut gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000g für 5 Minuten bei RT. Der Überstand wurde auf eine Präparationssäule gegeben und für 1 Minute bei 13.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde mit 400 μ l Waschpuffer gespült, 2 Minuten zentrifugiert und ethanolhaltige Waschpufferrückstände für 5 Minuten bei RT verdampft. Durch eine 1-minütige Zentrifugation bei 13.000 g wurde die DNA in 50 μ l sterilem Wasser eluiert.

3.5.3 Restriktionsverdau

Um den Klonierungserfolg und die Größe des Inserts zu kontrollieren, wurden die rekombinanten Plasmide durch eine doppelte Restriktion mit den beiden Restriktionsenzymen Apal und SacI für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 3.4.2) und die Restriktionsprodukte mittels UV-Detektionssystem nachgewiesen.

Restriktionsverdau

Enzym 1 (Apal, 50 U/μl)	0,5 μl
Enzym 2 (SacI, 50 U/μl)	0,5 μl
Puffer	1 μl
Plasmid	6 μl
<i>aqua dest.</i>	2 μl

3.5.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle). Die Produkte zur Sequenzierung wurden mittels BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit und einem spezifischen Primer für den T7-Promotor des pGEM®-T-Vektors (T7-Primer: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA) in einer PCR-Reaktion (Kap. 3.4.4.1) hergestellt. Die PCR-Produkte wurden für die spätere Sequenzierung bei RT ausgefällt. Dafür wurde der Reaktionsansatz mit 2 μl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 80 μl Ethanol (96%) gemischt und für 30 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 450 μl Ethanol (70%) gewaschen und erneut für 20 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert, wobei dieser Waschschrift wiederholt wurde. Der Überstand wurde abgenommen, das gefällte PCR-Produkt im Inkubator bei 37°C für 15 Minuten getrocknet und anschließend zur Sequenzierung versandt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels Basic Local Alignment Search Tool (NCBI) (Anhang 8.1).

Sequenzierungs-Ansatz

Sequenzierungspuffer	1,5 µl
T7-Primer (60 pM)	0,5 µl
Plasmid aus Minipräparation	2 µl
PCR-Wasser	4 µl
Big Dye Terminator	2 µl

PCR-Protokoll

5 Minuten 95°C

25 Zyklen:

 10 Sekunden 95°C

 15 Sekunden 55°C

 4 Minuten 60°C

4°C Pause

3.6 Bestimmung der Induzierbarkeit von PPAR γ

Um zu bestimmen, ob die eingesetzten EDC PPAR γ 2 aktivieren, wurde mit einem Firefly-Luziferase gekoppeltem PPAR *response element* (PPRE)-Konstrukt und einem Plasmid, welches die codierende mRNA Sequenz für Pparg2 in voller Länge enthält, gearbeitet. Die verwendeten Plasmide wurden mit freundlicher Unterstützung von Herr Professor Robert M. Sargis (Universität von Chicago, Medizinische Fakultät, Chicago, USA) zur Verfügung gestellt [114]. Das PPRE-Konstrukt enthält eine Wiederholung der PPAR-Konsensussequenz TGACCTnTGTCCT, welche aus der Promotorregion des PPAR-regulierten Enzyms Acyl-CoA Oxidase stammt [115]. Diese Sequenz wurde im Abstand von 18 Basen zweimal in die Multiple Cloning Site des PGL2-Vektors kloniert und so vor der Promotorregion der Firefly-Luziferase eingefügt (Abbildung 8). Die Verifizierung der Sequenz dieses Reporterplasmids wurde mittels Sequenzanalyse (Kap. 3.5.4) unter Nutzung des GL-Primers (Tabelle 2) durchgeführt. Auch die Vollständigkeit der codierenden Sequenz von Pparg2 im pSG5-Vektor (Abbildung 8) wurde mittels Sequenzierung bestimmt. Hierfür wurde ein Primer der T7 Region (5' Sequenz-Primer, Tabelle 2) und gegenläufig ein Primer der Promotorregion SV40 (3' Sequenz-Primer, Tabelle 2) eingesetzt. Die dadurch erhaltenen Sequenzen ergaben die codierende Sequenz des murinen Pparg2-Gens (GenBank Acc. No. NM_011146) (Anhang 8.2 und 8.3).

Zur Bestimmung der Aktivierbarkeit des Transkriptionsfaktors PPAR γ 2 durch die eingesetzten EDC wurden $1,5 \times 10^3$ C3H10T1/2-Zellen in fluoreszenzgeeignete 96-well-Mikrotiterplatten ausplattiert und für 3 Tage bis 90% Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mittels Transfektionsreagenz Fugene HD nach Angaben des Herstellers mit je 0,2 μ g DNA des PPRE-Reportergenplasmids und des Referenzgenplasmids, pRL-SV40, transfiziert (Abbildung 8). Um zu untersuchen, ob die zelleigene Expression von Pparg zur PPRE-Aktivierung ausreicht, wurde das Experiment mit und ohne Pparg2-Überepression (pSG5-Plasmid) durchgeführt. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte eine 24-stündige Exposition der Zellen mit BPA, DEHP, TBT, DMSO beziehungsweise 500 nM Rosiglitazon als Positivkontrolle für die PPAR γ -Aktivierung. Die Aktivierung von PPAR γ führt zu dessen Bindung an das PPRE des PGL2-Vektors und somit zur Bildung der nachgeschalteten Firefly-Luziferase. Der Referenzvektor pRL-SV40, welcher konstitutiv die Renilla-Luziferase exprimiert, diente zur Normalisierung der erhaltenen Ergebnisse. Die Lumineszenzmessung von Firefly-Luziferase (PGL2-PPRE) und Renilla-Luziferase (pRL-SV40) erfolgte mittels Dual-Glo LuziferaseAssay System am Infinite 200 Plattenreader. Dazu wurden die Zellen lysiert und der Substratumsatz der freiwerdenden Firefly-Luziferase anhand des Lumineszenzsignals nach 10-minütiger Inkubation gemessen. Im Anschluss erfolgte durch Zugabe der „Stop and Glow“-Reagenz die Messung des Substratumsatzes der Renilla-Luziferase. Als Kontrolle dienten analog transfizierte DMSO-behandelte C3H10T1/2-Zellen. Der gesamte experimentelle Ansatz wurde jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt.

Tabelle 2: Liste der Primersequenzen für die Sequenzierung der Plasmide

Primer	Sequenz (5' → 3')
PPRE: Acyl-CoA Oxidase	TGACCTnTGCCT
GL-Primer	CTTTATGTTTTGGCGTCTCCA
5' Sequenz-Primer T7	TAATACGACTCACTATAGGGCGA
3' Sequenz-Primer SV40	GAAATTTGTGATGCTATTGC

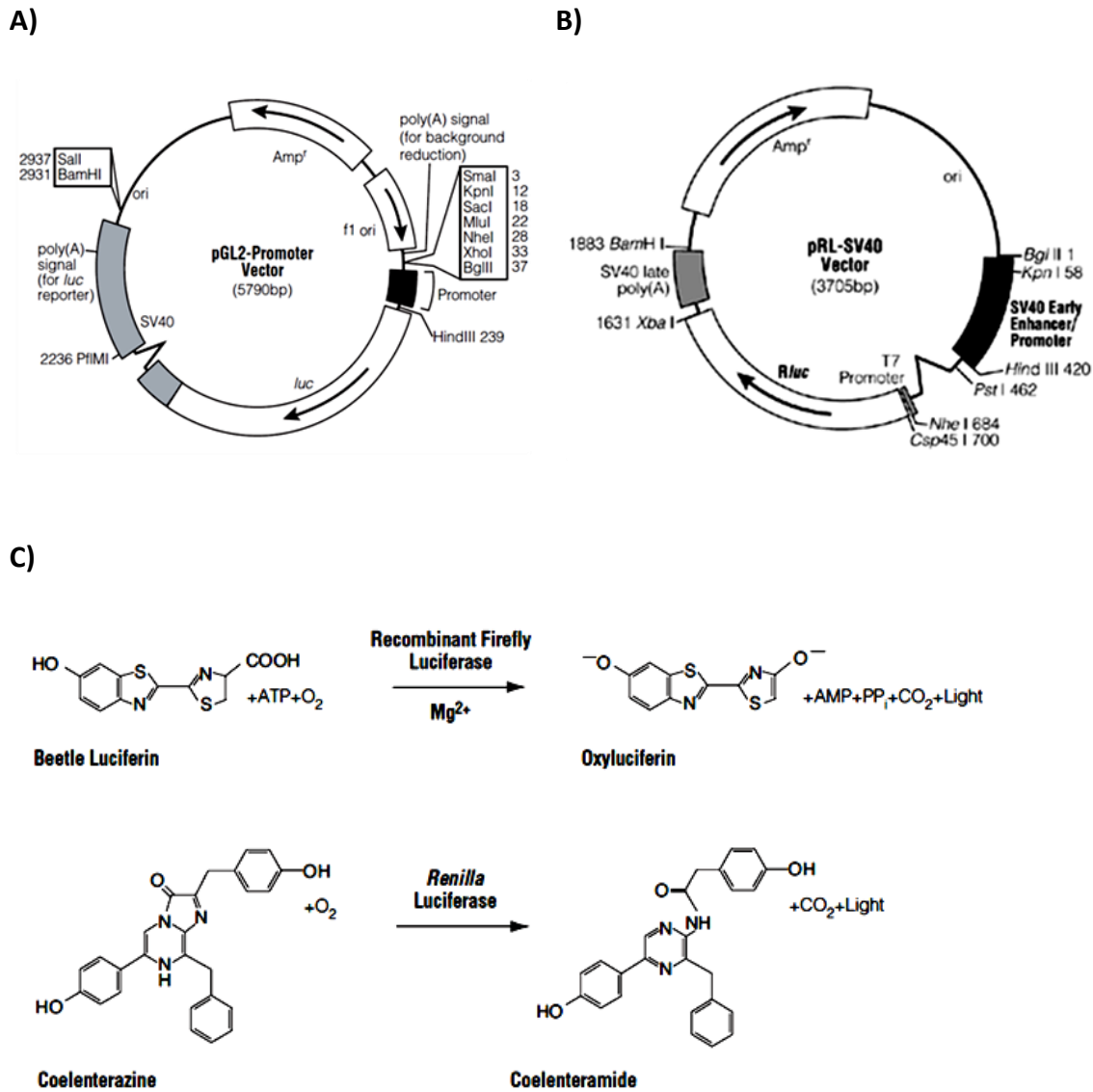


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der verwendeten Vektoren (A+B) sowie Darstellung der durch die Luziferasen katalysierten Reaktionen (C).

3.7 PPAR γ -Knockdown

Eine spezifische mRNA-Degradation kann mittels einer „RNA-vermittelter Interferenz“ (RNAi) induziert werden. Dieser Prozess wird als posttranskriptionelles „gene silencing“ bezeichnet [116] und kann experimentell durch das chemisch vermittelte Einschleusen von mRNA-spezifischer siRNA „small interfering RNA“ in die Zelle ausgelöst werden. In der Folge kommt es zur Degradation und damit zur funktionellen Ausschaltung bestimmter Genprodukte.

Für den Knockdown von PPARg wurden konfluente C3H10T1/2-Zellen mit einer Kombination aus 4 Pparg-spezifischen ON-TARGETplus siRNA-Molekülen (50 nM, L-040712-00) mittels X-treme GENE siRNA Transfektionsreagenz nach Angaben des Herstellers transfiziert und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Transfizierte Zellen wurden anschließend für 24 Stunden mit DMSO, TBT oder Rosiglitazon behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurden Proben zur RNA-Isolation gewonnen (Kap. 3.4.1) oder die Zellen zu Adipozyten differenziert (Kap. 3.1.1.2). Die Effizienz der siRNA-Transfektion wurde ermittelt, indem die mRNA-Expression von Pparg und Fabp4 zwischen siRNA-behandelten und nicht-siRNA-behandelten Zellen verglichen wurde. Die Spezifität der Wirkung der siRNA wurde verifiziert, indem der Einfluss der siRNA-Behandlung auf die mRNA-Expression von Ppara, als Isoform des Transkriptionsfaktors Pparg, sowie auf die mRNA-Expression der mesenchymalen Markergene Dlk1, Sox5, Sox6, Sox9, Runx2 und Col2a1 untersucht wurde. Zudem wurde die Proteinexpression von PPARg1, PPARg2, PPARa und SOX9 exemplarisch mittels Western Blot bestimmt (Kap. 3.8.3).

3.8 Proteinchemie

3.8.1 Proteinisolation

Zur Proteinisolation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 100 µl gekühltem RIPA-Puffer versetzt. Die Zellen wurden mittels Einwegspritze homogenisiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Phosphatase- und Proteinkinase-Inhibitoren in einer Konzentration von 10 µl/400 µl RIPA zugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Suspension für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 13.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford [117] bestimmt (Kap. 3.8.2).

RIPA-Puffer (radio-immuno-precipitation-assay)

5 x PBS	20 ml
10 x SDS	100 µl
Natrium-Deoxycholat	500 mg

Der Ansatz wurde mit *aqua dest.* auf 100 ml aufgefüllt und bei 4°C gelagert.

3.8.2 Proteinquantifizierung

Die Messung der Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Protein Assay-Kit in Doppelbestimmung durchgeführt. Der Ansatz wurde gemischt und die Absorption nach 10 Minuten gegen einen Leerwert (800 µl *aqua dest.* + 200 µl Bradford Reagenz) bei 560 nm spektralphotometrisch gemessen. Die Konzentration wurde anhand einer Eichreihe ermittelt.

Proteinquantifizierung

Bradford Reagenz	200 µl
<i>aqua dest.</i>	788 µl
Proteinlösung	2 µl

3.8.3 Western Blot

Der Western Blot beruht auf der Detektion immobilisierter Proteine durch selektive Antikörper. Dabei wird das zu analysierende Proteingemisch zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese nach Molekülgröße in verschiedene Proteinfractionen aufgetrennt. Durch den Transfer auf eine Membran kommt es zur Immobilisation der Proteine, was diese zur nachfolgenden Antikörperdetektion zugänglich macht.

3.8.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamid ist ein Monomer, welches durch radikalische Polymerisation in Gegenwart von N,N'-Methylen-bisacrylamid in einer Kettenreaktion zu einer Gelmatrix, dem Polyacrylamid quervernetzt. Dabei dient Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalstarter und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Polymerisierungskatalysator. Natriumdodecylsulfat (SDS) dringt mit seinen lipophilen aliphatischen Ketten in das Innere der gefalteten Proteine, wodurch es zur Aufhebung von Tertiärstrukturen kommt. Die gebildeten SDS-Proteinkomplexe sind über ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis miteinander vergleichbar, da die Eigenladung der Proteine durch die negative Gesamtladung vernachlässigbar ist. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient somit der Trennung SDS-behandelter negativ geladener denaturierter Proteinfractionen.

Das für die SDS-PAGE verwendete Acrylamidgel besteht aus einem Sammel- und Trenngel. Im Sammelgel erfolgt eine Aufkonzentrierung der Proteine, wodurch es zu einer Erhöhung der Bandenschärfe kommt. An der Grenze von Sammel- und Trenngel ändern sich pH-Wert und Porengröße. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung kommt es zur Wanderung der Proteine im Polyacrylamidgel, wobei die Laufgeschwindigkeit der Proteine im konstanten elektrischen Feld von ihrer Größe abhängig ist.

Die Gelkammer bestand aus Glasplatten, welche im Abstand von 0,75 mm in die Gelapparatur eingespannt wurden. Zwischen die Glasplatten wurde das Trenngel gegossen, welches anschließend mit Sammelgel überschichtet wurde. Zur Formung von Auftragesaschen wurde ein Probenkamm in das Sammelgel eingesetzt. Nach Aushärtung der Gele wurden die vorbehandelten Proteinproben aufgetragen. Dafür wurden 30 µg des zu analysierenden Proteingemischs in 25 µl RIPA verdünnt, für 10 Minuten bei 70°C denaturiert und mit 5 µl Ladepuffer versetzt. Zur Bestimmung der Proteingröße wurden die Molekulargewichtsmarker Bio-Rad Broad-Range und Promega High-Range verwendet. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 30 Minuten bei 120 V (Sammelgel) und danach für 60 Minuten bei 180 V (Trenngel) in Laufpuffer nach Laemmli.

12% SDS-Gel	Trenngel	Sammelgel
<i>aqua dest.</i>	3,3 ml	2,4 ml
Acrylamid (30%)	4,0 ml	0,5 ml
Tris-HCl (1,5 M; pH 8,8)	2,5 ml	----
Tris-HCl (1 M; pH 6,8)	----	1ml
SDS (10%)	100 µl	40 µl
Ammoniumpersulfat 10%	100 µl	40 µl
TEMED	6 µl	6 µl

6 x SDS-Gel Ladepuffer	
Tris-HCl (1M pH 6,8)	1 ml
DTT (1M)	2 ml
SDS (10%)	4 ml
Bromphenolblau	5 mg
Glycerol	2 ml

10 x Laemmli-Puffer	
Glycerin	144,25 g
Tris-Base	30,25 g
SDS	10 g

Der Ansatz wurde mit *aqua dest.* auf 1 l aufgefüllt.

3.8.3.2 Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran

Die durch die Gelelektrophorese getrennten Proteine wurden mittels Blot-Apparatur bei 150 mA für 2 Stunden unter Kühlung auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, wobei die verwendeten Filter zuvor in verschiedene Western-Blot-Puffer eingelegt waren (Abbildung 9). Nach dem Transfer erfolgte das Färben der Proteinbanden mit Ponceau S-Lösung, um die Qualität des Blots zu überprüfen. Anschließend wurde mit *aqua dest.* entfärbt.

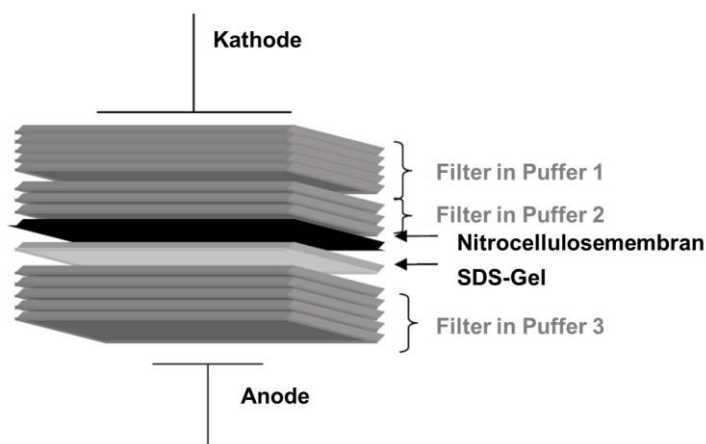


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Western Blots

Western-Blot-Puffer	Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3
Tris-Base	36,3 g (0,3 M)	3 g (25 mM)	3 g (25 mM)
Methanol (20%)	200 ml	200 ml	200 ml
Aminocaprinsäure	-----	-----	5,2 g (40 mM)

Der Ansatz wurde mit *aqua dest.* auf 1 l aufgefüllt.

3.8.3.3 Antikörper-Hybridisierung und -Detektion

Die Membran wurde für 1 Stunde in TBST mit 5% Milchpulver blockiert. Anschließend wurde der Primärantikörper (Tabelle 3) hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene Primärantikörper wurden durch Waschen mit TBST entfernt. Es folgte die Zugabe des Sekundärantikörpers in 3% BSA-TBST-Lösung und eine 1-stündige Inkubation bei RT. Als Sekundärantikörper wurden entweder Ziege Anti-Maus IgG (HRP konjugiert, 1:45.000) oder Ziege Anti-Kaninchen (HRP konjugiert, 1:15.000) verwendet. Überschüssige

Antikörper wurden durch Waschen der Membranen (2 x mit TBST und 1 x TBS für jeweils 5 Minuten) entfernt. Die Detektionsreaktion erfolgte laut Angaben des Herstellers mit dem ECL-System und wurde mittels ChemiDoc-It Imaging System aufgenommen. Die Bandenintensität wurde im Verhältnis zu β Actin mittels der Analysesoftware ImageJ [118] quantifiziert.

Tabelle 3: **Übersicht der verwendeten Primärantikörper für den Western-Blot**

Primärantikörper	Epitop	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen anti-PPAR α (polyklonal)	Peptid der AS 22-36 des PPAR α (Human, Maus, Ratte)	1:200	Cayman #101710
Kaninchen anti-PPAR γ 1/2 (monoklonal)	His494 des humanen PPAR γ	1:1.000	Cell Signaling #2443
Kaninchen anti-SOX9 (polyklonal)	Peptid der AS 407-496 des humanen SOX9	1:1.000	Santa Cruz #20095
Maus anti- β Actin (monoklonal)	N-terminales Peptid	1:20.000	Sigma-Aldrich #A5441

TBS-Puffer

Tris-HCl (pH7,5)	10 ml
NaCl	5,8 g
<i>aqua dest.</i>	ad 1 l

Zur Herstellung von TBST wurde auf 1 l TBS 1 ml Tween 20 zugeben.

3.9 Pluripotenznachweis mittels Immunfluoreszenz

Pluripotente CGR8-ESC wurden aus Embryonen des Mausstammes 129 gewonnen [107]. Sie sind sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in der Lage sich in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm, Mesoderm) sowie in Zellen der Keimbahn zu differenzieren. Da embryonale Stammzellen *in vitro* sofort spontan differenzieren, muss mittels geeigneter Zellkulturbedingungen und Zytokinen wie LIF die ständige Zellerneuerung induziert werden, um den pluripotenten Charakter der Zellen aufrechtzuerhalten.

Im Abstand von 5 Passagen wurde in CGR8-Zellen die Expression der pluripotenzassoziierten Epitope des membranständigen *stage-specific embryonic antigen 1* (SSEA1) und des nukleär lokalisierten Transkriptionsfaktors Oct-4 nachgewiesen. Die Zellen wurden dafür auf gelatinebeschichteten Deckgläschen bis 90% Konfluenz kultiviert, mit PBS gewaschen und

mit 4% Paraformaldehyd für 20 Minuten fixiert. Dies führt zur Ausbildung von Methylenbrücken und damit zur Vernetzung von Proteinen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 3,5% Ziegen Serum in PBS für 45 Minuten blockiert. Nach Entfernung der Serumreste durch einen Waschriff mit PBS wurden die fixierten Zellen für 45 Minuten mit 100 µl des primären Antikörpers inkubiert (Tabelle 4). Zur Entfernung nicht gebundener Reste des primären Antikörpers wurde mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper. Zum Nachweis des Oct-4-Epitops wurden die fixierten Zellen vor dem Blocken zusätzlich für 30 Minuten mit dem nichtionischen Tensid Triton X-100 (0,1%) in 1% Ziegen Serum inkubiert. Diese Behandlung permeabilisiert die Zellmembran und ermöglicht so den Nachweis intrazellulärer Epitope.

Zur Färbung der Zellkerne wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI (50 µg/ml) verwendet und für 8 Minuten mit den antikörpermarkierten Zellen inkubiert. Die so behandelten Deckgläschen wurden mit PBS und destilliertem Wasser gewaschen und auf Objektträgern eingebettet. Die Präparate wurden über Nacht bei 4°C gehärtet, versiegelt und mittels Fluoreszenzmikroskop BZ 8000 und der dazugehörigen Software ausgewertet.

Tabelle 4: **Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immunhistologie**

Primärantikörper	Epitop	Verdünnung	Hersteller
Maus anti-Oct4 IgG (monoklonal)	Peptid der AS 1-134 des humanen Oct-3/4	1:100	Santa Cruz #5279
Maus anti-SSEA1 IgM (monoklonal)	Gegen Kohlenhydratepitop teratokarzinomer F9 Stammzellen	1:50	Santa Cruz #21702

Sekundärantikörper	Farbstoff	Verdünnung	Hersteller
Anti-Mouse IgG (polyklonal)	Alexa488-gekoppelt Ex: 488nm/Em: 519nm	1:400	Invitrogen #A11001
Anti-Mouse IgM (polyklonal)	FITZ-gekoppelt Ex: 495nm/Em: 518nm	1:200	Santa Cruz #2082

3.10 MEHP-Bestimmung

DEHP wird intrazellulär zum Monoester MEHP gespalten, welcher die Transkriptionsfaktoren PPAR α und PPAR γ aktiviert [70]. Um zu untersuchen, ob die verwendeten Zellen in der Lage sind DEHP in den aktiven Metaboliten MEHP zu metabolisieren, und ob es zu einer intrazellulären Anreicherung von MEHP kommt, wurde die MEHP-Konzentration in DEHP behandelten C3H10T1/2-Zellen bestimmt. Konfluente Zellen wurden dafür im undifferenzierten Zustand (Tag 4-6) bzw. im differenzierten Zustand (Tag 10-12) oder während des gesamten Differenzierungsprotokolls (12 Tage) mit DEHP behandelt (Abbildung 5). Zur Probengewinnung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Schaber in Glasgefäße überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch pulsative Sonifikation für 90 Sekunden bei 60% Aktivität auf Eis. Der Proteingehalt der Proben wurde nach Bradford bestimmt (Kap. 3.8.2) und die Analyse der MEHP-Konzentrationen erfolgte durch Herr Dr. Holger Koch (Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Ruhr-Universität, Bochum). Die MEHP-Konzentration wurde dabei mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie und nachgeschalteter Massenspektrometrie bestimmt [119]. Als Kontrollen dienten korrespondierende nicht DEHP-behandelte C3H10T1/2-Zellen.

3.11 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden in 3 unabhängigen Versuchen wiederholt. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm Sigma Plot verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's *t*-Test bzw. zweifaktorieller ANOVA (*analysis of variance*) und nachgeschaltetem Bonferroni-Test. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Irrtumswahrscheinlichkeiten p kleiner als 5% ($p < 0,05$) gelten als statistisch signifikant und sind durch * bzw. # in den Diagrammen gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Pluripotenznachweis

Zum Nachweis der Pluripotenz wurde im Abstand von 5 Passagen das Pluripotenz-assoziierte zellmembranständige Antigen SSEA und der embryonale nukleär lokalisierte Transkriptionsfaktor Oct-4 mittels Immunfluoreszenz in undifferenzierten CGR8-Zellen nachgewiesen (Abbildung 10). Anhand der Kernfärbung mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen im undifferenzierten Zustand das membranständige Antigen SSEA1 und den nukleären Transkriptionsfaktor Oct-4 exprimieren. Dies lässt darauf schließen, dass die Zellen zum Zeitpunkt des Versuchsansatzes pluripotent waren, was eine notwendige Voraussetzung für nachfolgende Versuche darstellt.

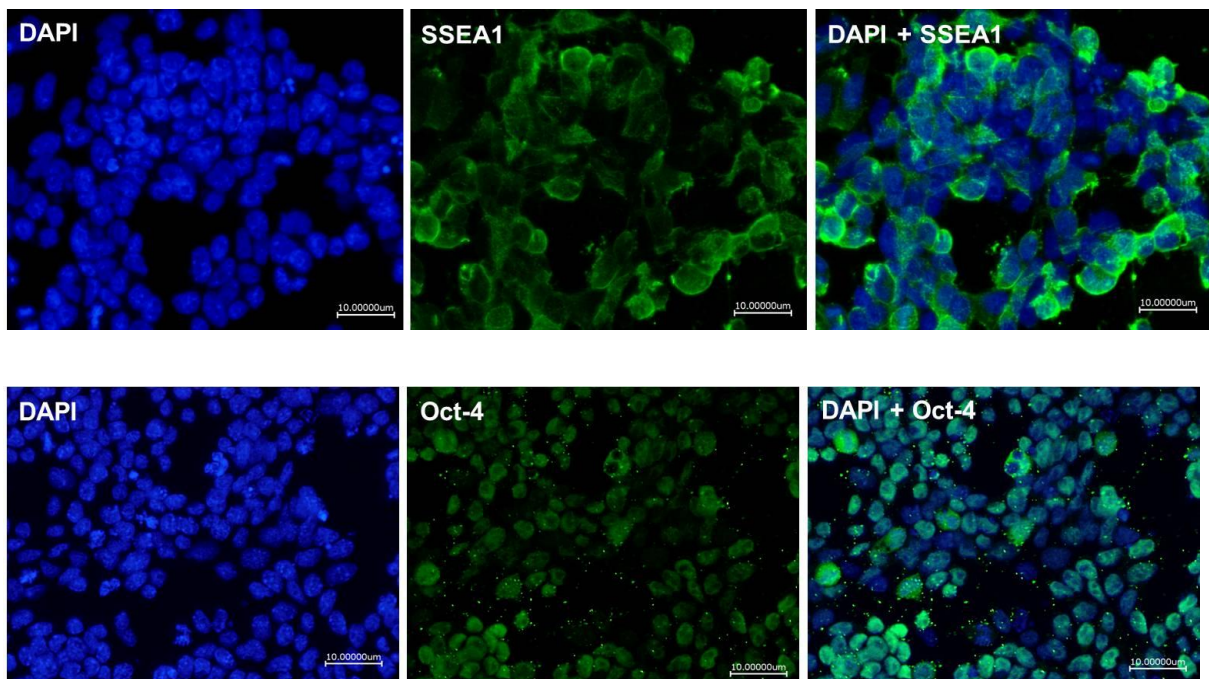


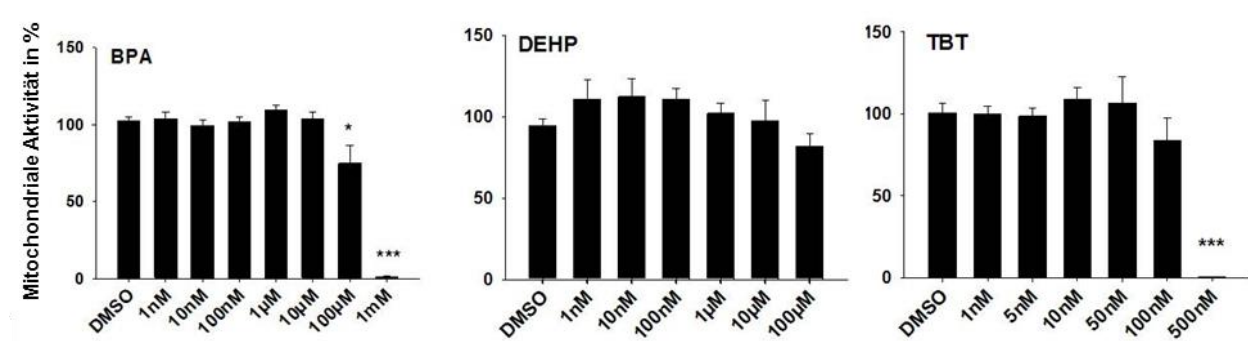
Abbildung 10: **Nachweis der pluripotenzassoziierten Antigene SSEA1 und Oct-4 in undifferenzierten CGR8-ESC.** SSEA1 ist membranständig und Oct-4 nukleär lokalisiert. Die Zellkerne sind blau mit DAPI gegengefärbt. Maßstab $\cong 10 \mu\text{m}$.

4.2 Bestimmung geeigneter Expositionskonzentrationen

Um geeignete Konzentrationen für die EDC-Exposition von CGR8-ESC und C3H10T1/2-MSC zu ermitteln, wurde mittels MTT-Test bestimmt, ab welcher Konzentration diese EDC die Proliferation und mitochondriale Aktivität der verwendeten Zellen beeinflussen (Abbildung 11). Für den Assay wurden je 1×10^3 Zellen ausgesät und über einen Zeitraum von 72 Stunden mit BPA (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM), DEHP (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M), TBT (1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM) oder 0,05% DMSO (Lösungsmittelkontrolle) behandelt. Die mitochondriale Aktivität un behandelter Zellen wurde 100% gesetzt.

Es wurde beobachtet, dass BPA ab einer Konzentration 100 μ M und TBT ab einer Konzentration von 500 nM die mitochondriale Aktivität beider Zelllinien beeinflusste und es zu einer verminderten Proliferation kam. Die Exposition mit DEHP und DMSO hatte keinen signifikanten Einfluss auf die mitochondriale Aktivität und die Proliferation beider Zelllinien. Als NOAEL-Konzentrationen wurden somit 10 μ M BPA, 100 μ M DEHP und 100 nM TBT festgelegt, da diese Konzentrationen keine Wirkung auf das Proliferationsverhalten der verwendeten Zellen zeigten.

A)



B)

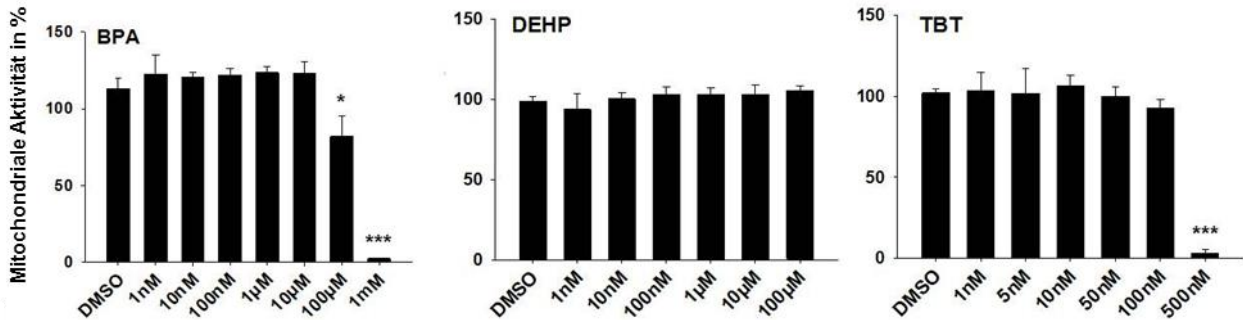


Abbildung 11: **MTT-Test.** Die mitochondriale Aktivität und Proliferation von (A) CGR8- und (B) C3H10T1/2-Zellen nach 72 Stunden Exposition mit verschiedenen Konzentrationen BPA, DEHP und TBT. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; *p<0,05; ***p<0,005; Student's *t*-Test.

4.3 Einfluss der EDC auf die adipogene Differenzierung von C3H10T1/2- MSC und CGR8-ESC

Der adipogene Einfluss der EDC wurde untersucht, indem die Zellen während der adipogenen Differenzierung bzw. während bestimmter Differenzierungsphasen mit NOEL-orientierten oder umweltrelevanten Konzentrationen der EDC behandelt wurden. Die adipogene Differenzierung wurde am Ende des Differenzierungsprotokolls bestimmt (Abbildung 5 und 6), wobei die Adipozytenmenge, der Gesamt-TG-Gehalt und die mRNA-Expression der adipogenen Markergene Pparg2, Fabp4, Adipoq und Lpl quantitativ ermittelt wurden.

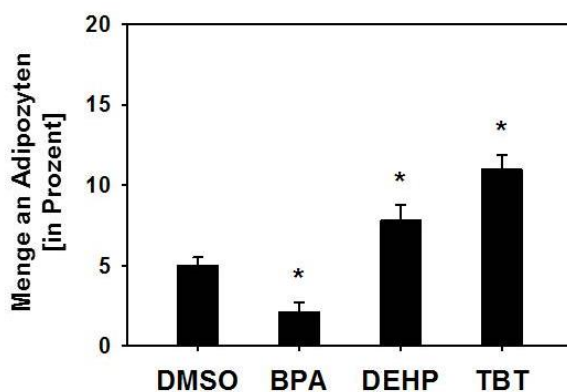
4.3.1 Einfluss NOEL-orientierter Konzentrationen auf die adipogene Differenzierung von C3H10T1/2-MSC

Multipotente C3H10T1/2-MSC wurden zu Adipozyten differenziert (Kap. 3.1.1.2) und während der gesamten Differenzierungsphase (Abbildung 5) mit den NOEL-orientierten Konzentrationen 10 μ M BPA, 100 μ M DEHP oder 100 nM TBT behandelt. Die Ergebnisse wurden in Relation zu korrespondierenden DMSO-behandelten Zellen ausgewertet.

4.3.1.1 Einfluss auf die Adipozytenmenge (Hyperplasie)

Die quantitative durchflusszytometrische Bestimmung der Adipozytenmenge ergab, dass die Exposition multipotenter mesenchymaler C3H10T1/2-MSC mit BPA zu einer verminderten Fettzellbildung führte. DEHP und TBT führten dagegen zu einer vermehrten Entstehung von Fettzellen (Abbildung 12A). Dieses Ergebnis wurde lichtmikroskopisch verifiziert (Abbildung 12B).

A)



B)

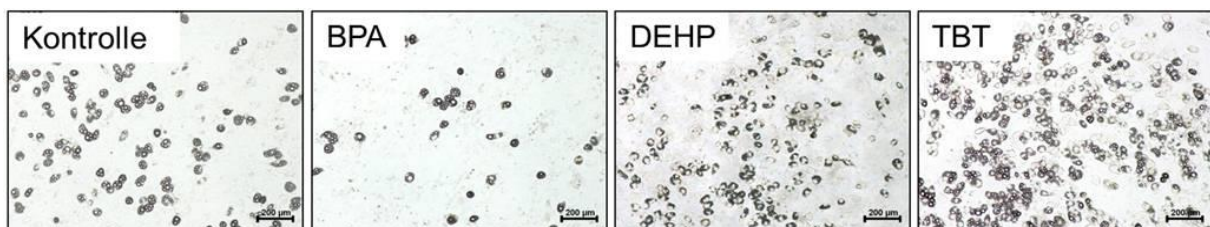


Abbildung 12: **Quantitative (A) und lichtmikroskopische (B) Bestimmung der Anzahl an Adipozyten von langzeitbehandelten C3H10T1/2-MSC.** Die Zellen wurden während der adipogenen Differenzierung mit BPA (10 µM), DEHP (100 µM) oder TBT (100 nM) behandelt. Die Menge an Adipozyten wurde an Tag 12 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM mit N = 3; *p<0,05; Student's *t*-Test. Maßstab \triangleq 200 µm.

4.3.1.2 Einfluss auf den Triglyzeridgehalt (Hypertrophie)

Der TG-Gehalt wurde in 2×10^5 Zellen quantitativ bestimmt und in Relation zur Kontrolle (DMSO) angegeben. Dabei zeigte sich, dass die BPA-Behandlung zu einer Abnahme der TG-

Konzentration führte, während die Exposition mit DEHP und TBT in einem vermehrten Gesamt-TG-Gehalt resultierte (Abbildung 13A). In Relation zur ermittelten adipogenen Differenzierungseffizienz (Abbildung 13B) zeigte sich, dass der mittlere zelluläre TG-Gehalt der Adipozyten durch die EDC nicht verändert war.

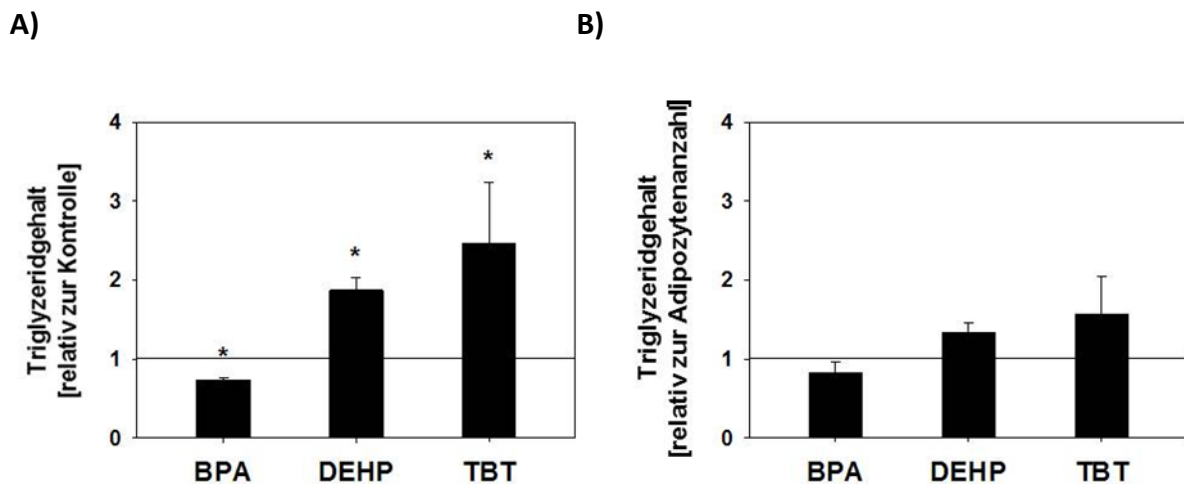


Abbildung 13: **Gesamt-Triglyzeridgehalt von langzeitbehandelten C3H10T1/2-MS-C**. Die Zellen wurden während der adipogenen Differenzierung mit BPA (10 μ M), DEHP (100 μ M) oder TBT (100 nM) behandelt. Der Gesamt-Triglyzeridgehalt wurde an Tag 12 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. **(A)** Triglyzeridgehalt in 2×10^5 Zellen und **(B)** relativer Triglyzeridgehalt der Adipozyten. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet und als gerade Linie gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; * $p < 0,05$; Student's *t*-Test.

4.3.1.3 Einfluss auf die mRNA-Expression adipogener Markergene

Der Einfluss der EDC auf die mRNA-Expression der adipogenen Markergene Fabp4, Pparg2, Lpl und Adipoq wurde mittels Real-time RT-PCR bestimmt (Abbildung 14). Dabei zeigte sich, dass BPA die mRNA-Expression dieser Gene verminderte, während die Behandlung mit DEHP oder TBT zu einer gesteigerten mRNA-Bildung führte. Die Ergebnisse wurden in Relation zu korrespondierenden DMSO-behandelten Zellen ausgewertet.

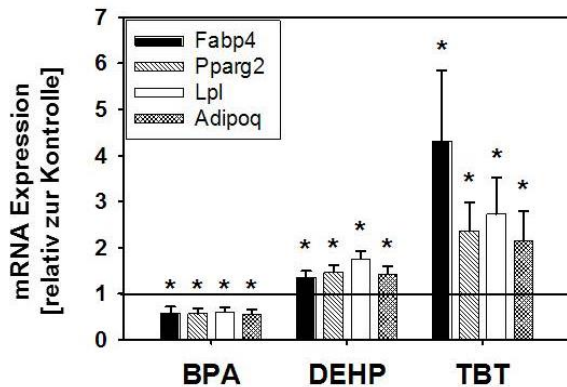


Abbildung 14: mRNA-Expression der adipogenen Markergene **Fabp4**, **Pparg2**, **Lpl** und **Adipoq** von langzeitbehandelten C3H10T1/2-MSC. Die Zellen wurden während der adipogenen Differenzierung mit BPA (10 μ M), DEHP (100 μ M) oder TBT (100 nM) behandelt. Die mRNA-Expression wurde an Tag 12 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet und als gerade Linie gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; * $p < 0,05$; Student's *t*-Test.

4.3.2 Einfluss umweltrelevanter EDC-Konzentrationen auf die adipogene Differenzierung von C3H10T1/2-MSC

Multipotente C3H10T1/2-MSC wurden zu Adipozyten differenziert und während der gesamten Differenzierungsphase (Abbildung 5) mit den umweltrelevanten Konzentrationen 10 nM BPA, 100 nM DEHP, oder 1 nM TBT (Kap. 4.2) exponiert. Die Ergebnisse wurden in Relation zu korrespondierenden DMSO-behandelten Zellen ausgewertet.

4.3.2.1 Einfluss auf die Adipozytenmenge (Hyperplasie)

Die Exposition multipotenter C3H10T1/2-MSC während der adipogenen Differenzierung mit BPA, DEHP und TBT im umweltrelevanten Konzentrationsbereich hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der gebildeten Adipozyten (Abbildung 15).

4.3.2.2 Einfluss auf den Triglyzeridgehalt (Hypertrophie)

Weder der Gesamt-TG-Gehalt aus 2×10^5 Zellen, noch der mittlere TG-Gehalt der Adipozyten wurde durch die EDC-Exposition im umweltrelevanten Konzentrationsbereich beeinflusst (Abbildung 16).

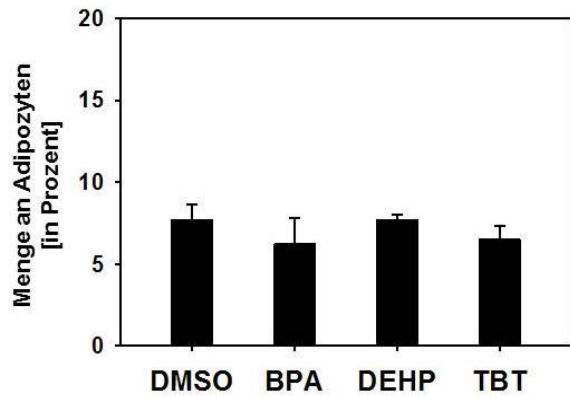
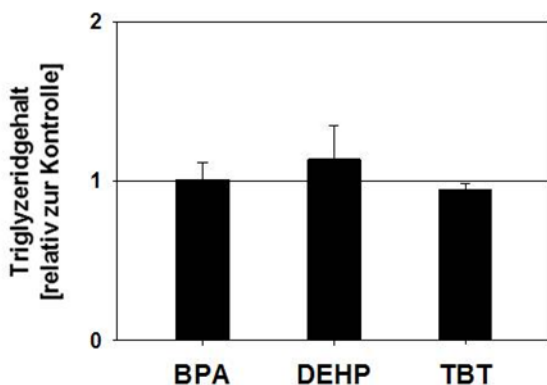


Abbildung 15: **Anzahl an Adipozyten von mit umweltrelevanten Expositionskonzentrationen behandelten C3H10T1/2-MSC.** Die Zellen wurden während der adipogenen Differenzierung mit BPA (10 nM), DEHP (100 nM) oder TBT (1 nM) behandelt. Die Menge an Adipozyten wurde an Tag 12 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3.

A)



B)

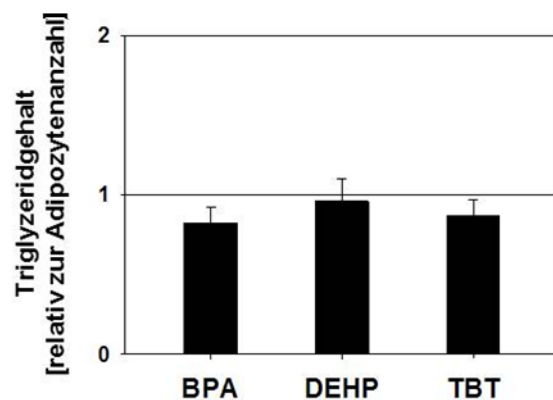


Abbildung 16: **Gesamt-Triglyzeridgehalt von mit umweltrelevanten Expositionskonzentrationen behandelten C3H10T1/2-MSC.** Die Zellen wurden während der adipogenen Differenzierung mit BPA (10 nM), DEHP (100 nM) oder TBT (1 nM) behandelt. Der Gesamt-Triglyzeridgehalt wurde an Tag 12 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. **(A)** Triglyzeridgehalt in 2×10^5 Zellen und **(B)** relativer Triglyzeridgehalt der Adipozyten. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet und als gerade Linie gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3.

4.3.3 Wirkung der EDC auf unterschiedliche Stadien der Adipogenese von C3H10T1/2- MSC

Um zu untersuchen, ob der adipogene Einfluss der EDC stadienspezifisch ist, wurden C3H10T1/2-Zellen zu Adipozyten differenziert und während ontogenetisch unterschiedlicher

Phasen der Adipogenese i.e. Proliferation, Induktion und terminale Differenzierung (Abbildung 5) mit 10 μ M BPA, 100 μ M DEHP oder 100 nM TBT behandelt. An Tag 12 des adipogenen Differenzierungsprotokolls wurde der Einfluss der EDC auf die Entstehung von Adipozyten ermittelt. Dafür wurde die Menge der entstanden Adipozyten, der Gesamt-TG-Gehalt sowie die mRNA-Expression adipogener Markergene quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden in Relation zu korrespondierenden DMSO-behandelten Zellen ausgewertet.

4.3.3.1 Stadienspezifischer Einfluss auf die Adipozytenmenge (Hyperplasie)

Die Bestimmung der Anzahl an Adipozyten ergab, dass BPA die Entstehung von Adipozyten vermindert, wenn die Zellen während der Proliferationsphase (Tag 0-6) behandelt wurden (Abbildung 17). Während der Phase der hormonellen Induktion (Tag 6-8) und der terminalen Differenzierung (Tag 8-12) hatte BPA keinen statistisch nachweisbaren Einfluss auf die Menge an gebildeten Adipozyten. Die Exposition mit DEHP führte ausschließlich während der Induktionsphase zu einer gesteigerten Bildung von Adipozyten. TBT steigerte die Anzahl der entstandenen Fettzellen in allen drei untersuchten Differenzierungsstadien.

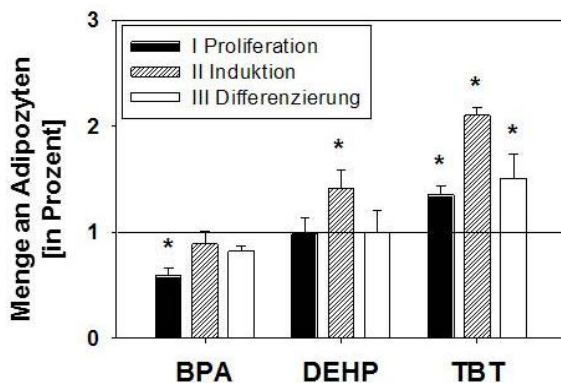


Abbildung 17: **Bestimmung der Anzahl an Adipozyten von stadienspezifisch behandelten C3H10T1/2-MSK.** Die Zellen wurden während verschiedener Phasen der adipogenen Differenzierung i.e. Proliferation (Tag 0-6), Induktion (Tag 6-8) und Differenzierung (Tag 8-12) mit BPA (10 nM), DEHP (100 nM) oder TBT (1 nM) behandelt. Die Menge an Adipozyten wurde an Tag 12 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet und als gerade Linie gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; *p<0,05; Student's t-Test.

4.3.3.2 Stadienspezifischer Einfluss auf den Triglyzeridgehalt (Hypertrophie)

Die quantitative Bestimmung des Gesamt-TG-Gehalts ergab, dass DEHP ausschließlich während der Induktionsphase zu einer signifikant erhöhten TG-Bildung führte (Abbildung 18A). Im Gegensatz dazu führte die TBT-Behandlung in allen untersuchten Stadien zu einem erhöhten Gesamt-TG-Gehalt. BPA hatte in keinem der untersuchten Stadien einen Einfluss auf den Gesamt-TG-Gehalt. In Relation zur ermittelten adipogenen Differenzierungseffizienz zeigte sich, dass der mittlere zelluläre TG-Gehalt der BPA-, DEHP- und TBT-behandelten Adipozyten nicht erhöht war. Die Behandlung mit TBT während der terminalen Differenzierungsphase resultierte in einer Verminderung des mittleren TG-Gehalts der Adipozyten (Abbildung 18B).

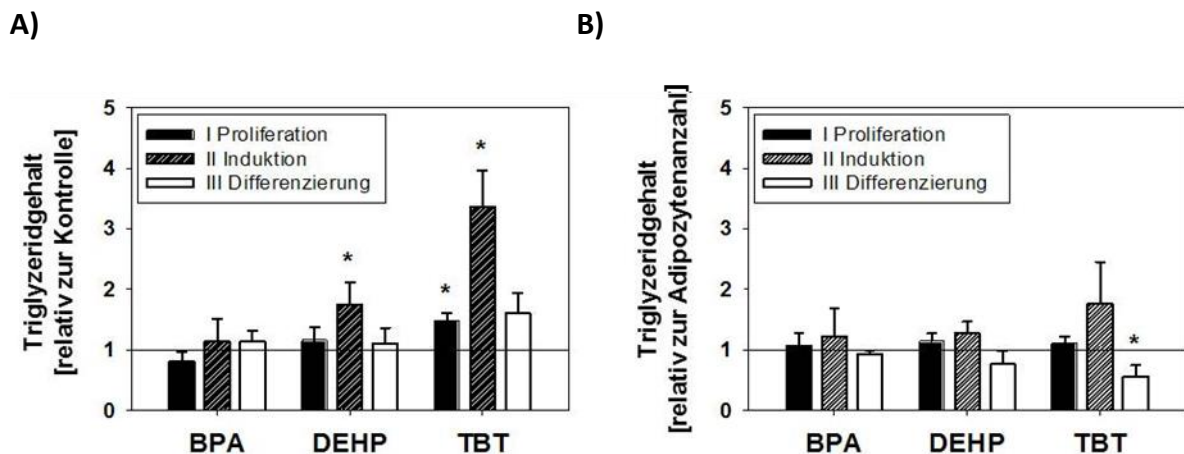


Abbildung 18: **Gesamt-Triglyzeridgehalt von stadienspezifisch behandelten C3H10T1/2-MSK.** Die Zellen wurden während verschiedener Phasen der adipogenen Differenzierung i.e. Proliferation (Tag 0-6), Induktion (Tag 8-12) und Differenzierung (Tag 8-12) mit BPA (10 nM), DEHP (100 nM) oder TBT (1 nM) behandelt. Der Gesamt-Triglyzeridgehalt wurde an Tag 12 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. **(A)** Triglyzeridgehalt in 2×10^5 Zellen und **(B)** relativer Triglyzeridgehalt der Adipozyten. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet und als gerade Linie gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; * $p < 0,05$; Student's *t*-Test.

4.3.3.3 Stadienspezifischer Einfluss auf die mRNA-Expression adipogener Markergene

Die BPA-Behandlung von C3H10T1/2-MSK während der Proliferation führte zu einer verminderten mRNA-Expression der adipogenen Markergene Fabp4, Pparg2, Lpl und Adipoq an Tag 12, dem Ende der adipogenen Differenzierung (Abbildung 19). In späteren Stadien hatte eine BPA-Exposition keinen Einfluss auf die mRNA-Mengen dieser Gene. Im Gegensatz

dazu führte DEHP zu einer gesteigerten mRNA-Expression dieser adipogenen Markergene, wenn die Zellen während der Induktionsphase behandelt wurden. TBT führte in allen untersuchten Differenzierungsstadien zu einer gesteigerten mRNA-Expression dieser Gene.

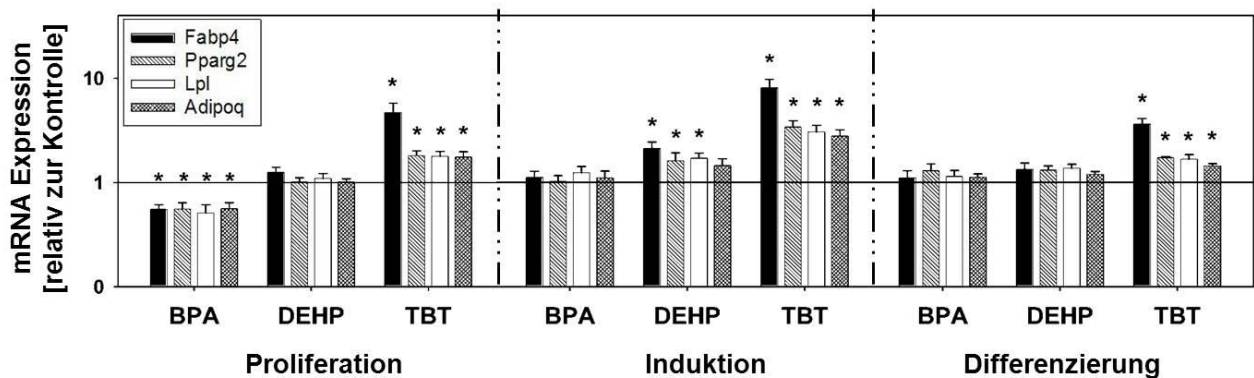


Abbildung 19: mRNA-Expression der adipogenen Markergene Fabp4, Pparg2, Lpl und Adipoq von stadienspezifisch behandelten C3H10T1/2-MSC. Die Zellen wurden während verschiedener Phasen der adipogenen Differenzierung i.e. Proliferation (Tag 0-6), Induktion (Tag 8-12) und Differenzierung (Tag 8-12) mit BPA (10 nM), DEHP (100 nM) oder TBT (1 nM) behandelt. Die mRNA-Expression wurde an Tag 12 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet und als gerade Linie gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; *p<0,05; Student's t-Test.

4.4 Metabolisierung von DEHP zu MEHP in C3H10T1/2-MSC

In C3H10T1/2-MSC wurde untersucht, ob die Zellen DEHP metabolisieren und den dabei entstehenden Monoester MEHP anreichern. Dazu wurden MSC für 48 Stunden im undifferenzierten Zustand (Tag 4-6), während des gesamten Differenzierungsprotokolls (Tag 0-12) oder als Adipozyten (Tag 10-12) mit 100 μ M DEHP exponiert (Abbildung 5). Die MEHP-Konzentration wurde im Zelllysate bestimmt und mit dem Gesamtproteingehalt normalisiert (Abbildung 20). Dabei zeigte sich, dass DEHP-exponierte Zellen deutlich höhere MEHP-Konzentrationen aufwiesen als korrespondierende DMSO-behandelte Kontrollen. Außerdem wurde beobachtet, dass die Zellen während der Langzeitexposition MEHP akkumulieren und Adipozyten mehr MEHP anreichern als undifferenzierte MSC.

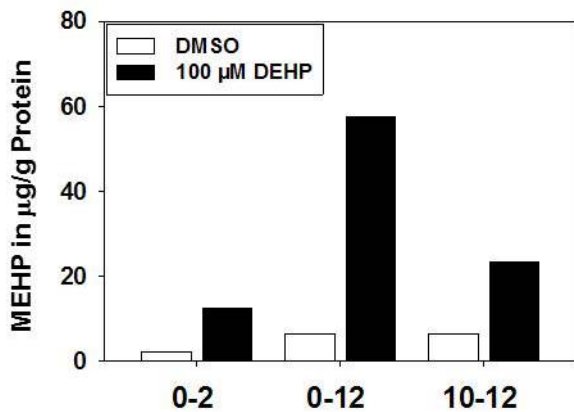


Abbildung 20: **MEHP-Konzentration im Zelllysat von C3H10T1/2-MSC nach Exposition mit DEHP.** C3H10T1/2-MSC wurden für zwei Tage (Tag 4-6), während der adipogenen Differenzierung (Tag 0-12) oder als Adipozyten (Tag 10-12) mit 100 µM DEHP oder DMSO inkubiert. Der intrazelluläre MEHP-Gehalt wurde in Relation zum Proteingehalt bestimmt. N = 1.

4.5 Einfluss der EDC auf die adipogene Differenzierung pluripotenter CGR8-ESC

Pluripotente CGR8-ESC wurden zu Adipozyten differenziert und während der gesamten Differenzierungsphase (Abbildung 6) mit den NOAEL-orientierten EDC-Konzentrationen 10 µM BPA, 100 µM DEHP oder 100 nM TBT behandelt. Der Einfluss der EDC auf die Entstehung von Adipozyten wurde ermittelt, indem die Anzahl der entstanden Fettzellen und des Gesamt-TG-Gehalts quantitativ bestimmt wurden.

4.5.1 Einfluss auf die Adipozytenmenge (Hyperplasie)

Die Anzahl der gebildeten Fettzellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es zeigte sich, dass die Exposition von CGR8-ESC mit BPA, DEHP oder TBT während des gesamten Differenzierungsprotokolls keinen Einfluss auf die Menge der entstandenen Adipozyten (Abbildung 21) und den mittleren zellulären TG-Gehalt der Fettzellen (Abbildung 21) hatte. Die Ergebnisse wurden in Relation zu korrespondierenden DMSO-behandelten Zellen ausgewertet.

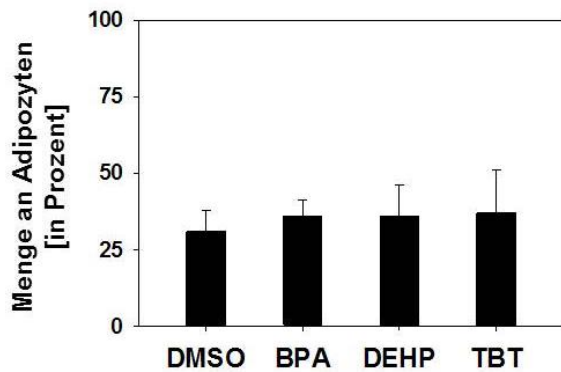


Abbildung 21: **Bestimmung der Anzahl an Adipozyten von langzeitbehandelten CGR8-ESC.** Die Zellen wurden während der adipogenen Differenzierung mit BPA (10 nM), DEHP (100 nM) oder TBT (1 nM) behandelt. Die Menge an Adipozyten wurde an Tag 28 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3.

4.5.2 Einfluss auf den Triglyzeridgehalt (Hypertrophie)

Die TG-Bestimmung erfolgte quantitativ aus 2×10^5 Zellen. Um einen Rückschluss auf den zellulären TG-Gehalt der Adipozyten zu ziehen, wurde der Gesamt-TG-Gehalt mit der ermittelten Anzahl an Fettzellen ins Verhältnis gesetzt. Es zeigte sich, dass der Gesamt-TG-Gehalt (Abbildung 22A) mit dem zellulären TG-Gehalts der Adipozyten (Abbildung 22B) korrelierte. Die EDC-Behandlung der ESC führte zu keiner signifikanten Veränderung des TG-Gehalts.

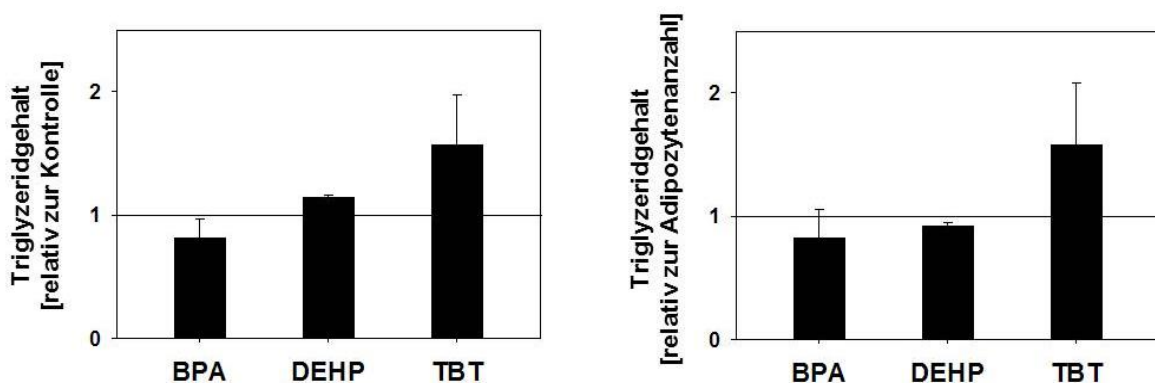


Abbildung 22: **Gesamt-Triglyzeridgehalt von langzeitbehandelten CGR8-ESC.** Die Zellen wurden während der adipogenen Differenzierung mit BPA (10 μ M), DEHP (100 μ M) oder TBT (100 nM) behandelt. Der Gesamt-Triglyzeridgehalt wurde an Tag 28 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. **(A)** Triglyzeridgehalt in 2×10^5 Zellen und **(B)** relativer Triglyzeridgehalt der Adipozyten. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet und als gerade Linie gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N=3.

4.6 Induzierbarkeit von PPAR γ

Da BPA (10 μ M), DEHP (100 μ M) und TBT (100 nM) die Adipogenese von MSC stadienspezifisch beeinflussen, wurde untersucht, ob diese Wirkung durch den Transkriptionsfaktor PPAR γ vermittelt wird. Die Wirkung der EDC auf die Induzierbarkeit von PPAR γ wurde mittels eines Reporterassays bestimmt (Kap. 3.6). Dafür wurden undifferenzierte C3H10T1/2-MSK mit einem PPRE-Plasmid transfiziert, welches mit einer Firefly-Luziferase gekoppelt ist. Die Zellen wurden außerdem mit einem Referenz-Plasmid transfiziert, welches konstitutiv eine Renilla-Luziferase exprimiert. Mittels Chemilumineszenzmessung wurde untersucht, ob eine EDC-Exposition zu einer vermehrten Aktivität der PPAR γ -abhängigen Firefly-Luziferase führt.

4.6.1 Induzierbarkeit von PPAR γ in undifferenzierten C3H10T1/2-MSK

Verglichen mit DMSO führte in undifferenzierten MSC keines der eingesetzten EDC zu einer veränderten Aktivität der PPAR γ -abhängigen Firefly-Luziferase (Abbildung 23). Auch der als Positivkontrolle eingesetzte klassische PPAR γ -Aktivator Rosiglitazon (500 nM) zeigte in undifferenzierten MSC keine Wirkung auf die Induzierbarkeit des PPAR γ -abhängigen Reporterassays.

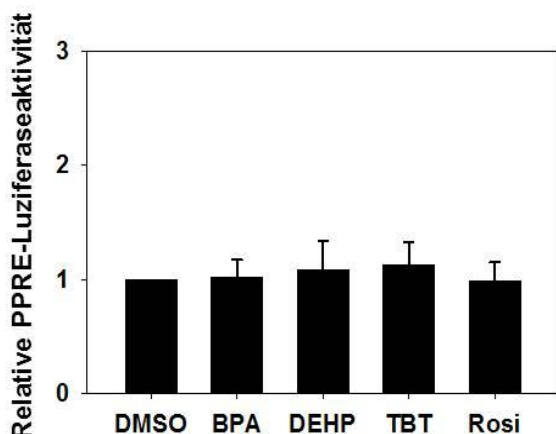


Abbildung 23: **Induzierbarkeit von PPAR γ in undifferenzierten C3H10T1/2-MSK.** Die Wirkung von 10 μ M BPA, 100 μ M DEHP, 100 nM TBT und 500 nM Rosiglitazon auf ein PPRE-gekoppeltes Reporterassay wurde in Relation zu DMSO untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3.

4.6.2 Induzierbarkeit von PPARg in Pparg2 überexprimierenden C3H10T1/2-MSK

Um zu untersuchen, ob PPARg2 durch die EDC aktiviert wird, wurde Pparg2 in undifferenzierten C3H10T1/2-MSK mittels Plasmidtransfektion überexprimiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einer PPRE-gekoppelten Firefly-Luziferase transfiziert. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle führte die Exposition der transfizierten Zellen mit DEHP, TBT und 500 nM Rosiglitazon zu einer verstärkten Aktivität der PPARg-abhängigen Firefly-Luziferase (Abbildung 24).

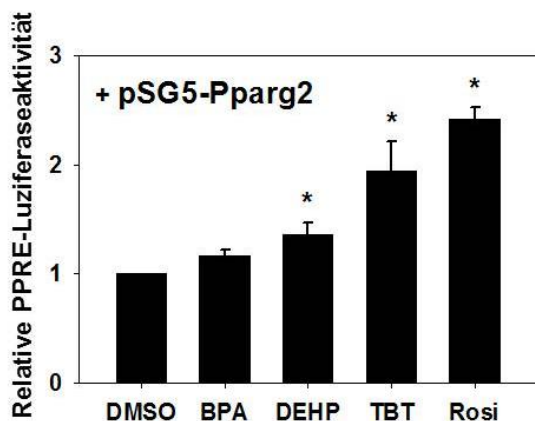


Abbildung 24: **Induzierbarkeit von PPARg in Pparg2-überexprimierenden C3H10T1/2-MSK.** Die Wirkung von 10 μ M BPA, 100 μ M DEHP, 100 nM TBT und 500 nM Rosiglitazon auf ein PPRE-gekoppeltes Reportergen wurde in Relation zu DMSO untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; Student's *t*-Test.

4.7 Expressionsprofil adipogener Markergene während der adipogenen Differenzierung von C3H10T1/2-MSK

Die mRNA-Expression der adipogenen Markergene Pparg1, Pparg2 und Fabp4 wurde während der adipogenen Differenzierung nach 6 Tagen (undifferenzierte MSC), nach 8 Tagen (Induktion) und nach 12 Tagen (terminale Differenzierung) quantitativ mittels Real-time RT-PCR bestimmt. Zum Vergleich der Genexpression zwischen diesen Stadien wurde die absolute Transkriptmenge in Relation zur ribosomalen 18S rRNA angegeben. Mittels Western Blot wurde außerdem die Proteinmenge von PPARg1 und PPARg2 zwischen den unterschiedlichen Differenzierungsphasen verglichen.

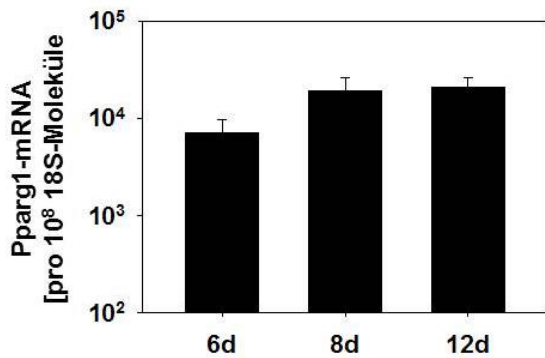
4.7.1 mRNA-Expression und Proteinmenge von PPARg1 und PPARg2

Während die mRNA-Expression von Pparg1 im Verlauf der adipogenen Differenzierung annähernd gleich blieb, wurde während der hormonellen Induktion ein 500-facher Anstieg der mRNA-Menge von Pparg2 beobachtet (Abbildung 25). Die Genexpression von Pparg2 stieg dabei auf ein mit Pparg1 vergleichbares Level an. Während der terminalen Differenzierung wurde kein weiterer Anstieg der Transkriptmenge von Pparg2 beobachtet. Eine Proteinexpression von PPARg2 war in undifferenzierten MSC nicht nachweisbar (Abbildung 25). Die Proteinmenge von PPARg2 stieg jedoch während der Induktion an und blieb in der terminalen Differenzierung erhöht. Während der Induktion war die Proteinmenge von PPARg2 vergleichbar mit der von PPARg1 während des undifferenzierten Stadiums.

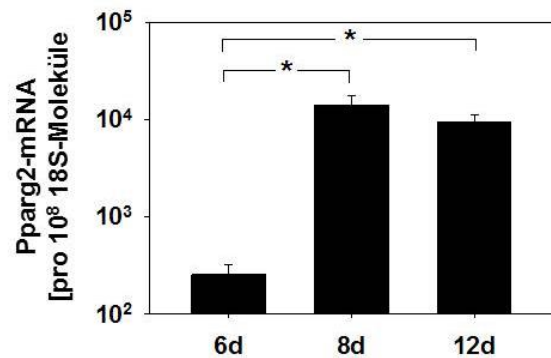
4.7.2 mRNA-Expression von Fabp4

Als PPARg-abhängiger adipogener Marker wurde die stadienspezifische mRNA-Expression von Fabp4 quantitativ mittels Real-time RT-PCR untersucht. Während der hormonellen Induktion (Tag 8) kam es zu einem 1.000-fachen Anstieg der Fabp4-Transkriptmenge. Während der terminalen Differenzierung war ein weiterer signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von Fabp4 zu beobachten (Abbildung 26).

A)



B)



C)

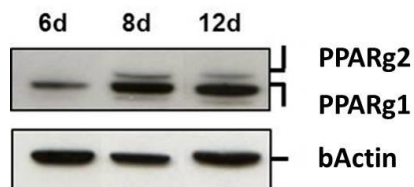


Abbildung 25: mRNA-Menge (A, B) und Proteinmenge (C) von PPARg1 und PPARg2 während verschiedener Phasen der adipogenen Differenzierung von C3H10T1/2-MSC. Die mRNA- und Proteinexpression von PPARg wurden nach 6, 8 und 12 Tagen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; *p<0,05; Student's t-Test.

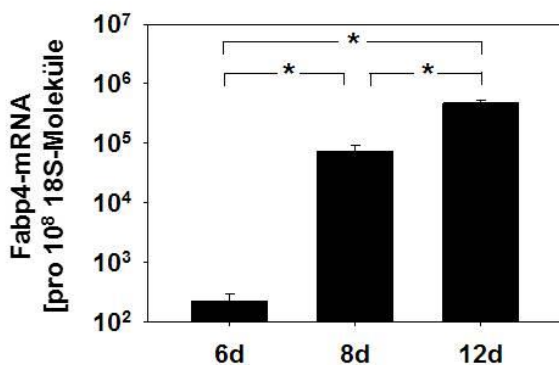


Abbildung 26: mRNA-Menge von Fabp4 während verschiedener Phasen der adipogenen Differenzierung von C3H10T1/2-MSC. Die mRNA-Expression von Fabp4 wurde nach 6, 8 und 12 Tagen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; *p<0,05; Student's t-Test.

4.8 Wirkung von TBT auf die Determinierungsphase von C3H10T1/2-MS

Der Einfluss von TBT auf die Determinierung von MSC wurde im Vergleich zum klassischen PPARg-Aktivator Rosiglitazon untersucht. Dafür wurden undifferenzierte C3H10T1/2-MS von Tag 0-4 mit 100 nM TBT oder 500 nM Rosiglitazon behandelt. Die Wirkung von TBT auf die mRNA-Menge der Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle Pparg, Fabp4, Dlk1, Sox9, Sox5, Sox6, Runx2 und Col2a1, welche die Determinierung von MSC regulieren bzw. als Marker der Determinierung fungieren, wurde am Ende der Proliferationsphase bestimmt (Tag 6).

Die während der Proliferation behandelten MSC wurden in einem weiteren Ansatz adipogen differenziert (Abbildung 5), um zu untersuchen, ob in Folge der TBT-Behandlung vermehrt Fettzellen entstehen, und ob dieser Effekt auch durch den PPARg-Aktivator Rosiglitazon hervorgerufen wird. Die Ergebnisse wurden in Relation zu korrespondierenden DMSO-behandelten Zellen ausgewertet.

4.8.1 Einfluss von TBT auf Gene der Determinierung

Die Exposition undifferenzierter MSC mit TBT und Rosiglitazon führte in undifferenzierten MSC zu einer gesteigerten mRNA-Expression von Pparg2 und Fabp4 (Abbildung 27). Die Wirkung von Rosiglitazon lag dabei signifikant über der von TBT. Im Gegensatz zu Rosiglitazon führte die TBT-Behandlung außerdem zu verminderten mRNA-Mengen von Sox9, Sox6, Dlk1, Runx2 und Col2a1.

4.8.2 Wirkung von TBT auf die nachgeschaltete adipogene Differenzierung

Die quantitativ mittels Durchflusszytometrie und qualitativ mittels Mikroskopie bestimmte Anzahl an Adipozyten ergab, dass die TBT-Behandlung undifferenzierter C3H10T1/2-MS von Tag 0-4 zu einer gesteigerten Bildung von Adipozyten während der nachgeschalteten adipogenen Differenzierung führte (Abbildung 28A). Im Gegensatz zu TBT hatte eine korrespondierende Rosiglitazonbehandlung keine Wirkung auf die Menge der gebildeten Adipozyten in der anschließenden adipogenen Differenzierungsphase (Abbildung 28B).

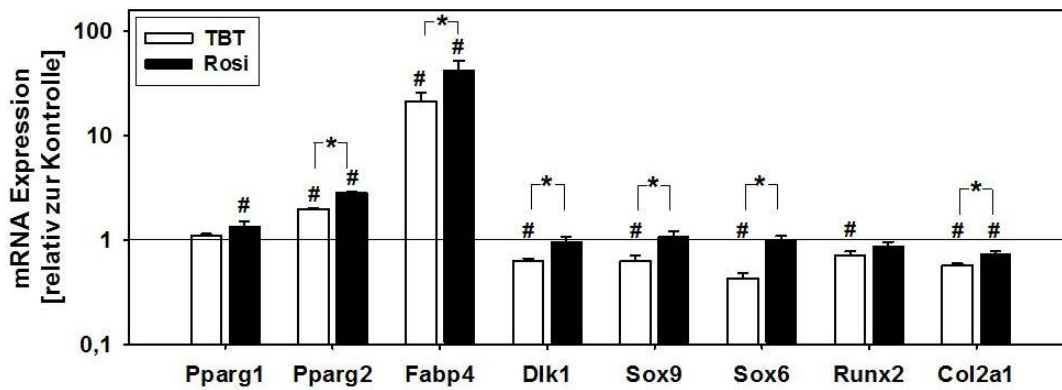
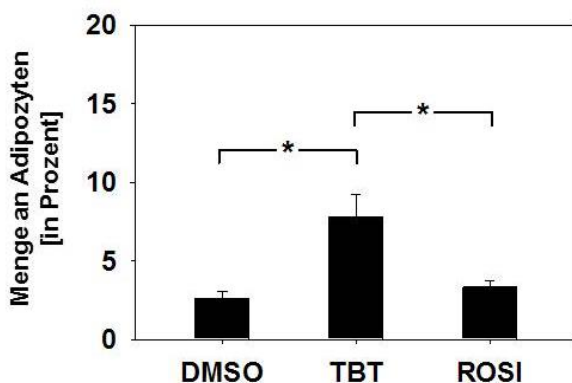


Abbildung 27: **mRNA-Menge von Genen der Determinierung von C3H10T1/2-MSC.** Undifferenzierte C3H10T1/2-MSC wurden von Tag 0-4 mit 100 nM TBT oder 500 nM Rosiglitazon behandelt. Die mRNA-Expression von Pparg1, Pparg2, Fabp4, Dlk1, Sox9, Sox6, Runx2 und Col2a1 wurde am Tag 6 bestimmt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet und als gerade Linie gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; # $p < 0.05$ vs. DMSO; * $p < 0.05$ vs. Rosiglitazon; Student's t-Test.

A)



B)

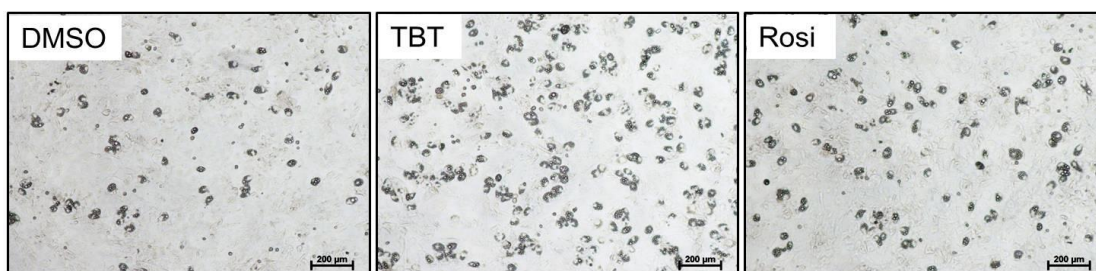


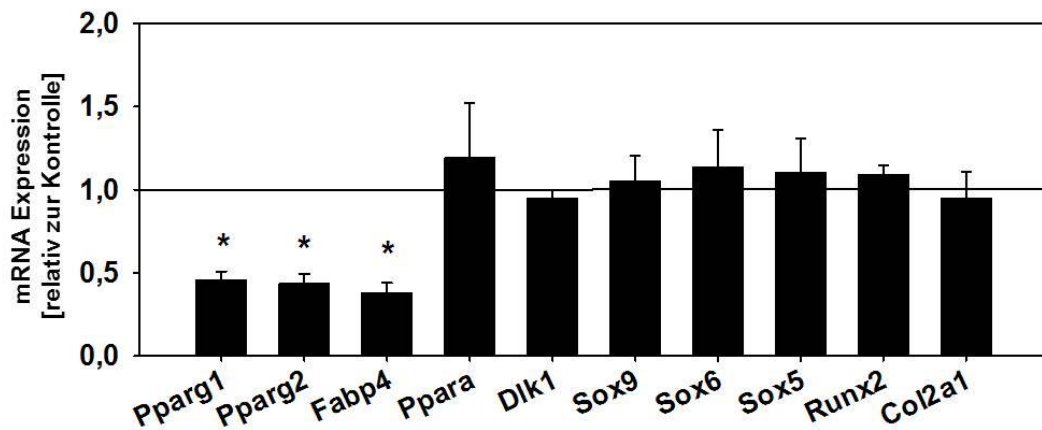
Abbildung 28: **Quantitative (A) und lichtmikroskopische (B) Bestimmung der Anzahl an Adipozyten von undifferenziert TBT-exponierten C3H10T1/2-MSC.** Undifferenzierte MSC wurden von Tag 0-4 mit 100 nM TBT oder 500 nM Rosiglitazon behandelt und anschließend zu Adipozyten differenziert. Die Menge an Adipozyten wurde an Tag 12 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; * $p < 0,05$; Student's t-Test. Maßstab \triangleq 200 μ m.

4.9 Knockdown von PPARg

Um zu untersuchen, ob der Einfluss von TBT auf Gene der Determinierung von MSC PPARg-abhängig ist, wurde die Gen- und Proteinexpression von PPARg mittels Pparg-spezifischer siRNA herabreguliert (Abbildung 29). Dabei kam es zu einer signifikant verminderten mRNA-Expression von Pparg1, Pparg2 und Fabp4 (Abbildung 29A). Auf die mRNA-Menge der Isoform Ppara sowie Dlk1, Sox9, Sox6, Sox5, Runx2 und Col2a1 hatte die siRNA-Behandlung keinen Einfluss. Dieses Ergebnis bestätigte sich auf Proteinebene für PPARg, PPARa und SOX9. Das PPARg2-Protein war in undifferenzierten MSC nicht nachweisbar (Abbildung 29B).

A)



B)

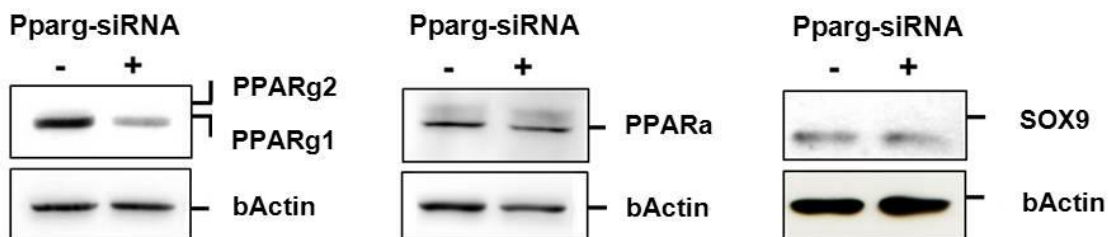


Abbildung 29: mRNA-Menge (A) und Proteinmenge (B) von Genen und Proteinen der Determinierung von C3H10T1/2-MSK nach PPARg-Knockdown. Die mRNA- und Proteinmengen wurden nach siRNA-Behandlung in undifferenzierten MSC am Tag 6 bestimmt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet und als gerade Linie gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; * $p < 0,05$; Student's *t*-Test.

4.10 Einfluss eines PPARg-Knockdown auf die adipogene Wirkung von TBT in C3H10T1/2-MSC

Um zu untersuchen, ob der adipogene Einfluss von TBT innerhalb der Proliferationsphase PPARg-abhängig ist, wurde die Wirkung von 100 nM TBT in PPARg-defizienten MSC mit der von 500 nM Rosiglitazon verglichen. Dafür wurden undifferenzierte C3H10T1/2-MSC mit Pparg-spezifischer siRNA behandelt und anschließend für 24 Stunden mit TBT oder Rosiglitazon inkubiert. Der Versuch wurde parallel in nicht siRNA-transfizierten Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Relation zu korrespondierenden nicht PPARg-defizienten DMSO-behandelten Zellen ausgewertet.

4.10.1 Einfluss von TBT auf Gene der adipogenen Determinierung

Die Wirkung von TBT und Rosiglitazon auf verschiedene Gene der Determinierung wurde in undifferenzierten C3H10T1/2-MSC am Tag 6 untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von TBT und Rosiglitazon in C3H10T1/2-MSC bestimmt, welche zuvor mit siRNA gegen Pparg transfiziert wurden. Die Ergebnisse beider parallel durchgeführter Experimente wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse statistisch ausgewertet.

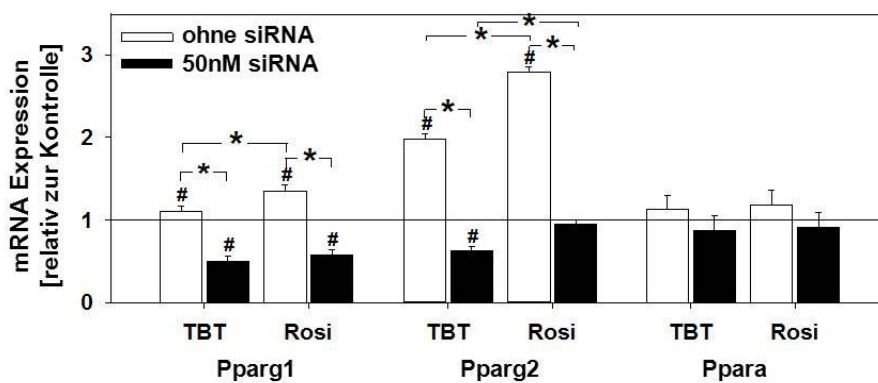
Dabei zeigte sich, dass sowohl TBT als auch Rosiglitazon in undifferenzierten MSC zu einer erhöhten mRNA-Expression von Pparg1 und Pparg2 führten, wobei die Wirkung von Rosiglitazon signifikant stärker ausgeprägt war als die von TBT (Abbildung 30).

In PPARg-defizienten TBT- bzw. Rosiglitazon-behandelten MSC war die mRNA-Expression von Pparg1 hingegen um ca. 50% vermindert. Dies wurde in PPARg-defizienten TBT-behandelten MSC auch für die mRNA-Expression von Pparg2 beobachtet. Die mRNA-Expression von Pparg2 war in PPARg-defizienten Rosiglitazon-behandelten MSC jedoch vergleichbar mit der Pparg2-Expression nicht siRNA-transfizierter DMSO-behandelter MSC (Abbildung 30A). Auf den mRNA-Gehalt der Isoform Ppara hatte weder die siRNA-Behandlung noch die TBT- bzw. Rosiglitazon-Exposition einen Einfluss.

Die mRNA-Menge von Sox9, Dlk1 und Runx2 war in TBT-behandelten C3H10T1/2-MSC signifikant vermindert (Abbildung 30B). Eine Beobachtung die auch gemacht wurde, wenn

die Zellen vor der TBT-Exposition mit PPARg-spezifischer siRNA transfiziert wurden. Die Behandlung der MSC mit Rosiglitazon hatte jedoch weder in siRNA-transfizierten noch in nicht-transfizierten MSC eine Wirkung auf die mRNA-Expression von Sox9 und Dlk1. Allein in siRNA-behandelten MSC kam es in Folge der Rosiglitazon-Exposition zu einer vermehrten mRNA-Expression von Runx2.

A)



B)

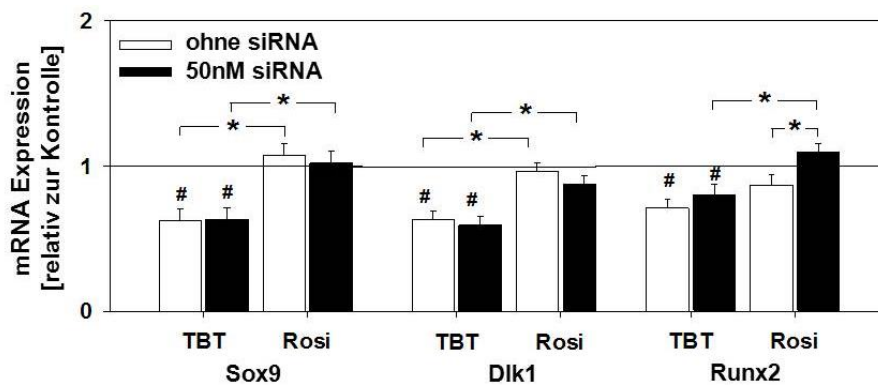
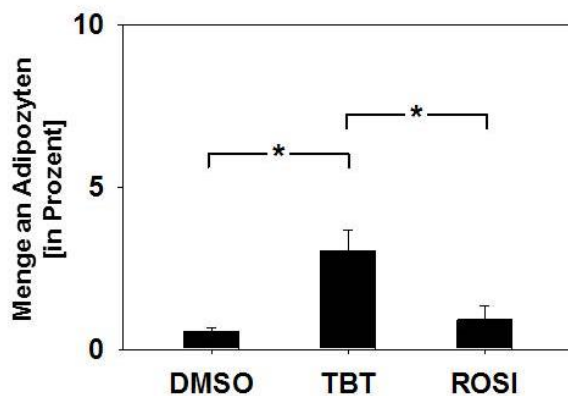


Abbildung 30: mRNA-Menge von Genen der adipogenen Determinierung von C3H10T1/2- MSC nach PPARg-Knockdown. Die mRNA-Expression von (A) Pparg1, Pparg2 und Ppara sowie (B) Sox9, Dlk1 und Runx2 in 100 nM TBT- oder 500 nM Rosiglitazon-behandelten PPARg-exprimierenden (weiße Balken) bzw. PPARg-defizienten (schwarze Balken) MSC an Tag 6 der Proliferationsphase. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet und in nicht siRNA-behandelten Zellen als gerade Linie gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; #p<0.05 vs. DMSO; *p<0.05 vs. Rosiglitazon; Zweifaktorielle ANOVA und Bonferroni *post hoc* Test.

4.10.2 Wirkung von TBT auf die adipogene Differenzierung

PPAR γ -defiziente C3H10T1/2-MSK wurden für 24 Stunden mit TBT bzw. Rosiglitazon behandelt und anschließend adipogen differenziert. An Tag 12 wurde die Anzahl an Fettzellen quantitativ mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 31A) und qualitativ am Mikroskop verifiziert (Abbildung 31B). Dabei zeigte sich, dass die Exposition mit TBT verglichen mit DMSO und Rosiglitazon zu einer signifikant erhöhten adipogenen Differenzierungsrate führte.

A)



B)

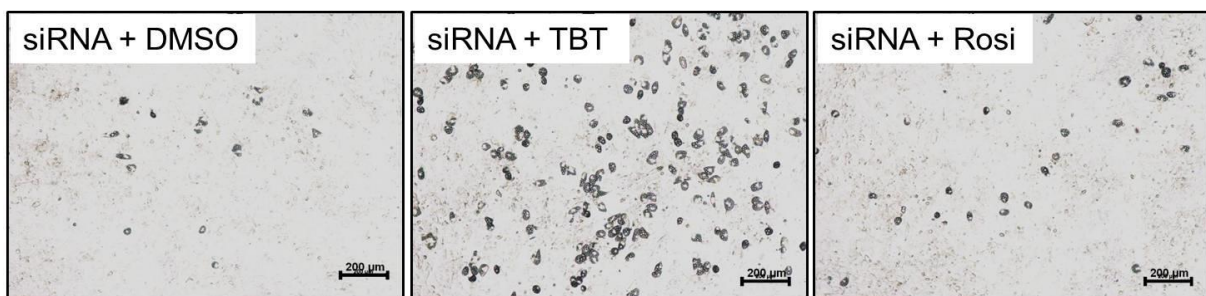


Abbildung 31: **Quantitative (A) und lichtmikroskopische (B) Bestimmung der Anzahl an Adipozyten von Pparg-siRNA behandelten C3H10T1/2-MSK.** Undifferenzierte PPAR γ -defiziente MSC wurden für 24 Stunden mit 100 nM TBT bzw. 500 nM Rosiglitazon behandelt und anschließend zu Adipozyten differenziert. Die Menge an Adipozyten wurde an Tag 12 des Differenzierungsprotokolls bestimmt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit N = 3; *p < 0,05; Student's *t*-Test. Maßstab \cong 200 μ m.

5. Diskussion

Der weltweite Anstieg der Adipositasprävalenz korreliert mit der steigenden Produktion, dem Konsum und der Umweltverschmutzung durch Kunststoffe [9]. Polymere Kunststoffe können Additive wie zum Beispiel Bisphenol A (BPA), Diethylhexylphthalat (DEHP) oder Tributylzinn (TBT) enthalten. Solche Additive können sich aus der Polymermatrix lösen und über die Nahrung aufgenommen werden. Die als *endocrine disrupting compounds* (EDC) eingestuft Substanzen BPA, DEHP und TBT können heute bei einem Großteil der Bevölkerung nachgewiesen werden [41,42,66-68,79,86]. Da vermutet wird, dass diese Stoffe als *Obesogene* an der weltweit steigenden Prävalenz von Adipositas beteiligt sind [29], wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss dieser EDC auf die Entstehung von Adipozyten aus Stammzellen *in vitro* untersucht.

5.1 Konzentrationsbereich und zytotoxische Dosis-Wirkungs-Beziehung von BPA, DEHP und TBT in embryonalen Stammzellen

Um geeignete EDC-Konzentrationen für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Versuche zu ermitteln, wurden in Bezug auf die Parameter Zytotoxizität und Zellproliferation die *lowest observed adverse effect level* (LOAEL) in murinen embryonalen Stammzellen der Linien CGR8 und C3H10T1/2 bestimmt. Dazu wurden Zellen beider Linien in geringer Zellzahl ausplattiert und mit verschiedenen Konzentrationen BPA, DEHP und TBT über 72 Stunden kultiviert. Anschließend wurde innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase mittels MTT-Test die zelluläre Reduktionskapazität, Tetrazoliumsalze in Formazanderivate zu metabolisieren, bestimmt. Das Ergebnis erlaubt Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zellen. Innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase kann von einer linearen Beziehung zwischen Formazanproduktion und der Zellzahl ausgegangen werden [120].

Beide Zelllinien reagierten mit einer verminderten Formazanproduktion, wenn sie mit 100 μM BPA behandelt wurden. Im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100 μM hatte die Exposition mit DEHP keinen Einfluss auf die zelluläre Reduktionskapazität, wohingegen TBT ab 500 nM zytotoxische bzw. proliferationshemmende Effekte verursachte. Als NOAEL wurden aufgrund der Vorversuche für BPA 10 μM , für DEHP 100 μM und für TBT 100 nM

festgelegt. Diese Konzentrationen erwiesen sich nicht als toxisch und hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen. Ähnliche Konzentrationen wurden auch in *in vivo* und *in vitro* Studien anderer Autoren verwendet [30,105,121], was einen Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichte.

Als umweltrelevante Expositionskonzentrationen wurden im Rahmen dieser Arbeit 10 nM BPA, 100 nM DEHP und 1 nM TBT festgelegt. Diese orientieren sich an den von der EFSA festgelegten TDI-Werten sowie den in humanen Gewebe- bzw. Urinproben nachweisbaren Konzentrationen [42,68,79].

5.2 Einfluss umweltrelevanter EDC-Konzentrationen auf die Entstehung von Fettzellen

Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass verschiedene Krankheiten und Symptome mit der Exposition bestimmter EDC in Zusammenhang stehen. Die Exposition mit BPA stört beispielsweise die Ausprägung des geschlechtsspezifischen Verhaltens von Kindern [122]. Phthalate werden mit dem Auftreten von Fertilitätsstörungen [123], Endometriose [124] und der Entstehung von Adipositas [125] in Verbindung gebracht. Und auch andere EDC, wie beispielsweise TBT, stehen im Verdacht, die Entstehung von Adipositas als Obesogene zu beeinflussen [126].

Dabei können EDC bereits in „sehr geringen“ Konzentrationen schädigende Effekte verursachen [16]. Unter geringen Konzentrationen versteht man Konzentrationen, welche in der humanen Umwelt vorkommen oder welche niedriger als der bisher beobachtete toxikologische LOAEL sind. Rubin *et al.* haben an Mäusen nachgewiesen, dass BPA bei einer perinatalen Exposition der Nachkommen über das Trinkwasser der Muttertiere nur in geringer (0,1 mg BPA/kg Körpergewicht/Tag) und nicht bei hoher Konzentration (1,2 mg BPA/kg Körpergewicht/Tag) die Entstehung von Adipositas induziert [34]. Übereinstimmend entwickelten Mausembryonen, welche im Zwei-Zell-Stadium mit der umweltrelevanten BPA-Konzentration von 1 nM behandelt und in scheinchwangere Mäuse transferiert wurden, postnatal ein signifikant höheres Körpergewicht als unbehandelte Kontrolltiere [127]. Bei Fütterungsversuchen mit adulten ovariectomierten Ratten führten hohe BPA-

Konzentrationen (5 mg/Tag) hingegen zu einer Reduktion des Körpergewichts, wobei die geringere Konzentration (1 mg/Tag) keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung hatte [128].

Im Fall von TBT ist während der Gravidität von Mäusen bereits bei einer kontinuierlichen Trinkwasserexposition von 5,42 nM eine generationsübergreifende adipogene Wirkung nachgewiesen worden [129]. Und auch DEHP führt in TDI-orientierten Konzentrationen (50 µg/kg Körpergewicht/Tag) bei adulten Mäusen zu einer signifikant erhöhten Gewichtszunahme und einem Anstieg der viszeralen Fettmenge [74]. Eine Wirkung, welche die Autoren auch in den Nachkommen von während der Gravidität und Laktation mit 50 µg/kg Körpergewicht/Tag behandelten Muttertieren beobachtet haben [74].

Diese Studien zeigen, dass EDC während bestimmter sensibler Phasen der Entwicklung bereits in geringen Konzentrationen postnatale Veränderungen in der Gewichts- und Fettgewebsentwicklung auslösen können. Um den Einfluss umweltrelevanter Expositionskonzentrationen auf die Entstehung von Fettzellen *in vitro* zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit mit 10 nM BPA, 100 nM DEHP und 1 nM TBT gearbeitet. Diese umweltrelevanten Konzentrationen zeigten jedoch keinen Einfluss auf die von uns beobachteten adipogenen Endpunkte.

Die beschriebenen *in vivo* Effekte waren *in vitro* nicht nachweisbar. Die eingesetzten umweltrelevanten Konzentrationen waren möglicherweise zu gering, um *in vitro* adipogene Effekte zu verursachen. Die Dissoziationskonstante von TBT liegt beispielsweise für RXRa und PPARγ bei 12,5 nM bzw. 20 nM (32) und somit höher als die von uns eingesetzte umweltrelevante Konzentration von 1 nM.

Auch sind Kontaminationen durch die Verwendung von Plastikwaren nicht auszuschließen. Der innerhalb dieser Arbeit durchgeführte Nachweis von MEHP zeigte deutlich, dass auch in nicht DEHP-behandelten Zellen und Zellüberständen MEHP nachweisbar ist, und dass sich MEHP mit steigendem adipogenen Differenzierungsgrad auch in unbehandelten Zellen anreichert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde während der Kultur fast ausschließlich mit Gefäßen gearbeitet, welche aus Polystyrol, Polypropylen oder Polyester hergestellt waren. Diese Kunststoffpolymere sollten weder BPA noch DEHP oder TBT enthalten. Als eine mögliche Kontaminationsquelle für MEHP kommen Proteinzusätze oder aus Polyethylenterephthalat hergestellte Serum- und Medienbehälter in Frage [130].

Während normaler Versuchs- und Haltungsbedingungen können solche ungewollten EDC-Expositionen schädigende Effekte ausüben. So kam es beispielsweise nach einer scharfen Reinigung polycarbonathaltiger Tierkäfige bei Mäusen zu meiotischen Veränderungen während der Eizellreifung, was mit einer erhöhten BPA-Freisetzung erklärbar war [131].

Die oben beschriebenen *in vivo* Effekte standen in Abhängigkeit zum Zeitpunkt der Exposition. In den meisten Fällen traten die Effekte auf, wenn die Tiere bereits *in utero* oder perinatal exponiert worden waren. Von diesem breiten Zeitfenster geben die vorliegenden *in vitro* Versuche zur adipogenen Differenzierung von C3H10T1/2 MSC jedoch nur einen kleinen Ausschnitt wieder. Aufgrund von Unterschieden zwischen fetalem und adultem Stoffwechsel kann es *in vivo* außerdem zu einer Akkumulation in bestimmten Geweben gekommen sein [54,55], was zur Folge hätte, dass den resultierenden *in vivo* Effekten lokal höhere Konzentrationen zu Grunde gelegen haben.

5.3 Einfluss von BPA, DEHP und TBT auf die adipogene Differenzierung pluripotenter embryonaler Stammzellen

Der Einfluss von BPA, DEHP und TBT auf die Differenzierung von Fettzellen aus embryonalen Stammzellen ist abhängig vom Entwicklungsstadium der Zellen und der Beeinflussbarkeit vorhandener Signalwege während dieser Stadien. BPA, DEHP und TBT verursachen transgenerationale Effekte und führen während der Embryonalentwicklung zu epigenetischen Veränderungen [30,129,132-134]. Solche EDC-bedingten Veränderungen könnten an der weltweit zunehmenden Adipositasprävalenz beteiligt sein [129,134].

Murine embryonale Stammzellen der Linie CGR8 sind pluripotent [107]. Sie haben somit die Fähigkeit, in alle Zelltypen der drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm, Mesoderm) zu differenzieren und stellen dadurch eine Möglichkeit dar, den adipogenen Einfluss der EDC im Stadium der Pluripotenz zu untersuchen. Dafür wurden CGR8-Zellen während der Proliferationsphase mit BPA, DEHP oder TBT in den NOAEL-orientierten effektiven Konzentrationen exponiert und anschließend zu Adipozyten differenziert (Abbildung 6) [109]. Um den pluripotenten Charakter der Zellen innerhalb der Proliferationsphase aufrechtzuerhalten, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Zytokin LIF behandelt [108].

Die während der Proliferationsphase durchgeführte Exposition pluripotenter CGR8-Zellen mit 10 µM BPA, 100 µM DEHP oder 100 nM TBT (Abbildung 6, undifferenziertes Wachstum) hatte keine Auswirkung auf die Anzahl der entstandenen Fettzellen. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass pluripotente CGR8-Zellen hinsichtlich der adipogenen Differenzierung im verwendeten Kulturmodell nicht sensitiv für EDC-Effekte sind.

Ein limitierender Faktor in der Bewertung der vorliegenden Ergebnisse ist die Verwendung von LIF zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz während der Proliferationsphase. Die Wirkung dieses Zytokins ist auf die Aktivierung des *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3* (Jak/Stat3)-Signalwegs zurückzuführen [108]. Dieser steuert über epigenetische Mechanismen, wie Histonmodifikationen und DNA-Methylierung, Prozesse der Reprogrammierung und Aufrechterhaltung der Pluripotenz [135]. Es ist daher möglich, dass EDC-induzierte epigenetische Veränderungen durch die gleichzeitige Wirkung von LIF maskiert bzw. aufgehoben wurden. Aufgrund der Kulturbedingungen zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz kann die Fragestellung, ob die untersuchten EDC die Entstehung von Adipozyten aus pluripotenten Zellen über epigenetische Mechanismen beeinflussen, in vorliegendem Zellmodell nicht beantwortet werden.

5.4 BPA, DEHP und TBT beeinflussen die Entstehung von Adipozyten konzentrations- und stadienabhängig

Grundlage für die Entstehung von Adipositas ist zum einen die adipogene Determinierung von MSC zu Präadipozyten während der fetalen Entwicklung [92]. Zum anderen ist es die durch die Transkriptionsfaktoren C/EBPα und PPARγ gesteuerte adipogene Differenzierung dieser Präadipozyten zu reifen Fettzellen im Laufe des Lebens [100]. Multipotente murine embryonale MSC der Linie C3H10T1/2 bilden sowohl das Stadium der Determinierung von MSC als auch das der anschließenden Differenzierung ab [95]. Die adipogene *in vitro* Differenzierung dieser Stammzellen bietet eine Möglichkeit, den frühen Prozess der Determinierung vom anschließenden Differenzierungsprozess zu trennen. Sie stellt daher ein geeignetes Verfahren dar, um die Wirkung von EDC auf unterschiedliche Stadien der adipogenen Differenzierung zu untersuchen.

Um den generellen Einfluss von BPA, DEHP und TBT auf die adipogene Differenzierung von MSC zu ermitteln, wurden C3H10T1/2-Zellen über den gesamten Zeitraum der adipogenen Differenzierung (Abbildung 5) mit den umweltrelevanten bzw. NOAEL-orientierten Konzentrationen exponiert. Die adipogene Wirkung der EDC wurde am Ende des Differenzierungsprotokolls (Tag 12) analysiert. Dabei wurde die Anzahl an Adipozyten durchflusszytometrisch, der TG-Gehalt enzymatisch und die Expression adipogener Markergene wie Adipoq, Fabp4, Pparg2 und Lpl mittels Real-time RT-PCR bestimmt.

Während die umweltrelevanten Konzentrationen von BPA (10 nM), DEHP (100 nM) und TBT (1 nM) keinen Einfluss auf die adipogene Differenzierung der MSC hatten, führte die Langzeitexposition während des gesamten Differenzierungsprotokolls (12 Tage) mit BPA (10 µM) zu einer verminderten Entstehung von Fettzellen. Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit DEHP (100 µM) und TBT (100 nM) eine signifikant erhöhte Bildung von Adipozyten zur Folge.

Im weiteren Verlauf der Studie wurden die MSC während spezifischer ontogenetischer Phasen i.e. Proliferation (Tag 0-6), hormonelle Induktion (Tag 6-8) oder terminale Differenzierung (Tag 8-12), mit den wirksamen LOAEL-orientierten Konzentrationen BPA (10 µM), DEHP (100 µM) oder TBT (100 nM) exponiert und zu Adipozyten differenziert (Abbildung 5). Hier zeigte sich, dass BPA die Entstehung von Adipozyten hemmte, wenn die Zellen während der Proliferation behandelt wurden. Während dieser Phase haben die MSC offenbar Eigenschaften, welche sie für den Einfluss von BPA sensibel machen.

Stadienabhängig führte die Exposition mit DEHP (100 µM) während der hormonellen Induktion zu einer gesteigerten adipogenen Differenzierung. Diese für DEHP vulnerable Phase war durch eine initiale Expression und Aktivierbarkeit von PPARg2 gekennzeichnet. Während der vorangehenden Proliferations- und der nachfolgenden terminalen Differenzierungsphase hatte die Exposition mit DEHP jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl der entstandenen Fettzellen, den TG-Gehalt und die mRNA-Expression der untersuchten adipogenen Markergene.

Im Gegensatz zu BPA und DEHP führte die Behandlung der Zellen mit TBT (100 nM) in allen untersuchten Zeitfenstern zu einem Anstieg der adipogenen Differenzierung. Während die Differenzierung von Präadipozyten hauptsächlich durch PPARg2 reguliert wird [100,101],

sind während der ontogenetisch vorgeschalteten Determinierungsphase zelllinienregulierende Gene wie *Dlk1*, *Sox9* [97] und *wingless-type MMTV integration site protein 3a* (*Wnt3a*) [136] an der Bildung osteogener, myogener, chondrogener oder adipogener Vorläufer von Bedeutung. Der stadienübergreifende adipogene Effekt von TBT lässt die Schlussfolgerung zu, dass TBT verschiedene Mechanismen beeinflusst, welche die Entstehung von adipogenen Vorläufern aus MSC bzw. die Differenzierung dieser Vorläufer fördern.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass der Einfluss hormonell wirksamer Xenobiotika wie BPA, DEHP oder TBT während der adipogenen Differenzierung embryonaler Stammzellen stadienspezifisch ist. Die stadienabhängig unterschiedliche Reaktion der untersuchten Zellen ist ein guter Indikator für ein valides Analysesystem, welches in der Lage ist, ontogenetisch unterschiedliche Prozesse wie den der adipogenen Rekrutierung von MSC und den der anschließenden Differenzierung getrennt voneinander abzubilden.

Die adipogenen (DEHP, TBT) bzw. antiadipogenen (BPA) Effekte der EDC wurden nicht in CGR8-Stammzellen beobachtet, welche im Stadium der Pluripotenz behandelt wurden. Schließt man Zellkulturbedingte Ursachen aus, dann lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass embryonale Stammzellen mesenchymale Charakteristika aufweisen müssen, um hinsichtlich der adipogenen Differenzierung empfänglich für den Einfluss von BPA, DEHP oder TBT zu sein.

5.4.1 BPA vermindert die adipogene Determinierung von MSC

In murinen Präadipozyten der Linie 3T3 führt die Exposition mit BPA (20 μM) in Kombination mit Insulin zu einer gesteigerten Fettzellbildung [137]. Dabei wird die terminale Reifung von Adipozyten über die Induktion des Insulin-Zielgens Phosphoinositid-3-Kinase begünstigt [105]. Zusätzlich steigert BPA die insulinstimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-F442A-Adipozyten, wobei dieser BPA-Effekt unabhängig von der Aktivierung des Östrogenrezeptors ist [138]. Phrakonkham *et al.* haben gezeigt, dass BPA (80 μM) und Östradiol (0,1 μM) während der adipogenen Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten zu einer verstärkten Expression der adipogenen Markergene *Cebpb*, *Pparg2*, Fettsäuresynthase und Leptin führen [139]. Die Autoren haben jedoch keinen Einfluss der beiden Substanzen auf eine erhöhte TG-

Akkumulation oder Fettzellbildung festgestellt. Der fehlende Effekt auf die TG-Akkumulation wurde dabei mit einer zu kurzen Differenzierungsdauer erklärt.

Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass Östradiol die Aktivierbarkeit von PPAR γ , und damit einhergehend die Differenzierung von Fettzellen, vermindert [140]. Dieser Effekt wird durch die klassischen Östrogenrezeptoren (ER) α und β vermittelt [140]. In adulten humanen Primärstammzellen führt BPA (80 μ M) zu einer verminderten Gentranskription der Lpl, was im Verlauf der adipogenen Differenzierung zu verringerten TG-Konzentrationen und verminderter adipogener Reifung führt [141]. Östradiol und Phytoöstrogene wie Genistein hemmen außerdem die Rekrutierung von Präadipozyten aus MSC [142]. Vermittelt durch ER α und ER β aktivieren Phytoöstrogene die Wnt/ β -catenin-Signalkaskade, was dazu führt, dass weniger MSC die adipogene Differenzierung einschlagen [142]. Neben der Hemmung der adipogenen Differenzierung führt die Aktivierung der canonischen Wnt-Signalkaskade außerdem zu einer vermehrten Rekrutierung osteogener Vorläuferzellen [143]. Damit übereinstimmend zeigten die vorliegenden Untersuchungen an C3H10T1/2-MS, dass eine Exposition mit BPA (10 μ M) während der Proliferationsphase von MSC die nachfolgende adipogene Differenzierung vermindert.

Aufgrund der Affinität von BPA, in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 1 μ M an ER α und ER β zu binden, gilt BPA als Umweltöstrogen [144]. Diese östrogene Wirkung ist vermutlich auch für den antiadipogenen Effekt von BPA während der Determinierungsphase von MSC verantwortlich.

Während der adipogenen Differenzierung von 3T3-Präadipozyten aktiviert BPA hingegen konzentrationsabhängig die Insulinsignalkaskade [138] und steigert die Bildung von Fettzellen [105,137]. Bei der adipogenen Differenzierung von C3H10T1/2-MS wurde jedoch kein stimulierender Einfluss von BPA auf die hormonelle Induktion und die terminale Differenzierung beobachtet. Ein Grund dafür kann in der verwendeten, vergleichsweise geringen BPA-Konzentration von 10 μ M liegen. Untersuchungen, welche in einem vergleichbaren Differenzierungsmodell adipogene Effekte auf die terminale Reifung von 3T3-Präadipozyten beobachtet hatten, arbeiteten mit einer deutlich höheren Konzentration von 80 μ M [105,139]. Zudem steht BPA in Verdacht, seine adipogene Wirkung *in vivo* in einer nicht-monotonen Dosis-Wirkungs-Beziehung zu entfalten [16,34,57].

Aus der vorliegenden Arbeit und den Angaben aus anderen wissenschaftlichen Arbeiten wird deutlich, dass die Wirkung von BPA auf die Entstehung von Fettzellen in starker Abhängigkeit zum Zeitpunkt der Exposition steht. Während BPA und Östradiol die adipogene Determinierung von MSC verringern, kann ein umgekehrter östrogenunabhängiger Effekt von BPA während der späteren adipogenen Differenzierung von 3T3-Prädipozyten beobachtet werden [138]. Zudem hat eine perinatale BPA-Exposition bei Ratten einen Anstieg des Körpergewichts zur Folge [34,145]. Ähnliche Effekte wurden auch bei einer perinatalen Behandlungen mit Östrogenen oder DES beobachtet [34,145,146].

Die diesen *in vivo* Effekten zugrundeliegenden Mechanismen erstrecken sich wahrscheinlich auf epigenetische Veränderungen [132,133] und/oder Wechselwirkungen mit anderen Hormonrezeptoren während der embryonalen und postnatalen Entwicklung [39]. Diese Datenlage macht es schwierig, dem Umweltöstrogen eine eindeutige Rolle während der Adipogenese zuzuschreiben.

5.4.2 DEHP fördert die hormonell induzierte adipogene Differenzierung von MSC

Die Regulation des Energie- und Fettstoffwechsels wird durch Kernrezeptoren wie PPAR α und PPAR γ sowie deren Zusammenspiel mit Liganden und Cofaktoren bestimmt. Während PPAR α die Fettsäureoxidation reguliert, steuert PPAR γ unter anderem die Differenzierung von Fettzellen und die damit einhergehende Speicherung von Lipiden [147]. Beide Transkriptionsfaktoren können durch EDC wie DEHP und MEHP aktiviert werden [70,148].

Der DEHP-Metabolit MEHP induziert PPAR γ 1 und PPAR γ 2 und bindet dabei, ähnlich wie der pharmakologische PPAR γ -Aktivator Rosiglitazon, in der Ligandenbindungsdomäne von PPAR γ [121]. Während der adipogenen Differenzierung führt die MEHP-Exposition von 3T3-Prädipozyten außerdem zu einer verstärkten Rekrutierung von PPAR γ -Cofaktoren und einer erhöhten adipogenen Differenzierung [121]. Die Wirkung von MEHP (100 μ M) auf die PPAR γ -Signalkaskade ist dabei jedoch schwächer ausgeprägt als die des klassischen PPAR γ -Aktivators Rosiglitazon (1 μ M).

Demgegenüber stehen Untersuchungen, wonach DEHP während der Gravidität und Laktation von Ratten zu verminderten Geburtsgewichten und einer verminderten Gewichtszunahme der Nachkommen führt [149,150]. Die DEHP-Exposition resultierte

darüber hinaus in einer gestörten pankreatischen β -Zellfunktion, was vermuten lässt, dass DEHP außerdem einen Einfluss auf die Entstehung von Diabetes mellitus haben könnte [149]. Da DEHP und MEHP neben PPAR γ auch PPAR α aktivieren, was speziesspezifisch in Nagetieren eine verstärkte Proliferation von Leberzellen zur Folge hat [151,152], wirken beide Substanzen in Ratten und Mäusen lebertoxisch und kanzerogen [71].

Auch Mäuse des Stammes C57BL/6J zeigen als Folge einer 13-wöchigen DEHP-Exposition im Standardfutter (1.000 mg/kg Körpergewicht/Tag) eine erhöhte Peroxisomen- und Leberzellproliferation sowie eine verminderte Fettgewebsbildung und eine geringere Gewichtszunahme [153]. Um die Wirkung von DEHP auf den Metabolismus unabhängig von der Wirkung auf die Leberzellproliferation zu untersuchen, haben Feige *et. al.* mit transgenen SV129 Mäusen gearbeitet, welche die humane Ppara-Variante exprimieren [152]. Diese Tiere reagierten innerhalb einer 13-wöchigen fettreichen Diät mit DEHP (500 mg/kg Körpergewicht/Tag) statt mit einer DEHP-PPAR α -induzierten Hepatomegalie und Gewichtsabnahme mit einer gesteigerten Gewichtszunahme [153]. Außerdem führte DEHP in den transgenen Tieren zu einer Zunahme der Fettgewebsbildung [153]. Der DEHP-induzierte Verlust von Körpergewicht bei Nagetieren ist somit auf die speziesspezifisch erhöhte PPAR α -vermittelte Leberzellproliferation zurückführbar [152,153].

Schmidt *et al.* haben die adipogene Wirkung von DEHP im Fütterungsversuch mit C3H/N Mäusen untersucht [74]. In diesem Stamm führte DEHP in verschiedenen Konzentrationsbereichen (0,05; 5; 500 mg/kg Körpergewicht/Tag) zu einer vermehrten Futteraufnahme, Gewichtszunahme und Zunahme der viszeralen Fettmenge. Eine hepatisch erhöhte PPAR α -Expression wurde jedoch nur in der höchsten Konzentration (500 mg/Kg Körpergewicht/Tag) festgestellt. In einem weiteren Versuchsansatz wurden Muttertiere während der Gravidität und Laktation mit den oben genannten DEHP-Konzentrationen exponiert [74]. Während die Gravidität in der niedrigen und mittleren Behandlungsgruppe unauffällig verlief, wurde in der höchsten Konzentration eine Abortrate von 100% beobachtet. Die Nachkommen der 0,05 und 5 mg/kg Körpergewicht/Tag exponierten Tiere wiesen eine signifikant erhöhte Gewichtszunahme und einen Anstieg der viszeralen Fettmenge auf. Hervorzuheben ist, dass der adipogene Effekt von DEHP bereits bei einer am TDI-orientierten Tagesdosis von 50 μ g/kg Körpergewicht/Tag beobachtet wurde.

Dass DEHP und MEHP in der Lage sind, Rezeptoren der PPAR-Familie zu aktivieren und *in vitro* die Differenzierung von Präadipozyten [70] sowie *in vivo* die Entstehung von Fettgewebe zu beeinflussen, ist evident [74,153]. Offen bleibt die Frage, ob diese Weichmacher bereits in undifferenzierten embryonalen MSC eine adipogene Wirkung verursachen und welche Prozesse der Adipogenese dabei beeinflusst werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DEHP (100 µM) die adipogene Differenzierung von MSC stadienspezifisch ausschließlich innerhalb der hormonellen Induktion fördert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass MSC DEHP metabolisieren und in den aktiven Metaboliten MEHP umsetzen, welcher sich während der adipogenen Differenzierung in Adipozyten anreichert.

Warum sich der DEHP-Effekt in C3H10T1/2-MSK auf die Phase der hormonellen Induktion beschränkt, lässt sich mit der Verfügbarkeit und Aktivierbarkeit von PPAR γ 1 und PPAR γ 2 während der adipogenen Differenzierung erklären. Während PPAR γ 1 auf mRNA-Transkriptionsebene bereits während der Proliferation exprimiert wird, ist die Proteinmenge im Vergleich zu den Phasen hormonelle Induktion und terminale Differenzierung sehr gering. PPAR γ 2 war während der Proliferationsphase kaum exprimiert und als Protein nicht nachweisbar. In PPAR γ 2-überexprimierenden C3H10T1/2 führte die Behandlung mit DEHP und Rosiglitazon zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors, wobei der Effekt von DEHP (100 µM) deutlich geringer war als der von Rosiglitazon (500 nM). Dieses Experiment zeigt, dass DEHP PPAR γ aktiviert. In nicht-PPAR γ -überexprimierenden MSC war eine EDC-vermittelte Induzierbarkeit von PPAR γ hingegen nicht nachweisbar. Die fehlende Verfügbarkeit von PPAR γ ist die wahrscheinlichste Ursache, warum DEHP die Adipogenese nicht im Stadium der MSC-Determinierung beeinflusst.

Während der hormonellen Induktion kam es in C3H10T1/2-MSK zu einem deutlichen Anstieg der mRNA- und Proteinmenge von PPAR γ 1 und PPAR γ 2. Für die adipogene Differenzierung ist die Induktion von PPAR γ 2 unbedingt notwendig [101]. Die adipogenen DEHP-Effekte sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass PPAR γ 2 von DEHP aktiviert wird.

Während der terminalen Differenzierung, in welcher die Bildung von PPAR γ aufrechterhalten bleibt, zeigte die DEHP-Behandlung keinen adipogenen Effekt. Die Untersuchungen zeigen auch, dass die Genexpression von Pparg während dieser Phase durch DEHP nicht weiter

gesteigert wurde. Warum DEHP im Anschluss an die hormonelle Induktion keine adipogene Wirkung hat, bedarf weiterer Untersuchungen. Eine mögliche Hypothese ist, dass die Aktivierbarkeit von PPAR γ während dieser Phase bereits gesättigt ist.

5.4.3 TBT fördert die Entstehung von Fettzellen

TBT entfaltet seine adipogene Wirkung *in vitro* und *in vivo* als Ligand von RXRa und PPAR γ [31,88,154]. Bei Mäusen, die einmalig *in utero* am Trächtigkeitstag 16,5 mit TBT (0,1 mg/kg Körpergewicht/Tag) exponiert wurden, fördert TBT schon vor der Geburt die Entstehung eines adipösen Phänotyps [30]. Die *in utero* exponierten Mäuse wiesen sowohl postnatal als auch noch nach 10 Wochen einen erhöhten Fettgewebsanteil auf [31]. MSC, welche aus dem Fettgewebe dieser *in utero* exponierten Tiere isoliert wurden, ließen sich außerdem besser zu Adipozyten differenzieren als MSC nicht-exponierter Kontrolltiere [30]. Die Autoren schließen daraus, dass es in Folge der *in utero* TBT-Exposition zu einer adipogenen Programmierung bzw. einer vermehrten Entstehung von Präadipozyten kam. Gleichzeitig zur gesteigerten Adipogenese war die osteogene Differenzierungskapazität der MSC vermindert [30]. Diese reziproke Beziehung zwischen adipogener und osteogener Differenzierung kann auf eine Verschiebung von MSC-Determinierungsfaktoren während der Differenzierung von Vorläuferzellen zurückgeführt werden [155]. Da die *in utero* Behandlung mit dem PPAR γ -Aktivator Rosiglitazon (1 mg/kg Körpergewicht/Tag) ähnliche Effekte hat, schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass die adipogene Wirkung von TBT auf eine Wechselwirkung mit dem RXRa-PPAR γ -Heterodimer zurückführbar ist [30].

5.4.3.1 TBT steigert die adipogene Differenzierung über einen PPAR γ -abhängigen

Mechanismus

In C3H10T1/2-MSC wirkte TBT (100 nM) stark adipogen. Diese Wirkung wurde stadienunabhängig während der Proliferation (5.4.3.2 und 5.4.3.3), der hormonellen Induktion sowie während der terminalen Differenzierung beobachtet.

Ein Mechanismus für die adipogene Wirkung von TBT ist die Verfügbarkeit und Aktivierbarkeit von PPAR γ 1 und PPAR γ 2. Während der hormonellen Induktion kam es durch den Differenzierungscocktail zu einem starken Anstieg der Expression dieser beiden

Transkriptionsfaktoren, welcher während der terminalen Differenzierung von den Zellen aufrechterhalten blieb. Darüber hinaus wurde in vorliegender Arbeit nachgewiesen, dass die für die Adipogenese essentielle Isoform PPARg2 von den EDC DEHP und TBT sowie dem Pharmakon Rosiglitazon aktiviert wird.

Eine Aktivierung des Heterodimerisierungspartners RXRa verstärkt die Wirkung des PPARg-RXRa-Heterodimers [156]. Die Induzierbarkeit von RXRa durch TBT hat somit eine verstärkende Wirkung auf die Funktion von PPARg [88,157]. Im Gegensatz zu PPARg2, dessen Expression spezifisch für Fettgewebe ist, ist RXRa ubiquitär verbreitet. RXRa heterodimerisiert mit verschiedenen Interaktionspartnern und ist so an der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse wie dem Cholesterin-, Fettsäure-, Gallensäure-, Steroid- und Fremdstoffmetabolismus beteiligt [158]. Die adipogene Wirkung von RXRa-Agonisten ist jedoch von dem Vorhandensein und der Aktivierung von PPARg1 und PPARg2 abhängig [159].

Da TBT ein Ligand beider PPARg-Isoformen, die während der hormonellen Induktion und terminalen Differenzierung verstärkt exprimiert werden, und von RXRa ist [31,88], kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die PPARg-Verfügbarkeit ursächlich für den TBT-induzierten adipogenen Effekt während der terminalen adipogenen Differenzierung war.

5.4.3.2 TBT fördert die adipogene Determinierung von MSC

TBT ist ein potentes Obesogen und verursacht bei Mäusen bereits pränatal die Entstehung eines adipösen Phänotyps [30]. Auch in C3H10T1/2-MSC führt die Exposition während der Proliferationsphase zu einer erhöhten Bildung von Adipozyten.

Im Gegensatz zur nachgeschalteten hormonellen Induktion waren PPARg1 und PPARg2 während der Proliferationsphase jedoch kaum exprimiert und nicht aktivierbar. Auch hatte die Behandlung mit dem potenten PPARg-Aktivator Rosiglitazon während dieser Phase keine erhöhte adipogene Differenzierung zur Folge. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die adipogene Wirkung von TBT während der Proliferationsphase durch einen PPARg-unabhängigen Mechanismus vermittelt wurde.

Im Gegensatz zu Rosiglitazon führte TBT während der Proliferationsphase zu einer verminderten mRNA-Expression zelllinienspezifischer Gene wie Dlk1, Sox9, Sox5, Sox6, Col2a1 und Runx2. Die Balance von DLK1 und SOX9 ist in multipotenten MSC entscheidend, um die Differenzierung in eine bestimmte Linie festzulegen [99]. Der Transkriptionsfaktor SOX9 wird von chondro-osteogenen Vorläufern gebildet und reguliert zusammen mit SOX5 und SOX6 die chondrogene Differenzierung und die Expression des chondrogenen Zielgens Col2a1 [160]. Dabei wird SOX9 von DLK1 reguliert [97]. SOX9 hemmt sowohl die Reifung von Chondrozyten als auch die Differenzierung von adipogenen und osteogenen Vorläuferzellen [97]. DLK1 kommt im adulten Organismus hauptsächlich in Zellen vor, welche das Potential haben, in Adipozyten zu differenzieren [96], und ist in reifen Adipozyten nicht mehr nachweisbar [99]. Seine Funktion ist vor allem darauf beschränkt, adipogene Vorläufer aufrechtzuerhalten [99]. Eine Deletion führt *in vivo* zu einem adipösen Phänotyp [161]. Umgekehrt führt eine Überexpression zu einer verminderten Fettgewebsbildung [162].

DLK1 hält die Genexpression von Sox9 aufrecht und SOX9 hemmt die Promotoraktivität von Cebpb und Cebpd [99]. DLK1 reguliert somit Gene, welche die adipogene Differenzierung initiieren. Diese Repression findet auf transkriptioneller Ebene statt und bildet die Grundlage für die nachgeschaltete Expression der adipogenen Transkriptionsfaktoren C/EBPb, C/EBPd, C/EBPa und PPARg [163].

In TBT-behandelten MSC kam es während der Proliferationsphase von C3H10T1/2-MSK zu einem deutlichen transkriptionellen Abfall von Dlk1 und Sox9. Die TBT-induzierte Abnahme der inhibitorischen Wirkung von DLK1 und SOX9 kann als mögliche Ursache für den adipogenen Effekt von TBT während der Proliferationsphase angesehen werden.

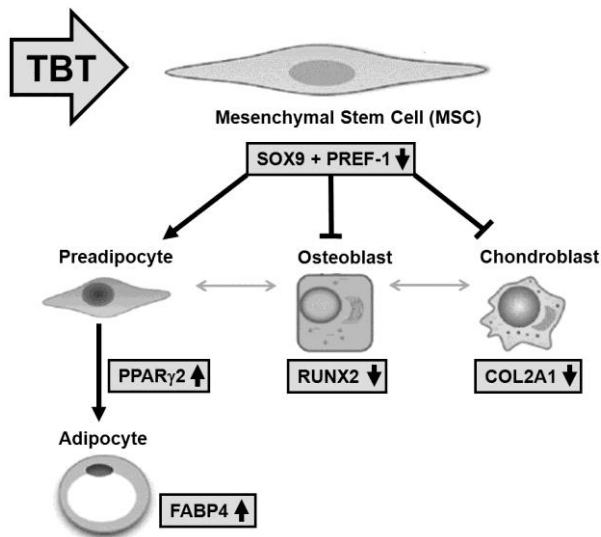


Abbildung 32: **Synopsis der Wirkung von Tributylzinn (TBT) auf die adipogene Determinierung und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSC).** Die Behandlung multipotenter MSC mit TBT führt durch die transkriptionelle Repression von *preadipocyte factor 1* (PREF-1 alias *Delta-like 1 homolog, DLK1*) und *Sry-related HMG box gene 9* (SOX9) zur adipogenen Determinierung von MSC. Vermittelt durch *peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2* (PPAR γ 2) kommt es zur gesteigerten Entstehung von Fettzellen und Expression adipozytenspezifischer Gene wie *fatty acid binding protein 4* (FABP4). Im Gegensatz dazu vermindert TBT in MSC die Expression des osteogenen Markers *run-related transcription factor 2* (RUNX2) und des chondrogenen Markers *collagen type II, alpha 1* (COL2A1).

5.4.3.3 Der adipogene Einfluss von TBT während der Determinierungsphase von MSC ist PPARg-unabhängig

Die Wirkung von TBT auf Dlk1 und Sox9 führt dazu, dass Vorläufer die adipogene Differenzierung einschlagen und dass PPARg, vermittelt durch C/EBPb und C/EBPd, aktiviert werden kann. Die inhibitorische Wirkung von DLK1 und SOX9 ist der adipogenen Wirkung von PPARg vorangestellt [97]. Ein siRNA-vermittelter Knockdown von PPARg sowie die Rosiglitazon-induzierte Aktivierung von PPARg hatten daher keinen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von Dlk1 und Sox9. Der Einfluss von TBT auf Dlk1 und Sox9 ist somit unabhängig von PPARg.

Die TBT-Behandlung von C3H10T1/2-MSC während eines transienten Knockdowns von PPARg führte während der sich anschließenden PPARg-abhängigen adipogenen Differenzierung zu einer gesteigerten Fettzellbildung. Die Wirkung von TBT auf die adipogene Determinierung von MSC wurde dabei vermutlich unabhängig vom PPARg-RXRa-

Heterodimer durch die Herabregulation von Dlk1 und Sox9 vermittelt. Diese Hypothese bietet auch eine Erklärung für die von Kirchner *et al.* beobachtete TBT-induzierte pränatale Festlegung von MSC *in vivo* [30].

Auch in primären murinen MSC des Knochenmarks zeigte sich, dass TBT die Entstehung von Fettzellen über einen zusätzlichen PPAR γ -unabhängigen Signalweg beeinflusst [157]. Auch in diesen Zellen wird die adipogene Wirkung von Rosiglitazon, im Gegensatz zu der von TBT, durch einen PPAR γ -knockdown signifikant vermindert [157].

Offen bleibt die Frage, über welchen Mechanismus TBT zu einer Reduktion der Genexpression von Dlk1 und Sox9 führt. Diese Wirkung könnte über RXRa vermittelt werden [157] oder durch den Glucocorticoidrezeptor, da Dexamethason als Glucocorticoidrezeptoragonist, ähnlich wie TBT, während der hormonellen Induktion zu einer Reduktion von DLK1 führt [99].

Chamorro-García *et al.* haben darüber hinaus in einer Untersuchung an Mäusen gezeigt, dass die TBT-Exposition während der Gravidität nicht nur in der *in utero* exponierten F1-Generation (5,42 nM; 54,2 nM oder 542 nM; über das Trinkwasser der Mutter), sondern auch in den folgenden Generationen F2 und F3 die Bildung weißen Fettgewebes erhöht [129]. Diese transgenerationalen Effekte werden vermutlich durch epigenetische Veränderungen vermittelt [164]. So führt TBT in MSC zu einer Demethylierung, also einer Aktivierung der Promotorregion des adipogenen Gens Fabp4 [30]. Ob die beschriebenen transgenerationalen Effekte auf pränatale epigenetische Veränderungen im MSC-Kompartiment zurückzuführen sind, beispielsweise durch Veränderungen der Genaktivität von Dlk1 oder Sox9, soll in einer weiteren Studie untersucht werden.

6. Zusammenfassung

In den letzten 30 Jahren kam es weltweit zu einem drastischen Anstieg der Adipositasprävalenz. Herkömmliche Erklärungsmodelle wie genetische Veränderungen, Ernährungs- und „Lifestyle“-Faktoren reichen nicht aus, um den Anstieg von Adipositas, insbesondere bei Kindern und Jugendlichen, zu erklären. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit und weiteren wissenschaftlichen Studien ist es wahrscheinlich, dass Umweltbedingungen bereits vor der Geburt bzw. während der frühen Kindheit die Entstehung von Adipositas fördern.

Schon seit einigen Jahren vermuten Wissenschaftler einen Zusammenhang zwischen der Zunahme von Adipositas und Übergewicht und der steigenden Produktion, dem Konsum und der Umweltverschmutzung durch Kunststoffe. Polymere Kunststoffe enthalten unter anderem hormonell wirksame Substanzen (EDC), welche beispielsweise aus Verpackungsmaterialien in Lebensmittel migrieren und hauptsächlich über die Nahrung aufgenommen werden. 2006 veröffentlichten Grun und Blumberg die „Obesogen“-Hypothese, welche besagt, dass bestimmte EDC an der weltweit steigenden Adipositasprävalenz teilhaben könnten. Solche EDC sind die in dieser Arbeit untersuchten Umweltchemikalien Bisphenol A (BPA), Diethylhexylphthalat (DEHP) und Tributylzinn (TBT). Alle drei EDC sind bei einem Großteil der Bevölkerung in Blut- und Gewebeproben nachweisbar. Sie sind außerdem in der Lage, die Plazentaschranke zu passieren. Aufgrund ihrer hormonellen Aktivität stehen sie im Verdacht, Entwicklungsprozesse zu stören und die Veranlagung für Adipositas bereits pränatal zu fördern.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass BPA, DEHP und TBT die Entstehung von Adipozyten aus murinen embryonalen Stammzellen stadien- und konzentrationsabhängig beeinflussen. Die Exposition multipotenter mesenchymaler Stammzellen (MSC) der Linie C3H10T1/2 während der adipogenen Differenzierung mit BPA (10 μ M) führte zu einer verminderten Entstehung von Adipozyten. DEHP (100 μ M) und TBT (100 nM) hatten einen stimulierenden Effekt auf die Differenzierung von Fettzellen. Im Gegensatz zu diesen LOAEL-orientierten Konzentrationen wurde bei Expositionsversuchen mit den umweltrelevanten Konzentrationen 10 nM BPA, 100 nM DEHP oder 1 nM TBT kein Einfluss auf die Entstehung von Fettzellen beobachtet. Auch die Exposition pluripotenter embryonaler

Mausstammzellen der Linie CGR8 hatte während der Proliferationsphase keine Auswirkung auf die nachgeschaltete adipogene Differenzierung. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Zellen mesenchymale Eigenschaften aufweisen müssen, um für die untersuchten EDC vulnerabel zu sein.

Während der Differenzierung durchlaufen multipotente MSC verschiedene ontogenetisch abgrenzbare Stadien. Die antiadipogene Wirkung von BPA beschränkt sich dabei ausschließlich auf das frühe Stadium der Determinierung (Proliferationsphase). Nur C3H10T1/2-MS, die während dieser Phase mit 10 μM BPA behandelt wurden, wiesen ein vermindertes Potential auf, adipogen zu differenzieren.

C3H10T1/2-MS sind außerdem in der Lage, DEHP in den aktiven Metaboliten MEHP umzuwandeln und diesen im Verlauf der Differenzierung anzureichern. Eine Exposition mit DEHP (100 μM) wirkte ausschließlich während der Induktionsphase steigernd auf das adipogene Differenzierungspotential von MS.

TBT (100 nM) förderte im Gegensatz zu BPA und DEHP die adipogene Differenzierung in allen untersuchten Differenzierungsphasen.

DEHP und TBT aktivierten PPAR γ 2, den Master-Regulator der adipogenen Differenzierung. Während der vorangeschalteten Determinierungsphase führte TBT darüber hinaus zu einer PPAR γ -unabhängigen transkriptionellen Repression von Dlk1 und Sox9, zwei Gene, deren Produkte in Vorläuferzellen die adipogene Differenzierung unterdrücken. TBT fördert die Bildung von Adipozyten somit über einen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus während der Determinierungsphase von multipotenten MS und über einen zweiten PPAR γ -abhängigen Mechanismus während der nachgeschalteten adipogenen Differenzierung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen im *in vitro* Differenzierungsmodell von MS, dass Umwelthormone die Entstehung von Fettzellen PPAR γ -unabhängig, bereits während der frühen Determinierungsphase, und PPAR γ -abhängig während der späteren adipogenen Differenzierung, beeinflussen können. Die ubiquitäre Exposition mit Umwelthormonen kann die Entstehung von Adipositas und Übergewicht somit bereits während früher Phasen der Entwicklung fördern.

6.1 Summary

Rising obesity rates (“obesity pandemics”) and related disorders belong to the most serious health challenges worldwide. The etiology of obesity is complex and multifactorial. It has been shown that pre- and postnatal genotype-environment interactions contribute to the high prevalence of obesity. However, the underlying mechanisms remain poorly understood.

The increased prevalence of obesity correlates with an increase in chemical production and the ubiquitous pollution of the environment by these chemicals over the past 40 years. Some of these chemicals are endocrine disrupting compounds (EDC). EDC like bisphenol A (BPA), bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and tributyltin (TBT) are ubiquitously present in the environment and in human tissues. They are known to cross the placenta and to affect endocrine mediated pathways by binding to hormone receptors, an effect which is specifically critical during development. In that context, the environmental obesogen hypothesis states that an early-life exposure to environmental pollutants might have an influence on the development and susceptibility to metabolic diseases such as obesity.

This work shows that BPA, DEHP and TBT affect the adipogenic differentiation of murine embryonic stem cells in a concentration-, stage- and compound-specific manner. Multipotent murine mesenchymal stem cells (MSC), C3H10T1/2, allow a detailed insight into the vulnerability of different ontogenetic stages of adipogenesis, as they have the ability to determine to the adipose lineage as well as to cartilage, bone or muscle lineages.

Exposure of C3H10T1/2 MSC during adipogenesis with BPA (10 μ M) decreased the number of adipocytes, whereas DEHP (100 μ M) and TBT (100 nM) enhanced adipogenesis. In contrast to these LOAEL orientated concentrations, the use of environmentally relevant concentrations (10 nM BPA, 100 nM DEHP or 1 nM TBT) did not affect adipogenesis.

Employing a pluripotent murine embryonic stem cell line, CGR8, the adipogenic potential of BPA, DEHP and TBT prior to cell fate commitment was explored. The studied EDC did not alter subsequent adipogenic differentiation, when pluripotent CGR8 were exposed during the proliferation stage. We conclude that cells must have mesenchymal characteristics to be susceptible to the studied compounds.

The development of adipocytes occurs in a series of ontogenetic steps. To distinguish early adipogenic cell fate commitment and final adipogenic differentiation, C3H10T1/2 MSC were exposed to BPA, DEHP or TBT at different stages of adipogenic differentiation, i.e. at undifferentiated growth, hormonal adipogenic induction and adipogenic differentiation. BPA (10 μ M) decreased subsequent adipogenic differentiation of MSC, when cells were exposed during undifferentiated growth. This finding indicates BPA as an EDC, which reduces the commitment of MSC to the adipogenic lineage.

MSC have the ability to metabolize DEHP to MEHP, its monoester hydrolysis product. The amount of MEHP, which activates and interacts with PPAR α and PPAR γ , enriched during adipogenic differentiation and DEHP exposure enhanced adipogenesis during the hormonal induction period. At this stage, the activation of PPAR γ caused adipogenic differentiation.

In contrast, TBT (100 nM) enhanced the development of adipocytes in all studied exposure windows. Depending on the exposure window, TBT promoted subsequent adipogenesis independently and dependently on PPAR γ . In undifferentiated MSC, TBT exposure induced a transcriptional PPAR γ -independent repression of Dlk1 and Sox9, which are both suppressors of adipogenic cell fate commitment. PPAR γ 2, which is required for adipogenic differentiation, was highly expressed during hormonal adipogenic induction, but very low during undifferentiated growth. During hormonal induction, TBT additionally enhanced adipogenic differentiation by PPAR γ signaling.

In conclusion, this study shows that EDC affect adipogenesis by altering cell fate commitment of MSC and by enhancing final adipogenic differentiation by different and independent mechanisms. Our results on the impact of EDC on early cell fate development in undifferentiated progenitors may document a novel mechanistic insight into predisposition for obesity.

7. Literaturverzeichnis

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, et al. (2011) National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 377: 557-567.
2. MRI (2008) Ergebnisbericht, Teil 1, Nationale Verzehrsstudie II. Available: http://www.mri.bund.de/fileadmin/Institute/EV/NVS_II_Abschlussbericht_Teil_1_mit_Ergaenzungsbericht.pdf [accessed 04 January 2013]. Max Rubner-Institut, Federal Research Institute of Nutrition and Food, Germany.
3. Wang Y, Lobstein T (2006) Worldwide trends in childhood overweight and obesity. *Int J Pediatr Obes* 1: 11-25.
4. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, Lamb MM, Flegal KM (2010) Prevalence of high body mass index in US children and adolescents, 2007-2008. *JAMA* 303: 242-249.
5. Wang Y, Lim H (2012) The global childhood obesity epidemic and the association between socio-economic status and childhood obesity. *Int Rev Psychiatry* 24: 176-188.
6. Truong KD, Sturm R (2005) Weight gain trends across sociodemographic groups in the United States. *Am J Public Health* 95: 1602-1606.
7. Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM (2007) The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 132: 2087-2102.
8. Pasarica M, Dhurandhar NV (2007) Infectoobesity: obesity of infectious origin. *Adv Food Nutr Res* 52: 61-102.
9. Casals-Casas C, Desvergne B (2011) Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* 73: 135-162.
10. Baillie-Hamilton PF (2002) Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med* 8: 185-192.
11. Bray GA, Bellanger T (2006) Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine* 29: 109-117.
12. Demark-Wahnefried W, Platz EA, Ligibel JA, Blair CK, Courneya KS, et al. (2012) The Role of Obesity in Cancer Survival and Recurrence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 1244-1259.
13. Oguma Y, Sesso HD, Paffenbarger RS, Jr., Lee IM (2005) Weight change and risk of developing type 2 diabetes. *Obes Res* 13: 945-951.

14. Thompson RC, Moore CJ, vom Saal FS, Swan SH (2009) Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 2153-2166.
15. Hohenberger W (2002) Additives - Trends and perspectives. *KU Kunststoffe* 92: 86-91.
16. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Jr., et al. (2012) Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33: 378-455.
17. Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, et al. (2012) Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153: 4097-4110.
18. Bernal AJ, Jirtle RL (2010) Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88: 938-944.
19. WHO (2013) Effects of human exposure to hormone-disrupting chemicals examined in landmark UN report. Available: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/hormone_disrupting_20130219/en/index.html [accessed 23 February 2013]. World Health Organisation.
20. EHN (2013) UN, WHO panel calls hormone-disrupting chemicals a 'global threat'. Available: <http://www.environmentalhealthnews.org/ehs/news/2013/who-report> [accessed 26 February 2013]. Environmental Health News.
21. Sheehan DM (2006) No-threshold dose-response curves for nongenotoxic chemicals: findings and applications for risk assessment. *Environ Res* 100: 93-99.
22. Kortenkamp A (2007) Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1: 98-105.
23. Hansjürgens B, Nordbeck R (2000) Chemikalienregulierung und Innovationen zum nachhaltigen Wirtschaften.: Physica-Verlag. DOI: 10.1007/3-7908-1657-4.
24. Barker DJ, Fall CH (1993) Fetal and infant origins of cardiovascular disease. *Arch Dis Child* 68: 797-799.
25. McMillen IC, Robinson JS (2005) Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85: 571-633.
26. Koebnick C, Smith N, Coleman KJ, Getahun D, Reynolds K, et al. (2010) Prevalence of extreme obesity in a multiethnic cohort of children and adolescents. *J Pediatr* 157: 26-31 e22.

27. Taveras EM, Rifas-Shiman SL, Belfort MB, Kleinman KP, Oken E, et al. (2009) Weight status in the first 6 months of life and obesity at 3 years of age. *Pediatrics* 123: 1177-1183.
28. Janesick A, Blumberg B (2012) Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res C Embryo Today* 93: 34-50.
29. Grun F, Blumberg B (2006) Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147: 50-55.
30. Kirchner S, Kieu T, Chow C, Casey S, Blumberg B (2010) Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Mol Endocrinol* 24: 526-539.
31. Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, et al. (2006) Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol* 20: 2141-2155.
32. Boekelheide K, Blumberg B, Chapin RE, Cote I, Graziano JH, et al. (2012) Predicting Later-Life Outcomes of Early-Life Exposures. *Environ Health Perspect* 120: 1353-1361.
33. Klimentidis YC, Beasley TM, Lin HY, Murati G, Glass GE, et al. (2010) Canaries in the coal mine: a cross-species analysis of the plurality of obesity epidemics. *Proc Biol Sci* 278: 1626-1632.
34. Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM (2001) Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 109: 675-680.
35. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN (2009) Environmental estrogens and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 304: 84-89.
36. Stahlhut RW, van Wijngaarden E, Dye TD, Cook S, Swan SH (2007) Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect* 115: 876-882.
37. Hines EP, White SS, Stanko JP, Gibbs-Flournoy EA, Lau C, et al. (2009) Phenotypic dichotomy following developmental exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) in female CD-1 mice: Low doses induce elevated serum leptin and insulin, and overweight in mid-life. *Mol Cell Endocrinol* 304: 97-105.
38. Hoppe AA, Carey GB (2007) Polybrominated diphenyl ethers as endocrine disruptors of adipocyte metabolism. *Obesity (Silver Spring)* 15: 2942-2950.
39. Rubin BS, Soto AM (2009) Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol* 304: 55-62.

40. Rubin MM (2007) Antenatal exposure to DES: lessons learned...future concerns. *Obstet Gynecol Surv* 62: 548-555.
41. Wilson NK, Chuang JC, Morgan MK, Lordo RA, Sheldon LS (2007) An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res* 103: 9-20.
42. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL (2008) Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 116: 39-44.
43. Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, et al. (2006) Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* 147: 3681-3691.
44. Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C, Soto AM (2001) In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 65: 1215-1223.
45. Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM (2007) Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* 23: 383-390.
46. EFSA (2012) Bisphenol A: EFSA beginnt vollständige Neubewertung und legt dabei Schwerpunkt auf Exposition und mögliche Wirkungen niedriger Dosen. Available: http://www.efsa.europa.eu/de/press/news/120424.htm?utm_source=homepage&utm_medium=infocus&utm_campaign=bisphenola [accessed 06 February 2013]. European Food Safety Authority.
47. EFSA (2014) Bisphenol A: EFSA consults on assessment of risks to human health. Available: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/140117.htm> [accessed 27 March 2014]. European Food Safety Authority.
48. ScienceNews (2009) When BPA-free isn't. Available: http://www.sciencenews.org/view/generic/id/46019/description/When_BPA-free_isnt [accessed 12 February 2013]. Society for Science & the Public.
49. Renter E (2012) Bisphenol-S Added to BPA-Free Products by Greedy Corporations. Available: <http://naturalsociety.com/toxic-bisphenol-s-to-bpa-free-products/> [accessed 12 February 2013]. The Natural Society Newsletter.
50. Schultis T, Metzger JW (2012) Endokrine Aktivität verschiedener Bisphenole und deren Derivate BADGE und BFDGE. Available: http://www.iswa.uni-stuttgart.de/ch/poster/Setac03_HD_Bisphenole.pdf [accessed 12 February 2013]. Institute for Sanitary Engineering, Water Quality and Solid Waste Management, University of Stuttgart, Germany.

51. Volkel W, Bittner N, Dekant W (2005) Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 33: 1748-1757.
52. Balakrishnan B, Henare K, Thorstensen EB, Ponnampalam AP, Mitchell MD (2010) Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 202: 391-397.
53. Zhang J, Cooke GM, Curran IH, Goodyer CG, Cao XL (2011) GC-MS analysis of bisphenol A in human placental and fetal liver samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879: 209-214.
54. Edlow AG, Chen M, Smith NA, Lu C, McElrath TF (2012) Fetal bisphenol A exposure: Concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *Reprod Toxicol* 34: 1-7.
55. Nahar MS, Liao C, Kannan K, Dolinoy DC (2013) Fetal liver bisphenol a concentrations and biotransformation gene expression reveal variable exposure and altered capacity for metabolism in humans. *J Biochem Mol Toxicol* 27: 116-123.
56. Gao Q, Horvath TL (2008) Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E817-826.
57. Heindel JJ, vom Saal FS (2009) Role of nutrition and environmental endocrine disrupting chemicals during the perinatal period on the aetiology of obesity. *Mol Cell Endocrinol* 304: 90-96.
58. EURL-Reports (2008) European Union Risk Assessment Report: Bis(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP). Available: <http://www.dehp-facts.com/upload/documents/webpage/DEHP%20RA%20report%20full.pdf> [accessed 08 February 2013]. European Union Risk Assessment Reports, Italy.
59. Chou K, Wright RO (2006) Phthalates in food and medical devices. *J Med Toxicol* 2: 126-135.
60. Castle L, Mayo A, Gilbert J (1989) Migration of plasticizers from printing inks into foods. *Food Addit Contam* 6: 437-443.
61. Wittassek M, Heger W, Koch HM, Becker K, Angerer J, et al. (2007) Daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by German children -- A comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels. *Int J Hyg Environ Health* 210: 35-42.
62. Koch HM, Preuss R, Angerer J (2006) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl* 29: 155-165; discussion 181-155.

63. UBA (2007) Ableitung von Human-Biomonitoring-(HBM-) Werten auf der Basis tolerabler Aufnahmemengen – Teil III: HBM-Werte für Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP). Available: <http://www.umweltbundesamt.de/gesundheit/monitor/Ableitung-HBM-Werte-Teil-III-DEHP.pdf> [accessed 27 February 2013]. Federal Environment Agency, Germany.
64. Wolfe GW, Layton KA (2003) Multigenerational Reproductive Assessment by Continuous Breeding when Diethylhexylphthalate (CAS 117-81-7) was Administered to Sprague Dawley Rats in the Diet. TherImmune Research Corporation, TRC Study No 7244-200.
65. Saillenfait AM, Payan JP, Fabry JP, Beydon D, Langonne I, et al. (1998) Assessment of the developmental toxicity, metabolism, and placental transfer of Di-n-butyl phthalate administered to pregnant rats. *Toxicol Sci* 45: 212-224.
66. Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, et al. (2003) In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect* 111: 1783-1785.
67. Calafat AM, Slakman AR, Silva MJ, Herbert AR, Needham LL (2004) Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 805: 49-56.
68. Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Malek NA, Hodge CC, et al. (2004) Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect* 112: 331-338.
69. Hatch EE, Nelson JW, Qureshi MM, Weinberg J, Moore LL, et al. (2008) Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999-2002. *Environ Health* 7: 27-42.
70. Hurst CH, Waxman DJ (2003) Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci* 74: 297-308.
71. Lapinskas PJ, Brown S, Leesnitzer LM, Blanchard S, Swanson C, et al. (2005) Role of PPARalpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology* 207: 149-163.
72. Pant N, Pant AB, Shukla M, Mathur N, Gupta Y, et al. (2010) Environmental and experimental exposure of phthalate esters: The toxicological consequence on human sperm. *Hum Exp Toxicol* 30: 507-514.
73. Hao C, Cheng X, Xia H, Ma X (2013) The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl)phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Biosci Rep* 32: 619-629.

74. Schmidt JS, Schaedlich K, Fiandanese N, Pocar P, Fischer B (2012) Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Impairs Female Fertility and Promotes Adipogenesis in C3H/N Mice. *Environ Health Perspect* 120: 1123-1129.
75. EC (2011) Commission regulation (EU) No 143/2011. Available: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:044:0002:0006:en:PDF> [accessed 04 May 2013]. Official Journal of the European Union
76. Green R, Hauser R, Calafat AM, Weuve J, Schettler T, et al. (2005) Use of di(2-ethylhexyl) phthalate-containing medical products and urinary levels of mono(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environ Health Perspect* 113: 1222-1225.
77. Calafat AM, Needham LL, Silva MJ, Lambert G (2004) Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 113: e429-434.
78. REACH (2006) REACH Annex XVII: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1907:20090627:DE:PDF> [accessed 08 February 2013]. Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals.
79. Nielsen JB, Strand J (2002) Butyltin compounds in human liver. *Environ Res* 88: 129-133.
80. Kannan K, Takahashi S, Fujiwara N, Mizukawa H, Tanabe S (2010) Organotin compounds, including butyltins and octyltins, in house dust from Albany, New York, USA. *Arch Environ Contam Toxicol* 58: 901-907.
81. Golub M, Doherty J (2004) Triphenyltin as a potential human endocrine disruptor. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 7: 281-295.
82. BGVV (2000) Tributylzinn (TBT) und andere zinnorganische Verbindungen in Lebensmitteln und verbrauchernahen Produkten. Available: http://www.bfr.bund.de/cm/343/tributylzinn_tbt_und_andere_zinnorganische_verbindungen.pdf [accessed 26 February 2013]. Federal Institute for Risk Assessment, Germany.
83. Sadiki AI, Williams DT, Carrier R, Thomas B (1996) Pilot study on the contamination of drinking water by organotin compounds from PVC materials. *Chemosphere* 32: 2389-2398.
84. Yamada S, Fujii Y, Mikami E, Kawamura N, Hayakawa J, et al. (1993) Small-scale survey of organotin compounds in household commodities. *Journal of AOAC International* 76: 436-441.
85. Kannan KS, Giesey J. P. (1999) Occurrence of Butyltin Compounds in Human Blood. *Environ Sci Technol* 33: 3.

86. Omura M, Shimasaki Y, Oshima Y, Nakayama K, Kubo K, et al. (2004) Distribution of tributyltin, dibutyltin and monobutyltin in the liver, brain and fat of rats: two-generation toxicity study of tributyltin chloride. *Environ Sci* 11: 123-132.
87. Lima D, Reis-Henriques MA, Silva R, Santos AI, Castro LF, et al. (2011) Tributyltin-induced imposex in marine gastropods involves tissue-specific modulation of the retinoid X receptor. *Aquat Toxicol* 101: 221-227.
88. Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, Nishikawa J (2005) Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol* 67: 766-774.
89. Zuo Z, Chen S, Wu T, Zhang J, Su Y, et al. (2012) Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice. *Environ Toxicol* 26: 79-85.
90. Arner P, Bernard S, Salehpour M, Possnert G, Liebl J, et al. (2011) Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature* 478: 110-113.
91. Scarpellini E, Tack J (2012) Obesity and metabolic syndrome: an inflammatory condition. *Dig Dis* 30: 148-153.
92. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, et al. (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453: 783-787.
93. Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, Brown RE, Katz DP (1979) The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J Clin Invest* 63: 239-246.
94. Prins JB, O'Rahilly S (1997) Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sci (Lond)* 92: 3-11.
95. Tang QQ, Lane MD (2012) Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81: 715-736.
96. Smas CM, Sul HS (1993) Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73: 725-734.
97. Wang Y, Sul HS (2009) Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. *Cell Metab* 9: 287-302.
98. Ntambi JM, Young-Cheul K (2000) Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130: 3122-3126.
99. Wang Y, Hudak C, Sul HS (2010) Role of preadipocyte factor 1 in adipocyte differentiation. *Clin Lipidol* 5: 109-115.

100. Tontonoz P, Spiegelman BM (2008) Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 77: 289-312.
101. Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS (2002) PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev* 16: 27-32.
102. Rosen ED, Spiegelman BM (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444: 847-853.
103. Rohwedel J, Guan K, Hegert C, Wobus AM (2001) Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicol In Vitro* 15: 741-753.
104. Inadera H, Shimomura A (2005) Environmental chemical tributyltin augments adipocyte differentiation. *Toxicol Lett* 159: 226-234.
105. Masuno H, Iwanami J, Kidani T, Sakayama K, Honda K (2005) Bisphenol a accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicol Sci* 84: 319-327.
106. Reznikoff CA, Bertram JS, Brankow DW, Heidelberger C (1973) Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. *Cancer Res* 33: 3239-3249.
107. Mountford P, Zevnik B, Duwel A, Nichols J, Li M, et al. (1994) Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4303-4307.
108. Hirai H, Karian P, Kikyo N (2011) Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem J* 438: 11-23.
109. Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, et al. (1997) Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 110: 1279-1285.
110. Schaedlich K, Knelangen JM, Navarrete Santos A, Fischer B (2010) A simple method to sort ESC-derived adipocytes. *Cytometry A* 77: 990-995.
111. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
112. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, et al. (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35: W71-74.
113. Pope B, Kent HM (1996) High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* 24: 536-537.

114. Sargis RM, Johnson DN, Choudhury RA, Brady MJ (2010) Environmental endocrine disruptors promote adipogenesis in the 3T3-L1 cell line through glucocorticoid receptor activation. *Obesity (Silver Spring)* 18: 1283-1288.
115. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 37: 907-925.
116. Couzin J (2006) Nobel Prize in Physiology or Medicine. Method to silence genes earns loud praise. *Science* 314: 34.
117. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
118. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675.
119. Koch HM, Gonzalez-Reche LM, Angerer J (2003) On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 784: 169-182.
120. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, et al. (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 83: 757-766.
121. Feige JN, Gelman L, Rossi D, Zoete V, Metivier R, et al. (2007) The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *J Biol Chem* 282: 19152-19166.
122. Braun JM, Yolton K, Dietrich KN, Hornung R, Ye X, et al. (2009) Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect* 117: 1945-1952.
123. Swan SH (2008) Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res* 108: 177-184.
124. Weuve J, Hauser R, Calafat AM, Missmer SA, Wise LA (2010) Association of exposure to phthalates with endometriosis and uterine leiomyomata: findings from NHANES, 1999-2004. *Environ Health Perspect* 118: 825-832.
125. Hatch EE, Nelson JW, Stahlhut RW, Webster TF (2010) Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. *Int J Androl* 33: 324-332.
126. Grun F (2010) Obesogens. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17: 453-459.

127. Takai Y, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Kamei Y, Osuga Y, et al. (2001) Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development. *Reprod Toxicol* 15: 71-74.
128. Nunez AA, Kannan K, Giesy JP, Fang J, Clemens LG (2001) Effects of bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere* 42: 917-922.
129. Chamorro-Garcia R, Sahu M, Abbey RJ, Laude J, Pham N, et al. (2013) Transgenerational Inheritance of Increased Fat Depot Size, Stem Cell Reprogramming, and Hepatic Steatosis Elicited by Prenatal Obesogen Tributyltin in Mice. *Environ Health Perspect* 121: 359-366.
130. Takatori S, Akutsu K, Kondo F, Ishii R, Nakazawa H, et al. (2012) Di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in media for in vitro fertilization. *Chemosphere* 86: 454-459.
131. Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, et al. (2003) Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* 13: 546-553.
132. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL (2007) Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13056-13061.
133. Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, et al. (2008) Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 563-567.
134. Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK (2013) Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations. *PLoS One* 8: e55387.
135. Tang Y, Luo Y, Jiang Z, Ma Y, Lin CJ, et al. (2012) Jak/Stat3 signaling promotes somatic cell reprogramming by epigenetic regulation. *Stem Cells* 30: 2645-2656.
136. Jackson A, Vayssiere B, Garcia T, Newell W, Baron R, et al. (2005) Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. *Bone* 36: 585-598.
137. Masuno H, Kidani T, Sekiya K, Sakayama K, Shiosaka T, et al. (2002) Bisphenol A in combination with insulin can accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *J Lipid Res* 43: 676-684.
138. Sakurai K, Kawazuma M, Adachi T, Harigaya T, Saito Y, et al. (2004) Bisphenol A affects glucose transport in mouse 3T3-F442A adipocytes. *Br J Pharmacol* 141: 209-214.

139. Phrakonkham P, Viengchareun S, Belloir C, Lombes M, Artur Y, et al. (2008) Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110: 95-103.
140. Jeong S, Yoon M (2011) 17beta-Estradiol inhibition of PPARgamma-induced adipogenesis and adipocyte-specific gene expression. *Acta Pharmacol Sin* 32: 230-238.
141. Linehan C, Gupta S, Samali A, O'Connor L (2012) Bisphenol A-mediated suppression of LPL gene expression inhibits triglyceride accumulation during adipogenic differentiation of human adult stem cells. *PLoS One* 7: e36109.
142. Kim MH, Park JS, Seo MS, Jung JW, Lee YS, et al. (2010) Genistein and daidzein repress adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via Wnt/beta-catenin signalling or lipolysis. *Cell Prolif* 43: 594-605.
143. Cawthorn WP, Bree AJ, Yao Y, Du B, Hemati N, et al. (2012) Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a beta-catenin-dependent mechanism. *Bone* 50: 477-489.
144. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, et al. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139: 4252-4263.
145. Somm E, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, Combescure C, et al. (2009) Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 117: 1549-1555.
146. Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Jefferson WN (2005) Developmental exposure to estrogenic compounds and obesity. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73: 478-480.
147. Desvergne B, Michalik L, Wahli W (2004) Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol* 18: 1321-1332.
148. Bility MT, Thompson JT, McKee RH, David RM, Butala JH, et al. (2004) Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by phthalate monoesters. *Toxicol Sci* 82: 170-182.
149. Lin Y, Wei J, Li Y, Chen J, Zhou Z, et al. (2011) Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: 527-538.
150. Chen SQ, Chen JN, Cai XH, Chen GR, Gao Y, et al. (2012) Perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate leads to restricted growth and delayed lung maturation in newborn rats. *J Perinat Med* 38: 515-521.

151. Issemann I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650.
152. Yang Q, Nagano T, Shah Y, Cheung C, Ito S, et al. (2008) The PPAR alpha-humanized mouse: a model to investigate species differences in liver toxicity mediated by PPAR alpha. *Toxicol Sci* 101: 132-139.
153. Feige JN, Gerber A, Casals-Casas C, Yang Q, Winkler C, et al. (2010) The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPARalpha-dependent mechanisms. *Environ Health Perspect* 118: 234-241.
154. Li X, Ycaza J, Blumberg B (2011) The environmental obesogen tributyltin chloride acts via peroxisome proliferator activated receptor gamma to induce adipogenesis in murine 3T3-L1 preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127: 9-15.
155. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ (2009) Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci* 66: 236-253.
156. Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S (1993) The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. *Biochimie* 75: 251-256.
157. Yanik SC, Baker AH, Mann KK, Schlezinger JJ (2011) Organotins are potent activators of PPARgamma and adipocyte differentiation in bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. *Toxicol Sci* 122: 476-488.
158. Wan YJ, An D, Cai Y, Repa JJ, Hung-Po Chen T, et al. (2000) Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* 20: 4436-4444.
159. Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR, Jr. (1997) Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* 272: 8071-8076.
160. Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 17: 5718-5733.
161. Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, et al. (2002) Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol* 22: 5585-5592.
162. Lee K, Villena JA, Moon YS, Kim KH, Lee S, et al. (2003) Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J Clin Invest* 111: 453-461.

163. Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS (1999) Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 274: 12632-12641.
164. Zhang X, Ho SM (2011) Epigenetics meets endocrinology. *J Mol Endocrinol* 46: 11-32.

8. Anhang

8.1 Sequenzierung der Real-time RT PCR-Produkte

Die Richtigkeit der Real-time PCR-Produkte wurde durch Sequenzierung ermittelt (3.5). Dafür wurden die PCR-Produkte in den pGEMT-Vektor kloniert.

8.1.1 Sequenzierung 18S rRNA

Das PCR-Produkt der verwendeten 18S rRNA-Primer wurde bereits in Vorarbeiten von Dr. Sarah Tonack (Universität von Liverpool, Institut für Molekulare und Klinische Krebsmedizin, Liverpool, UK) sequenziert.

```
PCR-Produkt      1   AGAAACGGCTACCACATCCAAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGACCCG
|||||
18S RNA          446 AGAAACGGCTACCACATCCAAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCACTCCCGACCCG

PCR-Produkt      61  GGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGG 91
|||||
18S RNA          506 GGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGG 536
```

Abbildung 33: Vergleich der Sequenz des 18S rRNA PCR-Produkts mit der 18S rRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NR_003278.3). Die verwendeten Primer sind im PCR-Produkt fett und unterstrichen dargestellt; (|) Identische Nukleotide.

8.1.2 Sequenzierung Adipoq

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

```
PCR-Produkt      45   TGTTGGAATGACAGGAGCTGAAGGGCCACGGGGCTTCCCCGGAACCCCTGGCAGGAAAGG
|||||
Adipoq           370  CGTTGGAATGACAGGAGCTGAAGGGCCACGGGGCTTCCCCGGAACCCCTGGCAGGAAAGG

PCR-Produkt      105  GAGCCTGGAGAAGCCGCTTATGTGTATCGCTCAGCGTTCAGTGTGGGGCTGGAGACCCGC
|||||
Adipoq           430  GAGCCTGGAGAAGCCGCTTATGTGTATCGCTCAGCGTTCAGTGTGGGGCTGGAGACCCGC

PCR-Produkt      165  GTCACTGTTCCCAATGTACCCATTCG 190
|||||
Adipoq           490  GTCACTGTTCCCAATGTACCCATTCG 515
```

Abbildung 34: Vergleich der Sequenz des Adipoq PCR-Produkts mit der Adipoq mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_009605.4). Die verwendeten Primer sind im PCR-Produkt fett und unterstrichen dargestellt; (|) Identische Nukleotide.

8.1.3 Sequenzierung Col2a1

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

PCR-Produkt	48	<u>CAGAGGTGATCGTGGTGACA</u> AGGGAGAAAAGGGTGC GCCTGGACCCCGTGGCAGAGATGG	
Col2a1	423	CAGAGGTGATCGTGGTGACAAGGGAGAAAAGGGTGC GCCTGGACCCCGTGGCAGAGATGG	
PCR-Produkt	61	AGAACCTGGTACCCCTGGAAATCCTGGCCCCGCTGGCCCTCCAGGTCCCCCTGGTCCCC	
Col2a1	483	AGAACCTGGTACCCCTGGAAATCCTGGCCCCGCTGGCCCTCCAGGTCCCCCTGGTCCCC	
PCR-Produkt	121	TGGCCTTAGTGCAGGAACTTCGCGGCTCAGATGGC <u>TGGAGGGTATGACGAGAAGG</u>	174
Col2a1	543	TGGCCTTAGTGCAGGAACTTCGCGGCTCAGATGGCTGGAGGGTATGACGAGAAGG	599

Abbildung 35: Vergleich der Sequenz des Col2a1 PCR-Produkts mit der Col2a1 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_001113515.2). Die verwendeten Primer sind im PCR-Produkt fett und unterstrichen dargestellt; (|) Identische Nukleotide.

8.1.4 Sequenzierung Fabp4

Das PCR-Produkt der verwendeten Fabp4-Primer wurde sequenziert.

PCR-Produkt	47	<u>TGGAAGCTTGTCCTCCAGTGA</u> AAAACCTCGATGATTACATGAAAGAAGTGGGAGTGGGCTTT	
Fabp4	91	TGGAAGCTTGTCCTCCAGTGA AAAACCTCGATGATTACATGAAAGAAGTGGGAGTGGGCTTT	
PCR-Produkt	107	CCACAAGGAAAGTGGCAGGCATGGCCAAGCCCAACATGATCATCAGCGTAAATGGGGATT	
Fabp4	151	CCACAAGGAAAGTGGCAGGCATGGCCAAGCCCAACATGATCATCAGCGTAAATGGGGATT	
PCR-Produkt	167	TGGTCACCATCCGGTCAGAGAGTACTTTTAAAAACACCGAGATTCCTTCAAACCTGGGCG	
Fabp4	211	TGGTCACCATCCGGTCAGAGAGTACTTTTAAAAACACCGAGATTCCTTCAAACCTGGGCG	
PCR-Produkt	227	TGGAATTCGATGAAATCACC GCAGACGACAGGAAGGTGAAGAGCATCATAACCCTAGATG	
Fabp4	271	TGGAATTCGATGAAATCACC GCAGACGACAGGAAGGTGAAGAGCATCATAACCCTAGATG	
PCR-Produkt	287	GCGGGGCCCTGGTGCAGGTGCA <u>GAAGTGGGATGGAAAGTCGA</u>	328
Fabp4	331	GCGGGGCCCTGGTGCAGGTGCAGAAAGTGGGATGGAAAGTCGA	372

Abbildung 36: Vergleich der Sequenz des Fabp4 PCR-Produkts mit der Fabp4 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_024406.2). Die verwendeten Primer sind im PCR-Produkt fett und unterstrichen dargestellt; (|) Identische Nukleotide.

8.1.13 Sequenzierung Sox9

Das PCR-Produkt der verwendeten Sox9-Primer wurde sequenziert.

PCR-Produkt	41	<u>GCGCCTTGAAGATAGCATTAGG</u> AGAGATGTGAGTCTGTTCCGTGGCCTCTTCGGCCTCCG	
Sox9	994	GCGCCTTGAAGATAGCATTAGGAGAGATGTGAGTCTGTTCCGTGGCCTCTTCGGCCTCCG	
PCR-Produkt	101	CTTGTCCGTTCTTCACCGACTT	122
Sox9	934	CTTGTCCGTTCTTCACCGACTT	913

Abbildung 45: **Vergleich der Sequenz des Sox9 PCR-Produkts mit der Sox9 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_011448.4).** Die verwendeten Primer sind im PCR-Produkt fett und unterstrichen dargestellt; (|) Identische Nukleotide.

8.2 Sequenzierung des Pparg2-Plasmids

Das von Prof. Robert M. Sargis (Universität von Chicago, Medizinische Fakultät, Chicago, USA) zur Verfügung gestellte PPARg2 Plasmid (pSG5-Vektor) wurde sequenziert. Dafür wurde ein Primer der T7 Region des Vektors (5' Sequenz-Primer, Tabelle 2) und gegenläufig ein Primer der Promotorregion SV40 (3' Sequenz-Primer, Tabelle 2) eingesetzt. Die dadurch erhaltenen Sequenzen (Abbildung 46) ergaben zu 98% die codierende Sequenz des murinen Pparg2-Gens (GenBank Acc. No. NM_011146.3).

(A) Sequenzierung mit 5' Sequenz-Primer T7 (Tabelle 2).

PCR-Produkt	6	TGGGTGAAACTCTGGGAGAT-CTCCTGTCTGACCCAGAGCATGGTGCCTTCGCTGATGCA
Pparg2	47	TGGGTGAAACTCTGGGAGATTCTCCTGT-TGACCCAGAGCATGGTGCCTTCGCTGATGCA
PCR-Produkt	65	CTGCCTATGAGCACTTCACAAGAAATTACCATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCCC
Pparg2	106	CTGCCTATGAGCACTTCACAAGAAATTACCATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCCC
PCR-Produkt	125	ACCAACTTCGGAATCAGCTCTGTGGACCTCTCCGTGATGGAAGACCACTCGCATTCTTT
Pparg2	166	ACCAACTTCGGAATCAGCTCTGTGGACCTCTCCGTGATGGAAGACCACTCGCATTCTTT
PCR-Produkt	185	GACATCAAGCCCTTTACCACAGTTGATTTCTCCAGCATTTCTGCTCCACACTATGAAGAC
Pparg2	226	GACATCAAGCCCTTTACCACAGTTGATTTCTCCAGCATTTCTGCTCCACACTATGAAGAC
PCR-Produkt	245	ATTCCATTCAACAAGAGCTGACCCAATGGTTGCTGATTACAAATATGACCTGAAGCTCCAA
Pparg2	286	ATTCCATTCAACAAGAGCTGACCCAATGGTTGCTGATTACAAATATGACCTGAAGCTCCAA
PCR-Produkt	305	GAATACCAAAGTGCATCAAAGTAGAACCTGCATCTCCACCTTATTATTTCTGAAAAGACC
Pparg2	346	GAATACCAAAGTGCATCAAAGTAGAACCTGCATCTCCACCTTATTATTTCTGAAAAGACC
PCR-Produkt	365	CAGCTCTACAACAGGCCCTCATGAAGAACCTTCTAACTCCCTCATGGCCATTGAGTGCCGA
Pparg2	406	CAGCTCTACAACAGGCCCTCATGAAGAACCTTCTAACTCCCTCATGGCCATTGAGTGCCGA
PCR-Produkt	425	GTCTGTGGGGATAAAGCATCAGGCTTCCACTATGGAGTTCATGCTTGTGAAGGATGCAAG
Pparg2	466	GTCTGTGGGGATAAAGCATCAGGCTTCCACTATGGAGTTCATGCTTGTGAAGGATGCAAG
PCR-Produkt	485	GGTTTTTCCGAAGAACCATCCGATTGAAGCTTATTTATGATAGGTGTGATCTTAAC TGC
Pparg2	526	GGTTTTTCCGAAGAACCATCCGATTGAAGCTTATTTATGATAGGTGTGATCTTAAC TGC
PCR-Produkt	545	CGGATCCACAAAAAAGTAGAAATAAATGTCAGTACTGTCGGTTTCAGAAGTGCCTTGCT
Pparg2	586	CGGATCCACAAAAAAGTAGAAATAAATGTCAGTACTGTCGGTTTCAGAAGTGCCTTGCT
PCR-Produkt	605	GTGGGGATGTCTCACAATGCCATCAGGTTTGGGCGGATGCCACAGGCCGAGAAGGAGAAG
Pparg2	646	GTGGGGATGTCTCACAATGCCATCAGGTTTGGGCGGATGCCACAGGCCGAGAAGGAGAAG
PCR-Produkt	665	CTGTTGGCGGAGATCTCCAGTGATATCGACCAGCTGAACCCAGAGTCTGCTGATCTGCGA
Pparg2	706	CTGTTGGCGGAGATCTCCAGTGATATCGACCAGCTGAACCCAGAGTCTGCTGATCTGCGA
PCR-Produkt	725	GCCCTGGCAAAGCATTGTATGACTCATAATAAAGTCCTTCCCGCTGACCAAAGCCAAC
Pparg2	766	GCCCTGGCAAAGCATTGTATGACTCATAATAAAGTCCTTCCCGCTGACCAAAGCCAAG
PCR-Produkt	785	GCGAGGGCGATCTTGACAGGAAAGACAACGGACAAATCACCATTTGTCATCTACGACATG
Pparg2	826	GCGAGGGCGATCTTGACAGGAAAGACAACGGACAAATCACCATTTGTCATCTACGACATG
PCR-Produkt	845	AATTCCTTAATGATGGGAGAAGAT-AAATCAAGTTCAAAACATATCACCCCTGCA-GAG
Pparg2	886	AATTCCTTAATGATGGGAGAAGATAAAATCAAGTTCAAAACATATCACCCCTGCAAGGAG
PCR-Produkt	903	CAGAGCAAAGAGG-GGCCATCCGAATTTT-CAAG 934
Pparg2	946	CAGAGCAAAGAGGTGGCCATCCGAATTTTCAAG 979

(B) Sequenzierung mit 3' Sequenz-Primer SV40 (Tabelle 2).

PCR-Produkt	87	GGAGCAGGGGGCGAAGGCCACGCCCTCTCCGTCCCCCGAT-ACACGCAGTAGCCGCA
Pparg2	1537	
PCR-Produkt	146	CGCGCTCTGTGACGCCCGCTGAGGCCTGTCATCTTCTGGAGCACCTCGGCGAACAGCC
Pparg2	1477	
PCR-Produkt	206	GAGAGGACTCTGGGTGATTGAGCCTGAGCCGAGTCCCAGGGCCTGCAGCAGGTTGTCTT
Pparg2	1417	
PCR-Produkt	266	GGATGTCCTCGATGGGCTTCACGCTCAGCAAGCCTGGGCGGTCTCCACTGAGAATAATGA
Pparg2	1357	
PCR-Produkt	326	CAGCTACAAATATAGCCAAGCCACTGTCATCTAATCCCAGTGCATTGAACTTCACAGCAA
Pparg2	1297	
PCR-Produkt	386	ACTCAAACCTTAGGCTCCATAAAGTCACCAAAGGGCTTCCGCAGGCTTTTGAGGAACTCCC
Pparg2	1237	
PCR-Produkt	446	TGGTCATGAATCCTTGGCCCTCTGAGATGAGGACTCCATCTTTATTCATCAGGGAGGCCA
Pparg2	1177	
PCR-Produkt	506	GCATCGTGTAGATGACCTCATGGACACCATACTTGAGCAGAGTCACTTGGTCATTCAAAT
Pparg2	1117	
PCR-Produkt	566	CAAGGTTAATGAAACCAGGGATATTTTGGCATACTCTGTGATCTCTTGCACGGCTTCTA
Pparg2	1057	
PCR-Produkt	626	CGGATCGAAACTGGCACCCCTTGAAAAATTCGGATGGCCACCTCTTTGCTCTGCTCCTGCA
Pparg2	997	
PCR-Produkt	686	GGGGGTGATATGTTTGAACCTGATTTTATCTTCTCCCATCATTAAGGAATTCATGTCGT
Pparg2	937	
PCR-Produkt	746	AGATGACAAATGGTGATTTGTCCGTGTCTTTCCGTCAAGATCGCCCTCGCCTTGGCTT
Pparg2	877	
PCR-Produkt	806	TGGTCAGCGGAAGGACTTTATGTATGAGTCATACAAATGCTTTGCCAGGGCTCGCAGAT
Pparg2	817	
PCR-Produkt	866	CAGCAGACTCTGGGTTGAGCTGGTCGATATCACTGGAGATCTCCGCCA-CAGCTTCTCCT
Pparg2	757	
PCR-Produkt	925	TCTCGGCCTGTGGCAT 940
Pparg2	697	TCTCGGCCTGTGGCAT 682

Abbildung 46: Vergleich der Sequenz des Pparg2-Plasmids mit der Pparg2 mRNA-Sequenz der Maus (Acc. No.: NM_011146.3). (I) Identische Nukleotide.

8.3 Sequenzierung des PPRE

Das von Prof. Robert M. Sargis (Universität von Chicago, Medizinische Fakultät, Chicago, USA) zur Verfügung gestellte PPRE-Konstrukt wurde mit Hilfe des GL-Primers (Tabelle 2) sequenziert. Dabei wurde nachgewiesen, dass das PPRE-Konstrukt eine Wiederholung der PPAR-Konsensussequenz TGACCTnTGTCCT enthält. Diese Sequenz befindet sich im Abstand von 18 Basen zweimal in der Multiple Cloning Site des PGL2-Vektors.

*AATGGGCGGAACTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGATTAGGGGCGGGACTATGGTTGCGAA
TTGAGATGCAGATCTCCCGAACG**TGACCTTGTCCT**GGTCCACTTCCCGAACG**TGACCTTGTCCT**GT
CCACTGGTACCTCCCGGGTTATGTTAGCTCAGTTACAGTAC*

Abbildung 47: **Sequenzierung des PPRE-Konstrukts im PGL2-Vektor.** Die Vektorsequenz ist kursiv dargestellt. Die beiden PPRE sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Lebenslauf

Name: Ronald Biemann

Geburtsdatum: 12. Mai 1983, Merseburg

Familienstand: verheiratet; 1 Kind

Nationalität: deutsch

Seit September 2013: Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Arbeitsgruppe: Prof. Berend Isermann
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Medizinische Fakultät, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg

Seit Mai 2009: Dissertation zum Thema: Einfluss endokrin aktiver Nahrungsmittelkontaminanten auf die Entstehung von Fettzellen

Betreuer: Prof. Bernd Fischer
Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale

2004-2009 Studium der Ernährungswissenschaften
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale
Dipl. Ernährungswissenschaftler (Abschluss 1,3)

Thema der Diplomarbeit: Wirkung von Hydroxyfettsäuren auf die Cholesterinhomöostase in Makrophagen und Schaumzellen

Betreuer: Prof. Klaus Eder
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale

2002-2003 Grundwehrdienst Bundeswehr

1993 - 2002 Geiseltalgymnasium Mücheln
Allgemeine Hochschulreife

Förderung:

DGKL Nachwuchsakademie – Anschubfinanzierung für das Forschungsprojekt: Mechanismen der umweltinduzierten Vererbung von Adipositas. 01.03.2014, 8000 EUR.

Reisekostenstipendium der GlaxoSmithKline Stiftung für die Teilnahme als Vortragender auf dem Kongress: 28. Jahrestagung der Deutschen Adipositasgesellschaft, 04.-06.10.2012, Stuttgart, Deutschland, 400€

Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienst e.V. (DAAD) für eine Vortragsreise zu Prof. Bruce Blumberg, Universität von Kalifornien, Irvine, USA, 1.000€

Reisekostenstipendium der Gordon Research Conference (GRC) für die Teilnahme als Vortragender auf dem Kongress: GRC on Environmental Endocrine Disruptors, 02.-03.06.2012, Mount Snow Resort, West Dover, Vermont, USA, 1100\$

Reisekostenstipendium der COST Action FA0702 für die Teilnahme als Vortragender auf dem Kongress: Conference of Maternal Interaction with Gametes and Embryo - GEMINI, 29.09.-02.10.2011, Gijon, Spanien, 600€

Reisekostenstipendium von IPSEN für die Teilnahme als Vortragender auf dem Kongress: 54. Symposium der Deutschen Endokrinologischen Gesellschaft, 30.03-02.04.2011, Hamburg, Deutschland, 200€

Auslandsaufenthalte:

Vortragsreise zu Prof. Bruce Blumberg, Universität von Kalifornien, Irvine, USA, im Juni 2012

Auslandspraktikum in Van (Türkei) im Bereich Lebensmittelqualität, Hygiene, HACCP, vom 04.08-01.09.2006

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen, Vorträge und Poster

eingegangen:

Zeitschriftenartikel:

Biemann R., Fischer B., Blüher M., Navarrete Santos A. (2014) Tributyltin affects adipogenic cell fate commitment in mesenchymal stem cells by a PPAR γ independent mechanism. Chem Biol Interact. 2014 Feb 8;214C:1-9.

Biemann R., Fischer B., Navarrete Santos A. (2014) Adipogenic effects of a combination of the endocrine-disrupting compounds bisphenol a, diethylhexylphthalate, and tributyltin. Obes Facts. 2014;7(1):48-56.

Biemann R., Navarrete Santos A., Fischer B. (2014) Einfluss endokrin aktiver Nahrungsmittelkontaminanten auf die Entstehung von Fettzellen. Dtsch. Ges. Klin. Chem. Mit. 2014; 1:18-24.

Biemann R., Navarrete Santos A., Navarrete Santos A., Riemann D., Knelangen J., Blüher M., Koch H., Fischer B. (2012) Endocrine disrupting chemicals affect the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in distinct ontogenetic windows. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 13;417(2):747-52.

Kammerer I., Ringseis R., **Biemann R.**, Wen G., Eder K. (2011) 13-hydroxy linoleic acid increases expression of the cholesterol transporters ABCA1, ABCG1 and SR-BI and stimulates apoA-I-dependent cholesterol efflux in RAW264.7 macrophages. Lipids Health Dis. 2011 Nov 30; 10(1):222.

Vorträge:

Biemann R., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2013) Endocrine disrupting chemicals may promote obesity. XVIII Lipid Meeting Leipzig, 05.-07.12.2013, Leipzig, Abstract Book

Isermann B., Biemann R. (2013) Insights into epigenetics in adipositas. XVIII Lipid Meeting Leipzig, 05.-07.12.2013, Leipzig, Abstract Book

Biemann R., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2013) Endocrine disrupting chemicals – Ursache der Adipositas Epidemie? 10. Jährliche Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL), 23.-26.10.2013, Dresden, Abstract Book

Biemann R., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2012) Endocrine active food contaminants affect the adipogenic commitment of mesenchymal stem cells. Halbjährliches Staudinger Symposium der DGKL, 24.-26.06.2012, Banz, Abstract Book

Biemann R., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2012) Endocrine active food contaminants drive the adipogenic commitment of mesenchymal stem cells independently from PPARgamma. Gordon Research Seminar (GRS) on Environmental Endocrine Disruptors, 02.-03.06.2012, Mount Snow Resort, West Dover, Vermont, USA

Biemann R., Riemann D., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2012) Food contaminants direct adipogenesis in mesenchymal stem cells. 49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, 14.-17.03.2012, München, Abstract Book

Biemann R., Riemann D., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2011) Endocrine active food contaminants may contribute to the rising prevalence of obesity. EPH Consultative Conference on Environment and Public Health, 07.-12.11.2011, Berlin

Biemann R., Riemann D., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2011) The food contaminant tributyltin affects adipogenic commitment of mesenchymal stem cells. Fourth General Conference of Maternal Interaction with Gametes and Embryo - GEMINI - COST Action FA0702, 29.09.-02.10.2011, Gijon, Spanien, Abstract Book

Biemann R., Riemann D., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2011) The food contaminants bisphenol A, phthalates (DEHP) and tributyltin impact adipogenic commitment of mesenchymal stem cells. 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters - COW 2011, 16.-29.04.2011, Kopenhagen, Dänemark, Abstract Book

Biemann R., Riemann D., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2011) Nutritional contaminants like bisphenol A, phthalates (DEHP) and tributyltin affect adipogenesis of embryonic stem cells. 54. Symposium der Deutschen Endokrinologischen Gesellschaft, 30.03.-02.04.2011, Hamburg, Abstract Book

Poster:

Biemann R., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2012) Food contaminants alone and in combination affect adipogenic differentiation of stem cells. 28. Jahrestagung der Deutschen Adipositasgesellschaft, 04.-06.10.2012, Stuttgart, Abstract Book

Biemann R., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2012) Endocrine active food contaminants drive the adipogenic commitment of mesenchymal stem cells independently from PPARgamma. Gordon Research Conference (GRC) on Environmental Endocrine Disruptors, 02.-03.06.2012, Mount Snow Resort, West Dover, Vermont, USA

Biemann R., Riemann D., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2012) Food contaminants direct adipogenesis in mesenchymal stem cells. 49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, 14.-17.03.2012, München, Abstract Book

Biemann R., Riemann D., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2011) Machen Nahrungsmittelkontaminanten wie Bisphenol A, Phthalate oder Tributylzinn adipös? Erster Doktorandenkongress der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität, 25.-26.11.2011, Halle, Abstract Book

Jann J.C., Ernst J., Biemann R., Koch H. und Fischer B. (2011) Interaktion der Signalwege des Arylhydrocarbon receptor (AhR) und peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in der Granulosazelllinie KGN. Erster Doktorandenkongress der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität, 25.-26.11.2011, Halle, Abstract Book

Ernst J., Jann J.C., Biemann R., Koch H. und Fischer B. (2011) Aryl hydrocarbon receptor (AhR) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling in the human granulosa cell line KGN. EPH Consultative Conference on Environment and Public Health, 07.-12.11.2011, Berlin

Ernst J., Jann J.C., Biemann R. und Fischer B. (2011) Crosstalk between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) signaling in the human granulosa cell line KGN*. 7th Duesseldorf symposium on immunotoxicology, 21.-24.09.2011, Düsseldorf, Abstract Book

Biemann R., Riemann D., Navarrete Santos A. und Fischer B. (2011) Nutritional contaminants like BPA, DEHP and TBT impact adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. XXIV Bilaterales Symposium Halle-Posznan, 20.-22.05.2011, Halle

Biemann R., Riemann D., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2011) The food contaminants bisphenol A, phthalates (DEHP) and tributyltin impact adipogenic commitment of mesenchymal stem cells. 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters - COW 2011, 16.-29.04.2011, Kopenhagen, Dänemark, Abstract Book

Biemann R., Riemann D., Fischer B. und Navarrete Santos A. (2011) Nutritional contaminants like bisphenol A, phthalates (DEHP) and tributyltin affect adipogenesis of embryonic stem cells. 54. Symposium der Deutschen Endokrinologischen Gesellschaft, 30.03-02.04.2011, Hamburg, Abstract Book

Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

I declare under penalty of perjury that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.

Datum / Date

Unterschrift des Antragstellers / Signature of the applicant

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Ich bedanke mich bei **Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer** für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie anzufertigen. Für die stetige Unterstützung und für die Hilfestellung bei der Realisierung von Teilnahmen an Kongressen danke ich ganz besonders.

Mein besonderer Dank gilt **Frau PD Dr. Anne Navarrete Santos** für die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge, die Anleitung zum eigenverantwortlichen Arbeiten und für die immer freundschaftliche und kollegiale Atmosphäre. Bei **Herrn Prof. Dr. Matthias Blüher** bedanke ich mich für die freundliche Zusammenarbeit und das kritische Lesen von Manuskripten und Anträgen.

Bei **meiner Frau** bedanke ich mich für die ausdauernde Unterstützung in jedweder Hinsicht, ihrem besonderen Interesse und ihren stets kreativen Vorschlägen. **Herrn Dr. Alexander Navarrete Santos** und **Frau PD Dr. Dagmar Riemann** danke ich für die viele Zeit, die sie investiert haben, um die erforderlichen FACS-Analysen durchzuführen. **Herrn Dr. Holger Koch** möchte ich mein Dank dafür aussprechen, dass er die MEHP-Messungen durchgeführt hat. **Sabine Schrötter, Franziska Knöfel** und **Michaela Kirstein** standen mir mit viel Ausdauer bei der Laborarbeit zur Seite. Für die gute Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft bedanke ich mich. **Frau Dr. Insa Schröder, Julia Knelangen, Matthias Jung, Maria Schindler, Kristina Schädlich, René Thieme, Judith Czarnota** und **Juliane-Susanne Schmidt** danke ich für die vielen wertvollen Ratschläge und die freundschaftliche Atmosphäre.

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

Der **Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V.** und dem **DAAD** danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.