

Microarray-basierte Expressionsanalysen des
weißen Fettgewebes der NZO-Maus sowie der
Langerhansschen Inseln der NZL-Maus:
Zwei Modelle für das metabolische Syndrom

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat.)

angefertigt am Deutschen Institut für Ernährungsforschung,
Abteilung Pharmakologie
eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin
Tanja S. Dreja
aus Heidenheim a. d. Brenz

Potsdam-Rehbrücke, Februar 2009

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 3.0 Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3237/>
urn:nbn:de:kobv:517-opus-32379
[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-32379>]

Nicht weil es schwer ist, wagen wir es nicht,
sondern weil wir es nicht wagen, ist es schwer.

L. A. Seneca

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
1 Einleitung	1
1.1 Das metabolische Syndrom	1
1.1.1 Die Adipositas	1
1.1.2 Das weiße Fettgewebe	2
1.1.3 Insulinresistenz	3
1.1.4 <i>Diabetes mellitus</i>	4
1.1.5 Die β -Zelle	5
1.2 Tiermodelle für das metabolische Syndrom	6
1.2.1 Die <i>New Zealand obese</i> -Maus: Ein Modell für das humane metabolische Syndrom	7
1.2.2 Die NZL-Maus: Ein neues alternatives Modell zur NZO-Maus?	8
1.3 Isolation von RNA aus den Langerhansschen Inseln	8
1.3.1 <i>Laser Capture Microdissection</i>	9
1.4 Arraybasierte Genomanalysen	10
1.4.1 Aufbau und Herstellung von Microarrays	11
1.4.2 Array Hybridisierung	12
1.4.3 Auswertung von Microarrays	13
1.5 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Versuchstiere	16
2.1.2 Synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer)/ TaqMan-Sonden	16
2.1.3 Reaktionskits	17
2.2 Tierexperimentelle Methoden	18
2.2.1 Haltungsbedingungen	18
2.2.2 Diätische Intervention	18
2.2.3 Phänotypische Charakterisierung	19
2.2.3.1 Bestimmung der Körpermaße und der Körperzusammensetzung	19
2.2.3.2 Bestimmung der Blutglucosewerte und der Plasmaparameter	19
2.2.3.3 <i>Intraperitonealer</i> Glucosetoleranztest (<i>i.p.</i> GTT)	19
2.2.4 Tötung der Tiere und Gewebeentnahme	19
2.3 Molekularbiologische Methoden	20
2.3.1 Isolierung von Gesamt-DNA	20
2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA	20
2.3.2.1 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus weißem Fettgewebe	20
2.3.2.2 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Lebergewebe	20
2.3.2.3 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Pankreasgewebe	21
2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	21
2.3.4 Verdau von genomischer DNA	21
2.3.5 Amplifikation von isolierter Inselzell-RNA	21
2.3.6 Aufreinigung der amplifizierten cDNA	22
2.3.7 Erststrang-cDNA-Synthese	22

2.3.8	Amplifikation von DNA mittels <i>Polymerasekettenreaktion</i> (PCR)	22
2.3.9	Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese	23
2.3.10	Quantitative <i>Real-Time-PCR</i>	23
2.4	Biochemische Methoden	24
2.4.1	Herstellung von zellfreien Proteinextrakten	24
2.4.2	Proteinbestimmung	24
2.4.3	Derivatisierungsblot	25
2.4.4	Quantitativer Nachweis von Insulin mittels <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	26
2.4.5	Bestimmung verschiedener Blutlipide	26
2.4.6	Nachweis von Zytokinen	26
2.5	Gewinnung von RNA aus den Langerhansschen Inseln	26
2.5.1	Anfertigung von Kryoschnitten	26
2.5.2	Schnellfärbung der Kryoschnitte	27
2.5.3	Laserbasierte Mikropräparation von Inselzellen	27
2.5.4	Aufreinigung von RNA aus den Langerhansschen Inseln	28
2.5.5	Kapillarelektrophorese von isolierter RNA	28
2.6	Herstellung der Microarrays	28
2.6.1	Vorverarbeitung der Arrays aus dem weißen Fettgewebe	28
2.6.2	Vorverarbeitung der Arrays aus den Langerhansschen Inseln	29
2.7	Histologie	30
2.7.1	Gewebeaufarbeitung	30
2.7.2	Immunhistochemie	31
2.7.2.1	Hämatoxylinfärbung	32
2.7.3	Mikroskopie	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Untersuchung des weißen epididymalen Fettgewebes (WAT) der NZO-Maus	33
3.1.1	Generierung und Charakterisierung der Versuchstiere für die Expressionsanalyse	33
3.1.2	Auswertung der Microarrays für das weiße Fettgewebe	35
3.1.2.1	Differenziell exprimierte Gene im WAT	35
3.1.2.2	Differenziell regulierte Stoffwechselwege	37
3.1.3	Validierung der beobachteten Änderung in der Genexpression der oxidativen Phosphorylierung durch <i>Real-Time-PCR</i>	38
3.1.4	Untersuchung zur Mitochondrienanzahl im weißen Fettgewebe	39
3.1.5	Untersuchung zur Mitochondrienstruktur im weißen Fettgewebe	40
3.1.6	Oxidationsstatus der Gesamtproteine aus dem weißen Fettgewebe	41
3.1.7	Untersuchung zur Expression von Genen des Immunsystems	43
3.1.8	Vergleich des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels in den Mausstämmen NZO und SJL	46
3.2	Untersuchungen zur Ursache des β -Zelluntergangs in einem alternativen Mausmodell	48
3.2.1	Etablierung und Charakterisierung eines neuen Mausmodells zur Untersuchung der Genexpression in β -Zellen	48
3.2.2	Auswertung der Microarrays aus der isolierten Insel-RNA	52
3.2.3	Validierung der Ergebnisse mittels quantitativer <i>Real-Time-PCR</i>	56
3.2.4	<i>Mlx1pl</i> als diätreguliertes Gen in der Inselzelle?	59
3.2.4.1	Histologische Untersuchung zur Verteilung von ChREBP im Gesamtpankreas	59

3.2.4.2	Untersuchung der bekannten <i>Mlxip1</i> Zielgene	60
3.2.5	<i>Cck</i> als diätreguliertes Gen in der Inselzelle	61
3.2.5.1	Histologischer Nachweis von <i>Cck</i> im Gesamtpankreas	62
3.2.6	Untersuchung zu differenziell regulierten Stoffwechselwegen	62
3.3	Vergleich von Kandidatengenen aus den humanen genomweiten Assoziationsstudien mit den Microarray-Daten aus den Langerhansschen Inseln	63
3.3.1	Validierung der Kandidatengene aus den GWA	66
4	Diskussion	68
4.1	Microarray-Analysen des weißen Fettgewebes der NZO-Maus – Identifizierung von Kandidatengenen für die Adipositas	68
4.1.1	Die Diätintervention führt zu spezifischen Änderungen im Expressionsprofil des weißen Fettgewebes von NZO-Mäusen	68
4.1.2	Vergleich der Genexpression im WAT der beiden Mausstämme SJL und NZO	71
4.1.3	Die Rolle der Entzündungsreaktion im weißen Fettgewebe bei der Entstehung metabolischer Erkrankungen	72
4.1.4	Microarray-Analysen als Werkzeug zur Untersuchung des komplexen weißen Fettgewebes	73
4.2	Microarray-Analysen in isolierten Langerhansschen Inseln – Identifizierung von Kandidatengenen für Typ-2-Diabetes	75
4.2.1	Die NZL-Maus als alternatives Modell für das metabolische Syndrom	75
4.2.2	Morphologie der Langerhansschen Inseln in NZL-Tieren unter der Diätintervention	76
4.2.3	Laserbasierte Mikropräparation als Methode zur Isolation der Langerhansschen Inseln	77
4.2.4	Expressionsuntersuchung in Langerhansschen Inseln von NZL-Mäusen	78
4.2.5	Validierung und Beschreibung der Diabetes-Kandidatengene	79
4.2.6	Expressionsuntersuchung einzelner Stoffwechselwege in den NZL-Männchen unter der Diätintervention	83
4.2.7	Anreicherung inselspezifischer Transkripte	84
4.2.8	Expression und mögliche Funktion von <i>Mlxip1</i> in Langerhansschen Inseln	84
4.2.9	Expression und mögliche Funktion von <i>Cck</i> in Langerhansschen Inseln	86
4.2.10	Korrelation der Microarray-Daten mit den humanen GWA	87
5	Anhang	89
	Abkürzungsverzeichnis	102
	Abbildungsverzeichnis	104
	Tabellenverzeichnis	105
	Literaturverzeichnis	106
	Publikationen	116
	Danksagung	117

Zusammenfassung

Übergewicht und Adipositas führen zu Insulinresistenz und erhöhen deutlich das Risiko für die Entwicklung von Typ-2-Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen. Sowohl Adipositas als auch die Suszeptibilität gegenüber Diabetes sind zu einem erheblichen Teil genetisch determiniert. Die relevanten Risikogene, deren Interaktion mit der Umwelt, insbesondere mit Bestandteilen der Nahrung, und die Pathomechanismen, die zur Insulinresistenz und Diabetes führen, sind nicht vollständig aufgeklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollte durch Genexpressionsanalysen des weißen Fettgewebes (WAT) und der Langerhansschen Inseln die Entstehung und Progression von Adipositas und Typ-2-Diabetes untersucht werden, um relevante Pathomechanismen und neue Kandidatengene zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden Diät-Interventionsstudien mit NZO- und verwandten NZL-Mäusen, zwei polygenen Mausmodellen für das humane metabolische Syndrom, durchgeführt. Eine kohlenhydrathaltige Hochfett-Diät (HF: 14,6 % Fettanteil) führte in beiden Mausmodellen zu früher Adipositas, Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes. Eine fettreduzierte Standarddiät (SD: 3,3 % Fettanteil), welche die Entstehung von Adipositas und Diabetes stark verzögert, sowie eine diabetesprotektive kohlenhydratfreie Hochfett-Diät (CHF: 30,2 % Fettanteil) dienten als Kontrolldiäten. Mit Hilfe der Microarray-Technologie wurden genomweite Expressionsprofile des WAT erstellt. Pankreatische Inseln wurden durch laserbasierte Mikropräparation (*Laser Capture Microdissection*; LCM) isoliert und ebenfalls hinsichtlich ihres Expressionsprofils analysiert. Differenziell exprimierte Gene wurden durch *Real-Time-PCR* validiert.

Im WAT der NZO-Maus bewirkte die HF-Diät eine reduzierte Expression nukleärer Gene der oxidativen Phosphorylierung und von lipogenen Enzymen. Dies deutet auf eine inadäquate Fettspeicherung und -verwertung in diesen Tieren hin. Die Reduktion in der Fettspeicherung und -oxidation ist spezifisch für das adipöse NZO-Modell und konnte bei der schlanken SJL-Maus nicht beobachtet werden, was auf eine mögliche Beteiligung an der Entstehung der Insulinresistenz hinweist. Zusätzlich wurde bestätigt, dass die Expansion des Fettgewebes bei der adipösen NZO-Maus eine zeitlich verzögerte Infiltration von Makrophagen in das WAT und dort eine lokale Immunantwort auslöst.

Darüber hinaus wurde die Methode der LCM etabliert und zur Gewinnung hochangereicherter RNA aus den Langerhansschen Inseln eingesetzt. In erstmalig durchgeführten genomweiten Expressionsanalysen wurde zu einem frühen Zeitpunkt in der Diabetesentwicklung der Einfluss einer diabetogenen HF-Diät und einer diabetesprotektiven CHF-Diät auf das Expressionsprofil von pankreatischen Inselzellen verglichen.

Im Gegensatz zum WAT bewirkt die diabetogene HF-Diät in Inselzellen einerseits, eine erhöhte Expression von nukleären Genen für die oxidative Phosphorylierung und

andererseits von Genen, die mit Zellproliferation assoziiert sind. Zudem wurden 37 bereits annotierte Gene identifiziert, deren differenzielle Expression mit der Diabetesentwicklung korreliert.

Das Peptidhormon Cholecystokinin (*Cck*, 11,8-fach erhöht durch die HF) stellt eines der am stärksten herauf regulierten Gene dar. Die hohe Anreicherung der *Cck*-mRNA in Inselzellen deutet auf eine bisher unbekannte Funktion des Hormons in der Regulation der Inselzellproliferation hin. Der Transkriptionsfaktor *Mlx1p* (ChREBP; 3,8-fach erniedrigt durch die HF) stellt in Langerhansschen Inseln eines der am stärksten herunter regulierten Gene dar. Ferner wurde ChREBP, dessen Funktion als glucoseregulierter Transkriptionsfaktor für lipogene Enzyme bislang in der Leber, aber nicht in Inselzellen nachgewiesen werden konnte, erstmals immunhistochemisch in Inselzellen detektiert. Dies deutet auf eine neue, bisher unbekannte regulatorische Funktion von ChREBP im Glucosensensor-Mechanismus der Inselzellen hin.

Eine durchgeführte Korrelation der mit der Diabetesentwicklung assoziierten, differenziell exprimierten Inselzellgene mit Genvarianten aus humanen genomweiten Assoziationsstudien für Typ-2-Diabetes (WTCCC, *Broad-DGI-T2D*-Studie) ermöglichte die Identifizierung von 24 neuartigen Diabetes-Kandidatengenen.

Die Ergebnisse der erstmals am polygenen NZO-Mausmodell durchgeführten genomweiten Expressionsuntersuchungen bestätigen bisherige Befunde aus Mausmodellen für Adipositas und Diabetes (z.B. *ob/ob*- und *db/db*-Mäuse), zeigen in einigen Fällen aber auch Unterschiede auf. Insbesondere in der oxidativen Phosphorylierung könnten die Ergebnisse relevant sein für das Verständnis der Pathogenese des polygen-bedingten humanen metabolischen Syndroms.

Abstract

Overweight and obesity cause insulin resistance and increase the risk of developing type 2 diabetes and cardiovascular diseases. Both, obesity and susceptibility to diabetes, are to a major part genetically predisposed. The relevant genes, their interaction with the environment – especially with food components – and the pathomechanisms causing insulin resistance and diabetes are not fully known yet.

In the present study the development and progression of obesity and type 2 diabetes should be investigated by the means of gene expression analyses of the white adipose tissue (WAT) and the islets of Langerhans to identify underlying pathomechanisms and new causative candidate genes. For this purpose diet intervention studies on NZO- and related NZL-mice – two polygenic mouse models for the human metabolic syndrome – were performed. A carbohydrate containing high fat-diet (HF: 14.6 % fat) caused early obesity, insulin resistance and type 2 diabetes in both mouse models. A fat reduced standard chow (SD: 3.3 % fat) which strongly delayed the onset of obesity and diabetes, and a diabetes protective carbohydrate free high fat-diet (CHF: 30.2 % fat) served as control diets. Using microarray technology genome wide expression profiles of the WAT were generated. Pancreatic islets were isolated by the means of laser capture microdissection (LCM) and expression profiles of them were created, too. Differentially expressed genes were validated by quantitative real time PCR.

The HF-diet reduced the expression of nuclear genes of the oxidative phosphorylation and lipogenic enzymes in the WAT of the NZO-mouse. This suggests an inadequate storage and utilization of fat in these animals. This is specific for the obese NZO-model and wasn't observed for the lean SJL-mouse, indicating a role in the development of insulin resistance. Additionally, there was proof that the enlargement of the WAT triggers a retarded infiltration of macrophages into the WAT and there a local immune response.

Moreover, the LCM technique was established and used for the isolation of highly enriched RNA from islets of Langerhans. For the first time the influence of carbohydrates in a high fat-diet on the expression profile of pancreatic islets was investigated by the use of genome wide expression analyses at an early time point at the onset of diabetes.

Contrary to the WAT the diabetogenic HF-diet in islets cells increased the expression of both nuclear genes coding for the oxidative phosphorylation and genes associated with cell proliferation. Furthermore 37 already annotated genes correlated with diabetes progression were identified.

The peptide hormone cholecystokinin (*Cck*: 11.8-fold enriched by the HF-diet) is one of the most up-regulated genes. The strong enrichment of *Cck*-mRNA in islets suggests a previously unknown function of the hormone in the regulation of the islet cell proliferation.

The transcription factor ChREBP (*Mlxip*: 3.8-fold reduced by the HF-diet) is one of the most down-regulated genes in the islets of Langerhans. Moreover, ChREBP, which has been already identified as a glucose regulated transcription factor for lipogenic enzymes in the liver but not in islets of Langerhans, was detected for the first time in islet cells, using immunohistochemistry. This points to an until now unknown regulatory function of ChREBP in the glucosensor mechanism of the islet cells.

Correlation of the differentially expressed genes associated with diabetes progression with gene variants from human genome wide association studies for type 2 diabetes (WTCCC, Broad-DGI-T2D-study) made the identification of 24 new diabetes candidate genes possible. The results of the genome wide expression analyses, which were done for the first time on a polygenic mouse-model, corroborated previous results for monogenic mouse-models for obesity and diabetes (e.g. *ob/ob*- and *db/db*-mice), however also demonstrated differences in some instances. Especially the results concerning the oxidative phosphorylation could be relevant for the comprehension of the pathogenesis of the polygenic human metabolic syndrome.

1 Einleitung

1.1 Das metabolische Syndrom

Das metabolische Syndrom stellt den wichtigsten Risikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose sowie von kardiovaskulären Erkrankungen dar und ist somit für eine Vielzahl von Todesfällen verantwortlich. Nach der aktuellen Definition der *International Diabetes Federation* (IDF) von 2005 wird von einem vorliegenden metabolischen Syndrom gesprochen, wenn eine zentrale Adipositas (Taillenumfang: Männer ≥ 94 cm; Frauen ≥ 80 cm) und mindestens zwei der folgenden Erkrankungen als Risikofaktoren diagnostiziert bzw. behandelt werden: Hypertonie $\geq 130/85$ mmHg, Nüchtern-Plasmaglukose $\geq 5,6$ mmol/l, *high density lipoprotein cholesterol* (HDL-C) $< 1,04$ mmol/l bei Männern bzw. $< 1,29$ mmol/l bei Frauen, Hypertriglyceridämie $\geq 1,7$ mmol/l [Giovannucci *et al.*, 2007]. Das metabolische Syndrom ist keinesfalls eine Erscheinung der Neuzeit. Vielmehr wurde schon seit dem 16. Jahrhundert in medizinischen Schriften darüber berichtet. Es trat immer dann gehäuft auf, wenn zu wirtschaftlichen Hochzeiten die Oberschicht im Nahrungsüberfluss lebte, und es dazu zu einer Verminderung der Bewegungsaktivität kam [Hanefeld *et al.*, 2007]. Im 21. Jahrhundert wird eine epidemieartige Ausbreitung des metabolischen Syndroms über den ganzen Globus beobachtet.

1.1.1 Die Adipositas

Bei Erwachsenen werden Übergewicht und Adipositas mit Hilfe des *Body mass index* (BMI) definiert. Hierbei wird der Quotient aus Körpergewicht in Kilogramm und dem Quadrat der Körpergröße in Metern berechnet. Gemäß der Definition der WHO (2008) wird von Übergewicht gesprochen, wenn der BMI zwischen $25,0 - 29,9$ kg/m² liegt. Übersteigt der BMI $30,0$ kg/m², wird dies als Adipositas bezeichnet. Die WHO schätzt die Zahl der Personen, die weltweit an Übergewicht leiden auf rund 1,7 Milliarden. Die Zahl der adipösen Menschen wird auf rund 310 Millionen geschätzt. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass dies stark länderabhängig ist [Bessesen, 2008]. Neue Studien haben ergeben, dass in Europa ein Adipositasanteil von $4,0 - 28,3$ % bei Männern vorliegt. Bei Frauen reicht die Spanne sogar von $6,2 - 36,5$ % [Berghöfer *et al.*, 2008]. Diese Ausmaße sind von demographischen Faktoren wie der Altersstruktur der jeweiligen Region und sozioökonomischen Faktoren einhergehend mit einem Mangel an körperlicher Aktivität abhängig. Somit zählt die Adipositas, hervorgerufen durch eine lang anhaltende erhöhte Kalorienzufuhr über dem eigentlichen Kalorienverbrauch, zu den häufigsten metabolischen Erkrankungen. Diese

positive Energiebilanz führt zu einer Akkumulation von Triglyceriden im Adipozyten und somit zu einer Speicherung der überschüssigen Energie im Fettgewebe [Goossens *et al.*, 2008]. Hierbei muss z.B. zwischen dem die Organe umschließenden viszeralen, auch intraabdominal genannten, Fettgewebe und dem Unterhaut-, dem so genannten subkutanen, Fettgewebe unterschieden werden. Die gesteigerte Triglycerid-Aufnahme in die Adipozyten kann zusätzlich einen Einfluss auf das Immunsystem und den Gesamtmetabolismus haben, was sich wiederum in einer Insulinresistenz (die zu Typ-2-*Diabetes mellitus* (T2DM) führen kann), Bluthochdruck und anormalen Blutlipidwerten sowie einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen widerspiegeln kann [Lazar *et al.*, 2005; Després *et al.*, 2006; Bays *et al.*, 2008]. Dies beruht auf der Fähigkeit des Fettgewebes, mit anderen Organen in Interaktion zu treten (*cross talk*).

1.1.2 Das weiße Fettgewebe

Lange Zeit wurde das Fettgewebe lediglich als Speicherort für Triglyceride gesehen. In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich hierbei vielmehr um ein vielseitiges sowohl endokrin als auch auto- und parakrin wirkendes, hoch komplexes Gewebe handelt [Juge-Aubry *et al.*, 2005; Scherer, 2006]. Das Fettgewebe produziert so genannte Adipokine (z.B. Leptin [Zhang *et al.*, 1994], Adiponectin [Scherer *et al.*, 1995], RBP4 [Yang *et al.*, 2005], Adipsin [Cook *et al.*, 1987]). Diese sind unter anderem an der Steuerung zentraler Prozesse wie der Nahrungsaufnahme (z.B. Leptin), der Insulinsensitivität sowie an der Entstehung von Entzündungsprozessen beteiligt [Chen *et al.*, 2005; MacDougald *et al.*, 2007]. Üblicherweise besteht das Fettgewebe zu 50 % aus Adipozyten. Jedoch ist die Zusammensetzung der verschiedenen Fettdepots (z.B. epididymales weißes Fettgewebe, braunes Fettgewebe) unterschiedlich, was sich auch in dem jeweiligen sezernierten Adipokinmuster widerspiegelt [Yang *et al.*, 2007]. Die restlichen 50 % des Fettgewebes werden von der stroma-vaskulären Fraktion gebildet, die sich aus Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und Präadipozyten zusammensetzt.

In Zeiten einer positiven Energiebilanz kommt es zur Gewichtszunahme mit einer Fettgewebsexpansion, sowohl durch eine Hypertrophie der existierenden Fettzellen als auch durch eine Hyperplasie, d.h. durch die Reifung neuer Adipozyten aus Präadipozyten.

Bei einer ausgebildeten Adipositas kann eine verminderte Fettspeicherung in den Adipozyten beobachtet werden [Lipodystrophie; Mausmodell: A-ZIP; Reitman *et al.*, 2000]. Hierdurch kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von freien Fettsäuren, welche zu Insulinresistenz, Fettleber (Hepatosteatose) und T2DM führen können. Als weiterer Befund für die Bedeutung der Speicherkapazität des Fettgewebes können Erkenntnisse aus der Pharmakologie angeführt werden. Da PPAR- γ Agonisten die Bildung neuer Fettzellen anregen und somit die

Speicherkapazität des Fettgewebes erhöhen, können sie die Insulinsensitivität verbessern und vor T2DM schützen [Vázquez et al., 2002]. Diese Beobachtungen führen zu der Frage, ob ein Speicherdefekt im weißen Fettgewebe zur Entwicklung von T2DM beiträgt.

Parallel zur fortschreitenden Adipositas, die mit einer Umstrukturierung des Fettgewebes einhergeht, kommt es vermehrt zur Infiltration durch Immunzellen wie z.B. Makrophagen [Wellen et al., 2003; Weisberg et al., 2003; Hotamisligil, 2006]. Diese können dann ebenfalls die Sekretion von inflammatorischen Faktoren wie z.B. MCP-1 und TNF- α auslösen. Dadurch kann es zu erhöhter Lipolyse und in Folge dessen zu einer erhöhten Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma kommen, welche sich wiederum als ektope Fetteinlagerung in den insulin sensitiven Organen wie z. B. dem Muskel oder der Leber wiederfinden [Guilherme et al., 2008].

Die mit der Adipositas einhergehende Entzündung, die sich durch erhöhte Spiegel an z.B. IL6, MCP-1 (Ccl2) und TNF- α zeigt, wird zunehmend, zum Teil auch kontrovers, in der Literatur diskutiert. Es konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob es zuerst zu entzündlichen Prozessen im weißen Fettgewebe kommt in Folge deren die Makrophagen infiltrieren oder ob die Entzündung durch die Infiltration ausgelöst wird [Blüher et al., 2008]. Ebenfalls noch unklar ist, ob es durch die Entzündung zu lokaler und anschließend zu systemischer Insulinresistenz kommt oder ob die Insulinresistenz an sich zu entzündlichen Prozessen im weißen Fettgewebe führt [Hotamisligil et al., 1994; Chandalia et al., 2007; Tilg et al., 2006]. Abschließend kann gesagt werden, dass es sich beim Fettgewebe um ein multifunktionales Organ handelt, welches maßgeblich an der Entstehung von metabolischen Erkrankungen beteiligt ist.

1.1.3 Insulinresistenz

Bei der Insulinresistenz müssen das Zusammenspiel zwischen den peripheren insulin sensitiven Organen Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe sowie das Pankreas und im Speziellen die Langerhansschen Inseln und deren β -Zellen betrachtet werden. Im gesunden Organismus kommt es nach der Nahrungsaufnahme insulinabhängig zur Aufnahme der Glucose in die insulin sensitiven Organe (z.B. in den Muskel über den GLUT4), wobei gleichzeitig in der Leber die Gluconeogenese gehemmt und die Glycogensynthese aktiviert wird. Bei insulinresistenten Patienten hingegen spielen drei Schlüsselfaktoren eine wichtige Rolle, die für die Entstehung der Hyperglykämie und des sich anschließenden T2DM verantwortlich sind:

- 1) Eine erhöhte bzw. gestörte Glucoseproduktion in der Leber, da das Insulin nicht in der Lage ist, die hepatische Gluconeogenese in ausreichendem Maße zu inhibieren.

2) Eine Insulinresistenz in den peripheren Organen (Fettgewebe, Skelettmuskel, Leber), welche dann vorliegt, wenn der Körper nicht mehr adäquat auf das sezernierte Insulin reagiert. Hier ist vor allem von Bedeutung, dass der Skelettmuskel in seiner Fähigkeit Glucose aufzunehmen eingeschränkt ist, da nach einer Mahlzeit der größte Anteil an Glucose vom Muskel aufgenommen wird [Das *et al.*, 2006].

3) Eine verminderte oder eingeschränkte Insulinsekretion und -wirkung, was wiederum zu länger anhaltenden erhöhten Blutglucosewerten führt.

Der genaue Pathomechanismus der Insulinresistenz ist jedoch noch nicht vollständig bekannt.

1.1.4 Diabetes mellitus

Der Begriff *Diabetes mellitus* beschreibt eine Stoffwechselstörung mit chronischer Hyperglykämie, die sowohl den Kohlenhydrat-, den Protein- als auch den Fettstoffwechsel beeinflusst.

Grundsätzlich kann man Diabeteserkrankungen in unterschiedliche Formen einteilen. Beim Typ-1-Diabetes handelt es sich um eine, vor allem bereits bei Kindern oder Jugendlichen auftretende, Autoimmunerkrankung die eine Zerstörung der Langerhansschen Inseln (1869 von Paul Langerhans entdeckt) und somit der Insulin produzierenden β -Zellen zur Folge hat. Dies führt zu einem lebenslangen Insulinmangel, der in einer entsprechenden Therapie ausgeglichen werden muss [Martin *et al.*, 2007].

Der häufiger auftretende (~ 95 %) Typ-2-Diabetes hingegen wird durch einen Defekt in der Insulinsekretion und/ oder -wirkung hervorgerufen [WHO, 2006, Kerner *et al.*, 2007].

Dies kann die Folge einer Adipositas assoziierten Insulinresistenz sein. Bei Typ-2-Diabetes kommt es zu erhöhten Blutglucosewerten (Hyperglykämie) und einem fortschreitenden Verlust an Inselzellmasse und somit an β -Zellen. Es gibt eine Vielzahl an Risikofaktoren, wie die Ernährungsgewohnheiten [van Dam *et al.*, 2002], darunter der Ballaststoffanteil der Nahrung, die Verzehrhäufigkeit von rotem Fleisch sowie die Zusammensetzung der aufgenommenen Fettsäuren. Weitere Risikoindikatoren wie z.B. Bluthochdruck, Taillenumfang, HbA1c-Spiegel und andere Biomarker spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Erkrankung an Typ-2-Diabetes [Schulze *et al.*, 2007; Joost, 2008]. Hochrechnungen zur Folge betrug die Anzahl an Diabetikern im Jahre 2000 weltweit rund 171 Millionen. Für das Jahr 2030 wird ein Anstieg auf rund 366 Millionen prognostiziert [Kasuga, 2006]. Dies macht die Dringlichkeit deutlich mehr über die molekularen Mechanismen der Krankheit in Erfahrung zu bringen.

Zusätzlich zu den oben genannten sozioökonomischen Faktoren gibt es genetische Prädispositionen, welche die Wahrscheinlichkeit einer jeden Person an Diabetes zu

erkranken beeinflussen. Aus diesem Grund wird seit einigen Jahren vermehrt die Assoziation einzelner (monogene Ausprägung) oder auch mehrerer Gene (polygene Ausprägung), die zu T2DM führen können, erforscht [O’Rahilly *et al.*, 2005; Doria *et al.*, 2008]. Ein möglicher Ansatz besteht darin, mit Hilfe von genomweiten Assoziationsstudien (GWA), basierend auf *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), dem T2DM zugrunde liegende Genvarianten zu identifizieren (z.B. *Broad-DGI-T2D*-Studie) [Altshuler *et al.*, 2008]. Um die statistische Aussagekraft solcher Daten zu verstärken, wurden in den letzten Monaten und Jahren häufig Metaanalysen durchgeführt um dadurch die Gruppengröße deutlich erhöhen zu können [Sladek *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2007; Saxena *et al.*, 2007; Zeggini *et al.*, 2008]. Auf diese Weise konnten mehrere wichtige Kandidatengene für Typ-2-Diabetes identifiziert werden (z.B. *TCF7L2*, *SLC30A8*, *IGF2BP2*, *CDKN2B*).

1.1.5 Die β -Zelle

Fokussiert auf das Pankreas ist es wichtig, dass die β -Zellmasse durch eine Balance zwischen der Bildung neuer Inselzellen aus Vorläuferzellen (Neogenese), der Zellteilung bereits bestehender β -Zellen (Hyperplasie), der Vergrößerung vorhandener β -Zellen (Hypertrophie) und des programmierten Zelltods (Apoptose) bestimmt wird [Weir *et al.*, 2001; Bouwens *et al.*, 2005; Rhodes 2005; de Koning *et al.*, 2008]. Für den Glucosemetabolismus der β -Zellen spielt der Glucosetransporter GLUT2, sowie die im Pankreas exprimierte Glucokinase (GK_{β}), welche die Glucose an der Hydroxygruppe des C_6 -Atoms phosphoryliert (G-6-P) und somit maßgeblich den Glucosemetabolismus beeinflusst, eine wichtige Rolle [Al-Hasani *et al.*, 2003]. Bei der Glucose stimulierten Insulinsekretion (GSIS) wird Insulin in Abhängigkeit zur vorliegenden Glucosekonzentration sezerniert. Dabei kommt es bei der Verstoffwechslung von Pyruvat zu Acetyl-CoA mit anschließender mitochondrialer Oxidation zu einem erhöhten ATP- zu ADP-Verhältnis, was zum Schließen von ATP-sensitiven K^+ -Kanälen führt. Dies hat eine Depolarisation der Plasmamembran und eine Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Ionen-Kanälen zur Folge. Die Calciumkonzentration wiederum beeinflusst die Insulinexocytose [Prentki *et al.*, 2006; Muoio *et al.*, 2008]. Wenn eine β -Zellstörung vorliegt, kommt es primär zu einer Verringerung der „*first phase*“ Insulinantwort sowie einer inadäquaten oder verspäteten „*second phase*“ Insulinantwort. Zudem liegt ein erhöhtes Proinsulin- zu Insulin-Verhältnis vor. Diese Effekte treten beim Erwachsenen jedoch erst ab einem Verlust von mehr als 50 % der β -Zellen auf. Worin die molekularen Ursachen des Inselzelluntergangs liegen, ist noch ungeklärt. Diskutiert wird, inwiefern ein erhöhter oxidativer Stress eine Rolle spielt, da die β -Zellen aufgrund ihrer geringen Expression von antioxidativen Enzymen wie Katalase oder Glutathion-Peroxidase sehr sensitiv gegenüber diesem sind [Kaneto *et al.*, 2005; Bloch *et al.*,

2007]. In Studien mit teilpankreatektomierten Ratten konnte gezeigt werden, dass diese unter einer Standarddiät normoglykämisch bleiben. Verabreicht man ihnen jedoch einen Hoch-Glucosestimulus, so kommt es zu einem deutlichen Verlust der Insulinsekretion bzw. -wirkung. Hier wird vom Effekt der Glucotoxizität gesprochen [Poitout *et al.*, 2002; Fantus, 2004]. Die Glucotoxizität kann jedoch noch durch eine Vielzahl anderer Faktoren wie z.B. ER-Stress, die Akkumulation von „*islet amyloid polypeptides*“ sowie die Aktivierung oder Veränderung verschiedener Signalkaskaden aus dem Bereich der Entzündungsentstehung oder der Glycosylierung hervorgerufen werden. In einer Studie von Juergens *et al.* konnte gezeigt werden, dass eine Restriktion an Kohlenhydraten einen protektiven Effekt auf die Inselzellen und die Entstehung des T2DM hat [Juergens *et al.*, 2007]. Ebenso wie die Glucotoxizität wird der Effekt der Lipotoxizität diskutiert. Hierbei spielt der, durch die Adipositas und die daraus resultierende gesteigerte Lipolyse, erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren eine wichtige Rolle [Poitout *et al.*, 2008]. Diese beeinflussen die Insulinsekretion und werden als Fetteinlagerungen im Pankreas gespeichert [Stumvoll *et al.*, 2005].

Welche molekularen Pathomechanismen den Inselzelluntergang bzw. die gesteigerte Apoptoserate beim Diabetespatienten verursachen [Plum *et al.*, 2002; Butler *et al.*, 2003], kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig beantwortet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Adipositas häufig auch genetische Prädispositionen zugrunde liegen. Die ektope Fetteinlagerung in den insulinsensitiven Organen kann beim adipösen Patienten wie beschrieben eine Insulinresistenz bewirken. Dies kann wiederum das Auftreten von Typ-2-Diabetes und den sich anschließenden β -Zelluntergang auslösen, wobei bei der Entwicklung von Typ-2-Diabetes ebenfalls genetische Prädispositionen eine wichtige Rolle spielen.

1.2 Tiermodelle für das metabolische Syndrom

Um auf molekularer Ebene Krankheiten näher untersuchen zu können, kann auf verschiedene Tiermodelle zurückgegriffen werden, wobei die Spanne der Versuchsorganismen von Wirbellosen (*Invertebrata*) mit dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* oder der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bis hin zu Säugetieren (*Mammalia*) reicht. Bei den Wirbeltieren sind wiederum Vertreter verschiedener Ordnungen als Versuchstiere zu finden, wobei die Nagetiere (*Mus musculus* und *Rattus norvegicus*) die größte Bedeutung haben. Primaten wie zum Beispiel *Macaca mulatta* [de Koning *et al.*, 1993] spielen eine eher untergeordnete Rolle, da diese im Gegensatz zu Nagetieren deutlich aufwendiger in der Haltung und Handhabung sind.

1.2.1 Die *New Zealand obese*-Maus: Ein Modell für das humane metabolische Syndrom

Um in genetischen Studien reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können, werden häufig so genannte Inzuchtmausstämme verwendet. Hier werden fortlaufend Bruder-/Schwesterverpaarungen durchgeführt, um einen möglichst reinerbigen Mausstamm zu erhalten. Für die vorliegende Arbeit musste ein Tiermodell gewählt werden, welches die Charakteristika des humanen metabolischen Syndroms geeignet widerspiegelt. Bereits in der Mitte des 20. Jahrhunderts wurde die *New Zealand obese* (NZO)-Maus von Bielschowsky beschrieben [Bielschowsky und Bielschowsky, 1953; Bielschowsky und Bielschowsky, 1970]. Diese entstand während der selektiven Inzucht einer Mauslinie zunächst nach dem Merkmal Fellfarbe. Nach der zehnten Rückkreuzung zeigte sich ein adipöser Phänotyp, auf den dann nachfolgend weiter selektiert wurde. Bei histologischen Untersuchungen wurden morphologische Veränderungen im Pankreas festgestellt, die sich in einer veränderten Inselgröße und -anzahl widerspiegeln. 1965 konnten Cofford *et al.* zeigen, dass die NZO-Maus hyperglykämisch mit einer anormalen Glucosetoleranz ist [Cofford *et al.*, 1965]. In späteren Untersuchungen wurde belegt, dass dieses ingezüchtete polygene Mausmodell bereits in den ersten Lebenswochen Anzeichen einer Insulinresistenz sowohl im weißen als auch im braunen Fettgewebe und der Leber zeigt. Des Weiteren wurde eine hepatische Glucoseüberproduktion und eine gestörte „*first-phase*“ Insulinantwort beobachtet [Veroni *et al.*, 1991]. In den folgenden Jahren wurde die Forschung um die NZO-Maus intensiviert. Ortlepp *et al.* konnten im Jahr 2000 darlegen, dass die NZO-Maus wichtige Merkmale des humanen metabolischen Syndroms wie z.B. Bluthochdruck und erhöhte Cholesterin- und Insulinwerte aufweist und somit ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung des humanen metabolischen Syndroms darstellt [Ortlepp *et al.*, 2000]. Im direkten Vergleich der NZO-Maus mit der am nächsten Verwandten schlanken *New Zealand Black* (NZB)-Maus konnte beobachtet werden, dass die NZO-Maus eine reduzierte Körpertemperatur sowie eine positive Energiebilanz aufweist. Diese beruht auf einer erhöhten Nahrungsaufnahme und einer gesteigerten Nahrungsfrequenz, sowie einer erniedrigten Bewegungsaktivität [Juergens *et al.*, 2006]. In licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Entstehung des Diabetes zum einen mit einer Expansion an Inselzellmasse (Hyperplasie) und zum anderen mit morphologischen Veränderungen in den β -Zellen, ausgelöst durch immunologische Prozesse aufgrund einer erhöhten Infiltration von B-Lymphozyten, einhergeht [Junger *et al.*, 2002]. Wichtig ist jedoch zu erwähnen, dass bei der NZO-Maus die Hyperglykämie und Insulinresistenz bis hin zum Typ-2-Diabetes geschlechtsspezifisch auftritt. Die weiblichen Tiere sind vor der Entwicklung der Hyperglykämie und der Erkrankung an Diabetes geschützt, werden jedoch ebenfalls adipös.

Worauf dies beruht, konnte bis zum heutigen Tage nicht eindeutig geklärt werden, wobei ein hormoneller Einfluss als sehr wahrscheinlich gilt.

1.2.2 Die NZL-Maus: Ein neues alternatives Modell zur NZO-Maus?

Im Jackson-Labor wurde 2004 in der Gruppe um Edward Leiter durch Rückkreuzung der NZL/LtJ Stamm entwickelt. Das Genom der NZL-Maus besteht zu 3,12 % aus dem der NZB-Maus und zu 96,88 % aus dem der NZO-Maus. Genotypisiert wurde das Genom der NZL-Maus in einer F9-Generation mit 38 Microsatellitenmarkern und 116 SNPs. NZB-Fragmente konnten auf Chromosom 9 (34 - 103 Mb) und auf Chromosom 18 (55 - 80 Mb) detektiert werden [<http://jaxmice.jax.org/strain/005067.html>]. Wie für die NZO-Maus bekannt, entwickelt der NZL-Stamm ebenfalls eine Adipositas mit einer ausgeprägten Hyperglykämie. Die Prävalenz der Hyperglykämie ist in Lebenswoche 20 mit 79 % (Blutglucose > 250 mg/dl) höher als die erwarteten 50 % bei männlichen NZO-Tieren [McInerney *et al.*, 2004]. Damit unterscheidet sich die NZL-Wildtypmaus mit Ausnahme der höheren Hyperglykämie-Frequenz nicht von der NZO-Maus. Der größte Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen liegt in der angegebenen Reproduktionsrate der NZL-Maus. Während weniger als 40 % der NZO-Verpaarungen erfolgreich Nachkommen hervorbringen, liegt die Rate bei NZL-Verpaarungen deutlich höher bei fast 100 % [McInerney *et al.*, 2004].

1.3 Isolation von RNA aus den Langerhansschen Inseln

Aufgrund der stetig steigenden Anzahl an Diabeteserkrankten ist es von Bedeutung, mehr über die Biologie und Funktionsweise der Langerhansschen Inseln in Erfahrung zu bringen. Dies ist jedoch aus mehreren Gründen schwierig. Zum einen besteht das Pankreas sowohl aus dem Verdauungsenzyme sezernierenden exokrinen Teil als auch aus dem hormonproduzierenden endokrinen Teil, welcher die Langerhansschen Inseln beinhaltet. Bei einem gesunden Menschen sind ca. 1 Million Langerhanssche Inseln im Gesamtpankreas enthalten. Hierbei ist zu beachten, dass die Inseln unregelmäßig über das exokrine Parenchym, mit der höchsten Dichte im Pankreasschwanz, verteilt sind und ca. 1 - 2 % der Gesamtpankreaszellen darstellen. Zum anderen bestehen die Langerhansschen Inseln selbst aus verschiedenen Zelltypen. Sie sind zu 68 % aus Insulin produzierenden β -Zellen und zu 20 % aus Glucagon produzierenden α -Zellen zusammengesetzt. Die Somatostatin sezernierenden δ -Zellen umfassen ca. 10 % der Zellen. Schließlich enthalten die Inselzellen noch ca. 2 % *pancreatic polypeptide* produzierende PP-Zellen [Bishop *et al.*, 1997]. Um die Funktionsweise der Inselzellen genauer untersuchen zu können, müssen diese isoliert

betrachtet werden. Dies geschieht in den meisten Fällen durch einen Kollagenaseverdau des Gesamtpankreas, woran angeschlossen die Inselzellen unter dem Mikroskop manuell verlesen werden [Panten *et al.*, 2008]. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass es durch das Auflösen des Gewebeverbandes inklusive der sauerstoffliefernden Blutversorgung zu nicht vernachlässigbaren Veränderungen im Metabolismus der Inselzellen kommt, die Einfluss auf die Expression von Stress-, Apoptose- und Hypoxie-Markern haben [Marselli *et al.*, 2007]. Eine Alternative zu isolierten Langerhansschen Inseln ist die Verwendung von Modellzelllinien. Dabei ist von Bedeutung, dass die verwendete Zelllinie möglichst viele Eigenschaften der nativen Inselzellen wie z.B. kontrollierte Insulinexpression und -prozessierung sowie die Glucose stimulierte Insulinsekretion (GSIS) innehat. Da dies bei herkömmlichen Zelllinien nicht gegeben ist, werden häufig Insulinoma-Tumorzelllinien verwendet (z.B. Min6-Zellen GSIS positiv, Min7-Zellen GSIS negativ). Die Verwendung von Modellzelllinien kann die native Situation jedoch nie zu 100 % widerspiegeln, sodass wichtige Kernbefunde daher immer mit alternativen Methoden (z.B. mit Primärzellen) abgesichert werden müssen [Hohmeier *et al.*, 2004].

1.3.1 Laser Capture Microdissection

Alternativ zu Modellzelllinien und kollagenaseverdauten Inselzellen besteht die Möglichkeit, durch laserbasierte Mikropräparation Inselzellgewebe aus Gewebeschnitten zu isolieren. Mitte der neunziger Jahre wurde die Methode der „*laser capture microdissection*“ (LCM) am *National Institute of Health* (NIH) zur Untersuchung von Tumoren entwickelt [Emmert-Buck *et al.*, 1996]. Hierbei ist es möglich unfixierte oder nur kurz anfixierte Gewebeschnitte (Gefrierschnitte) zur Isolation zu verwenden. Häufig werden die Schnitte einer Einschnitt-Färbetechnik (z.B. mit *Cresyl Violet Stain*) unterzogen, um die Gewebestrukturen besser sichtbar bzw. abgrenzbar zu machen. Die zu isolierenden Gewebeareale werden mit Hilfe eines Mikroskops visualisiert und mittels Software markiert. Anschließend wird dieses Areal durch einen Laser abgetrennt und durch einen abschließenden Laserpuls aus dem Gewebeverband herausgelöst [Todd *et al.*, 2002; Murray, 2007]. Heutzutage kommt die Technik der LCM nicht nur bei der Untersuchung von Tumoren zum Einsatz sondern auch bei der Isolation einzelner Zelltypen aus einem komplexen Gewebe [McClain *et al.*, 2005, Espina *et al.*, 2007]. Um die Biologie und vor allem genregulatorische Prozesse innerhalb der Langerhansschen Insel besser verstehen zu können, wurden einige Studien an isolierten Inselzellen durchgeführt und deren Genexpression mit durch Kollagenaseverdau gewonnenen Inselzellen verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe der LCM-Technik möglich ist, aus gefrorenen Pankreasschnitten hoch angereichertes Inselzellmaterial zu gewinnen, welches auf Genexpressionsebene eine deutlich geringere

Stressantwort zeigt als beim herkömmlichen Kollagenaseverdau. Somit handelt es sich bei LCM um eine schonendere Methode zur Gewinnung von RNA aus den Langerhansschen Inseln [Ahn *et al.*, 2006, Marselli *et al.*, 2008].

1.4 Arraybasierte Genomanalysen

In den neunziger Jahren wurden die sogenannten „Omics“-Technologien (z.B. *Proteomics*) entwickelt. Im Folgenden soll näher auf die Terminologie und Entwicklung von Studien der mRNA Expression, den so genannten *Transcriptomics*, eingegangen werden. Hierbei werden Unterschiede zwischen verschiedenen Bedingungen wie zum Beispiel *Knockout*-Tier gegen Wildtyp-Tier (z.B. B6.V-Lep^{ob/ob} vs. B6.V-Lep^{+/+}), die Expressionsmuster verschiedener Gewebe generell (z.B. Muskel vs. Fettgewebe) oder die eines Gewebes unter bestimmten Bedingungen (z.B. Leber Hochfett-Diät vs. Leber Standarddiät) untersucht, um sich ein Gesamtbild über die mRNA-Expression in der zu untersuchenden Probe zu machen [Sun *et al.*, 2007]. Erreicht wird dies durch Hochdurchsatzanalysen, wobei es das Ziel ist, sowohl Zeit als auch Probenmaterial sparend auf engstem Raum die Expression möglichst vieler Nukleinsäuresequenzen gleichzeitig zu untersuchen [Garosi *et al.*, 2005]. Aus diesem Grund wurde von der herkömmlichen Mikrotiterplatte über den Macroarray schließlich der Microarray entwickelt. Der so genannte Macroarray unterscheidet sich vom Microarray dadurch, dass hier meist eine Membran als Trägermaterial verwendet wird, auf welche die zu untersuchenden DNA-Sonden aufgetragen werden, mit Hilfe derer die radioaktiv markierte cDNA detektiert werden kann. Im Gegensatz dazu wird beim Microarray meist Glas als Trägermaterial verwendet, und die Expressionsintensität mit Hilfe von Fluoreszenz ermittelt. Der größte Unterschied zwischen den beiden Arrayarten ist jedoch die Probenanzahl, die beim Macroarray (einige hundert Gene) deutlich unter der des Microarrays (mehrere tausend Gene) liegt [Herwig *et al.*, 2001].

Seit 1995 zum ersten Mal der Begriff Biochip in einer Publikation erwähnt wurde, steigt die Anzahl der Publikationen mit der Verwendung von Arrays oder Biochips stetig [Müller, 2004; Rogers *et al.*, 2007]. Prinzipiell muss man zwischen verschiedenen Arrayarten unterscheiden. Je nach Fragestellung gibt es Proteinarrays für Proteomanalysen (*Proteomics*) oder aber DNA/ RNA-Arrays wie die kürzlich entwickelten Exon-Arrays für Transkriptomanalysen. Allen gemein ist das Grundprinzip, dass auf einem festen Träger (z.B. Glas) die gewünschten, je nach Array unterschiedlich langen, Oligonukleotide aufgebracht werden, welche dann mit der zu untersuchenden Probe hybridisiert werden. Wichtig dabei ist, dass einer der beiden Partner eine Markierung trägt, sodass anschließend eine quantitative Auswertung möglich ist. Bei den DNA/ RNA-basierten Arrays kann man hier zwischen drei Gruppen unterscheiden: Den „*short oligonucleotides*“ (Fa. Affymetrix) mit

25 Basenpaaren (bp), den „*long oligonucleotides*“ (Fa. Agilent, Fa. Illumina, Fa. Amersham) mit 50 - 80 bp und den „*spotted-cDNA amplicons*“ (NIA). Jeder dieser Arrays hat für sich genommen Vor- (z.B. Vergleichbarkeit der Arrays untereinander) und Nachteile (z.B. Preis), die für den jeweiligen Versuch abgewogen werden müssen [Page *et al.*, 2007].

1.4.1 Aufbau und Herstellung von Microarrays

In der vorliegenden Arbeit wurde der Affymetrix-Biochip 430 2.0 verwendet. Hierbei handelt es sich um den ersten Gesamtgenom-Array für die Maus bestehend aus 45101 Sondenpaaren, so genannten *Probesets* (z.B. 1448898_at), die aus den Datenbanken „GenBank[®]“, dbEST und RefSeq“ erstellt wurden. Die „*sequence cluster*“ basieren auf der UniGene Datenbank „*Build 107*“, Juni 2002. Im Allgemeinen wird jedes einzelne Gen auf einem Affymetrix GeneChip[®] durch 11 - 20 Sondenpaaren dargestellt. Jedes dieser Sondenpaare besteht aus einem 25 bp „*perfect match*“ (PM) und einem entsprechenden „*mismatch*“ (MM)-Oligomer, welches sich in der mittleren Base von dem der PM-Sonde unterscheidet. Die 25 bp Nukleinsäuresequenzen werden in einem photolithographischen Verfahren aufgebaut (Abb. 1). Dieses geht von einem 5 Zoll² großen Quarz-Wafer aus, welcher mit einer Silanschicht überzogen wird, um eine stabile Oberfläche mit Hydroxyalkylgruppen zu schaffen. An diese werden kovalent lichtsensitive Schutzgruppen gebunden, die sich durch Licht abspalten lassen. In den folgenden Schritten werden durch photolithographische Masken abhängig von der Sequenzinformation einzelne Linker durch UV-Licht aktiviert. Dabei werden die terminalen Hydroxylgruppen der Linkermoleküle entschützt und für die Kopplung eines Nukleotides aktiviert. Abschließend wird ein Desoxynukleosid mit lichtsensitiver Schutzgruppe angeknüpft. Dieses Verfahren wird so lange wiederholt, bis alle 25 Basen der DNA-Oligomere aufgebaut sind. Je nach Chiptyp können aus einem 5 Zoll² Wafer zwischen 49 und 400 identische Genechips gewonnen werden [Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006; <http://www.affymetrix.com>].

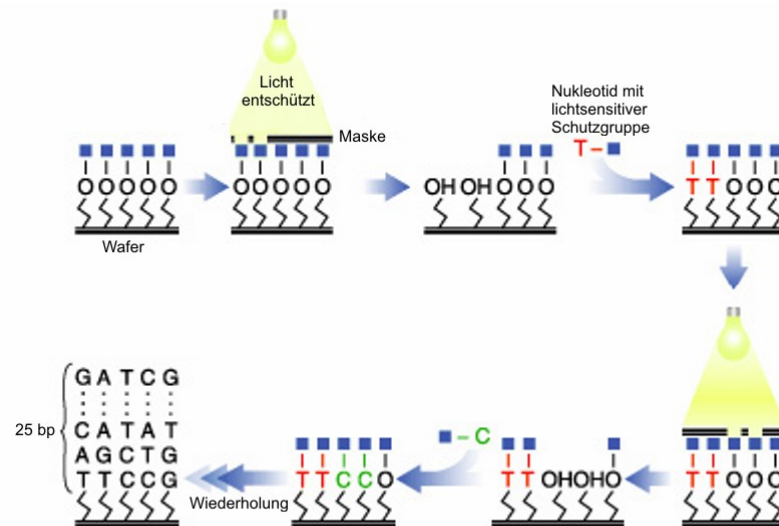


Abb. 1: Photolithographisches Verfahren zur Herstellung von Affymetrix GeneChips®

Die 25-iger Oligomere werden schrittweise aufgebaut, indem durch photolithographische Masken abhängig von der Sequenz einzelne Bereiche entschützt werden. An diese können dann Nucleotide mit lichtsensitiver Schutzgruppe binden. Dies wird solange wiederholt, bis das *probeset* (25 bp) vollständig synthetisiert ist. Dadurch ist es möglich, innerhalb einer Charge identische Arrays herstellen zu können [<http://www.affymetrix.com>].

1.4.2 Array Hybridisierung

Um Expressionsuntersuchungen durchführen zu können, muss in einem ersten Schritt aus dem zu untersuchenden Gewebe/ Zellen die RNA gewonnen werden. In den nachfolgenden Schritten (Abb. 2) wird die aufgereinigte RNA in einer *in vitro*-Transkription amplifiziert und markiert. Dabei werden biotinylierte Nucleotide oder Nucleotidanaloga zur Markierung der RNA eingebaut. Nach der hydrolytischen Fragmentierung der markierten cRNA werden mit dieser die Arrays hybridisiert. Dies geschieht je nach verwendetem Array in einem mehrstündigen Prozess. Anschließend werden die Arrays gewaschen und gefärbt. Dabei wird ein fluoreszierendes Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat aufgebracht, welches an die inkorporierten Biotinreste bindet. Hierbei handelt es sich um einen der schwierigsten Schritte, um untereinander vergleichbare Biochips zu erhalten. Nach dem Waschen und Färben werden abschließend mittels eines Lasers die Fluoreszenzintensitäten aus dem fertigen Array ausgelesen (*scanning*), aus denen softwarebasiert ein numerischer Wert errechnet wird [Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; <http://www.affymetrix.com>].

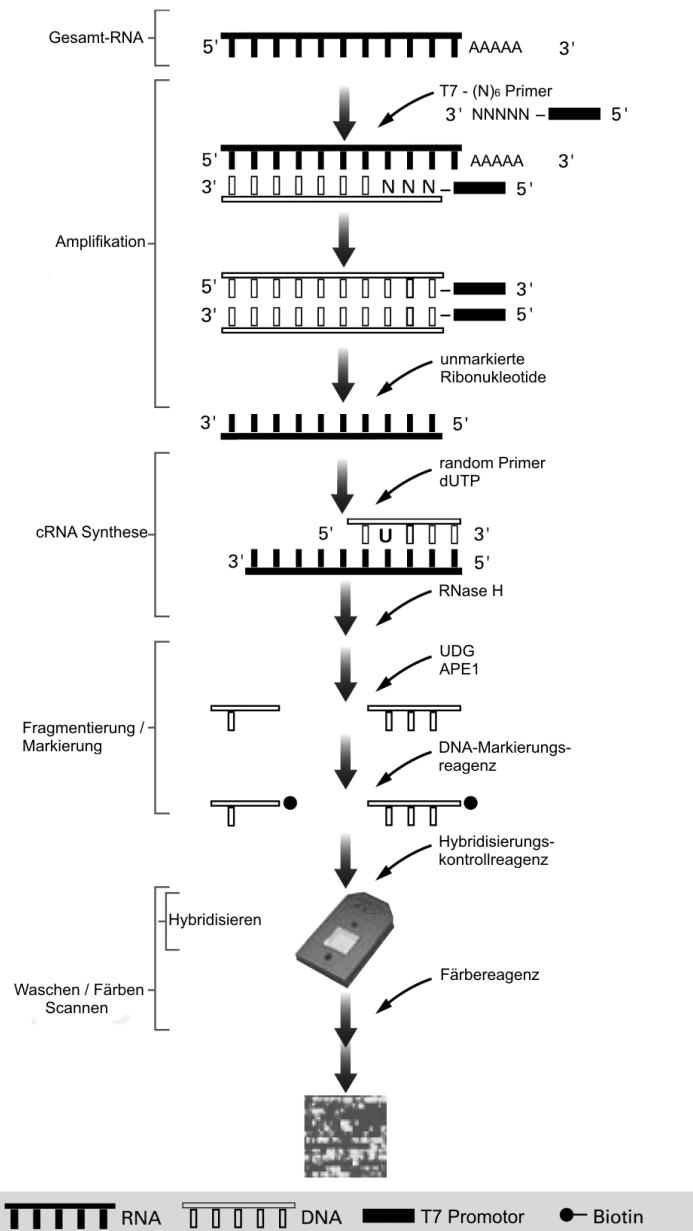


Abb. 2: Probenvorbereitung für die Expressionsanalyse mittels Affymetrix GeneChips®

Gezeigt sind die Einzelschritte mit Amplifikation der zu untersuchenden RNA-Probe, anschließender cRNA-Synthese, Fragmentierung sowie Biotin-Markierung der zu untersuchenden Probe. Daran angeschlossen wird der Array hybridisiert, gewaschen, gefärbt und abschließend mittels eines Lasers ausgelesen [<http://www.affymetrix.com>].

1.4.3 Auswertung von Microarrays

Um ein Microarrayexperiment sinnvoll auswerten zu können, muss man berücksichtigen, dass es sowohl eine biologische Varianz als auch eine technische Varianz der Signale gibt. Dem muss durch mehrere vorverarbeitende Schritte Rechnung getragen werden. Hierbei ist es möglich, aus zahlreichen sowohl kommerziell erhältlichen als auch frei verfügbaren Softwarepaketen zu wählen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung der Skriptsprache „R“ inklusive der dazugehörigen „R-Pakete“. Beides ist über das *Bioconductor*-Projekt

erhältlich [Gentleman *et al.*, 2004; Steinhoff *et al.*, 2006; <http://www.bioconductor.org>]. Eine solche Arrayanalyse setzt sich immer aus mehreren aufeinander aufbauenden Schritten (z.B. optische und chemische Hintergrundkorrektur, Normalisierung, PM-Korrektur, Kondensationsreaktion) zusammen, ist jedoch abhängig vom verwendeten Arraytyp und der Fragestellung des Experiments stark variabel [Rasche *et al.*, 2008].

Die vorverarbeiteten Daten können anschließend auf Einzelgenebene analysiert werden, um differenziell exprimierte Kandidatengene zu identifizieren. Weitere Möglichkeiten für die Auswertung bieten so genannte *Pathway*-Analysen oder Cluster-Analysen bei denen ganze Stoffwechselwege bzw. Gengruppen betrachtet werden [Lee *et al.*, 2007; Wiltgen *et al.*, 2007; Okuda *et al.*, 2008]. Des Weiteren können Modellierungen zu bestimmten Stoffwechselsituationen durchgeführt oder die Daten in sogenannten Meta-Analysen mit anderen verfügbaren Daten verglichen werden [Herwig *et al.*, 2006].

Schließlich sollten Befunde aus Microarrayexperimenten mit einer unabhängigen Methode, wie zum Beispiel der quantitativen *Real-Time-PCR*, validiert werden [Hoebeek *et al.*, 2007].

1.5 Zielsetzung

Übergewicht und Adipositas erhöhen in einem erheblichen Maß das Risiko für Typ-2-Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen. Die molekularen Mechanismen dieser ernährungsbedingten Erkrankungen, die relevanten Suszeptibilitätsgene und deren Interaktion mit der Umwelt, insbesondere mit Komponenten aus der Nahrung, sind nicht vollständig verstanden. In der vorliegenden Arbeit sollte durch Genexpressionsanalysen die Entstehung und Progression von Adipositas und Typ-2-Diabetes untersucht werden, um relevante Pathomechanismen und neue Kandidatengene für diese Erkrankungen zu identifizieren. Dazu sollten folgende Experimente durchgeführt werden:

(1) Diät-Interventionsstudien mit NZO- und verwandten NZL-Mäusen, zwei polygenen Mausmodellen für das humane metabolische Syndrom, bei denen die Tiere einer kohlenhydrathaltigen Hochfett-Diät (HF) ausgesetzt werden, die zu früher Adipositas, Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes führt. Eine Standarddiät (SD, geringer Fettanteil), welche die Entstehung von Adipositas und Diabetes stark verzögert, und eine diabetesprotektive kohlenhydratfreie Hochfett-Diät (CHF) sollten als Kontrolldiäten dienen und Einblicke in die Bedeutung der diätischen Kohlenhydrate für die Diabetesentwicklung erlauben.

(2) Mit Hilfe der Microarray-Technologie sollten genomweite Expressionsprofile des, für den Energiestoffwechsel wichtigen, weißen Fettgewebes erstellt werden, bei denen die Genexpression zeit- und diätabhängig (1 - 9 Wochen Intervention, HF vs. SD) bestimmt werden sollte.

(3) Für Untersuchungen der Langerhansschen Inseln im Verlauf der Diabetesentwicklung sollte die laserbasierte Mikropräparation (*Laser Capture Microdissection*) etabliert werden, um hochangereichertes Inselgewebe aus Gesamtpankreas zu isolieren.

(4) Es sollten genomweite Expressionsprofile des Insulin produzierenden Inselgewebes zu einem frühen Zeitpunkt in der Diabetesentwicklung erstellt werden, an welchem die Genexpression zwischen der diabetogenen HF- und der diabetesprotektiven CHF-Diät verglichen werden sollte.

(5) Die Kernbefunde (z.B. Kandidatengene und Stoffwechselwege) aus den Microarray gestützten Untersuchungen sollten, wenn möglich, mit unabhängigen Methoden (z.B. *Real-Time-PCR* und Immunhistochemie) validiert werden. Zudem sollten die aus einem polygenen Mausmodell stammenden Ergebnisse mit bisher gewonnenen Daten aus monogenen Modellen (zumeist *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen) und Befunden aus humangenetischen Untersuchungen an Kollektiven (Kandidatengene aus Assoziationsstudien) verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die der Arbeit zugrunde liegenden NZO-Mäuse wurden im Max Rubner Laboratorium (MRL) gezüchtet. Die NZL-Zuchtmäuse wurden vom Jackson Laboratorium (Bar Harbor, USA) bezogen und dann ebenfalls im MRL für die einzelnen Versuchszwecke gezüchtet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Versuche wurden durch das Ministerium für ländliche Entwicklung, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Brandenburg unter dem Geschäftszeichen 32-44457+36 genehmigt.

2.1.2 Synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer)/ TaqMan-Sonden

Tab. 1: TaqMan-Sonden für die *Real-Time-PCR* (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt)
ABI-ID: Sondenbezeichnung

Symbol	Beschreibung	ABI-ID
<i>Actb</i>	<i>actin, beta</i>	Mm00607939_s1
<i>Cacna1d</i>	<i>calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit</i>	Mm00551384_m1
<i>Cck</i>	<i>cholecystokinin</i>	Mm00446170_m1
<i>Clip2</i>	<i>CAP-GLY domain containing linker protein 2</i>	Mm00515608_m1
<i>Dach1</i>	<i>dachshund 1 (D. melanogaster)</i>	Mm00492069_m1
<i>Foxo1</i>	<i>forkhead box O1</i>	Mm00490672_m1
<i>Gcg</i>	<i>glucagon</i>	Mm00801712_m1
<i>GLUT2</i>	<i>solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2</i>	Mm00446224_m1
<i>Igf2bp2</i>	<i>insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2</i>	Mm00805575_m1
<i>Ins</i>	<i>insulin I</i>	Mm01259683_g1
<i>Me1</i>	<i>malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic</i>	Mm00782380_s1
<i>Mxipl</i>	<i>MLX interacting protein-like</i>	Mm00498811_m1
<i>Pcsk2</i>	<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 2</i>	Mm00500981_m1
<i>Pdia3</i>	<i>protein disulfide isomerase associated 3</i>	Mm00433130_m1
<i>Pklr</i>	<i>pyruvate kinase liver and red blood cell</i>	Mm00443090_m1
<i>Plekha1</i>	<i>pleckstrin homology domain containing, family A member 1</i>	Mm00505884_m1
<i>Scd1</i>	<i>stearoyl-Coenzyme A desaturase 1</i>	Mm00772290_m1
<i>Sil1</i>	<i>endoplasmic reticulum chaperone SIL1 homolog (S. cerevisiae)</i>	Mm00473010_m1
<i>SREBP-1</i>	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>	Mm00550338_m1
<i>Tmem27</i>	<i>transmembrane protein 27</i>	Mm00451603_m1
<i>Tspam8</i>	<i>tetraspanin 8</i>	Mm00524563_m1
<i>Txnip</i>	<i>thioredoxin interacting protein</i>	Mm00452393_m1

Tab. 2: Verwendete Oligonukleotid-Primer

Die Primer wurden von Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim (Sigma) und Eurofins MWG Operon, Ebersberg (MWG) bezogen. for: *forward* Primer; rev: *reverse* Primer; probe: fluoreszenzmarkiert

Symbol	Sequenz	Firma
<i>Chd2 for</i>	5'-TGACCAGGAATTACAAGGCTC-3'	MWG
<i>Chd2 rev</i>	5'-GCACTTTTTTCAGCTCCATCAC-3'	MWG
<i>Chd2 probe</i>	5'-AGAGGCAGCACATCTGGCTTCCTTA-3'	MWG
<i>Ldlrad3 for</i>	5'-CAGCGAAAGCGAAACAAC-3'	MWG
<i>Ldlrad3 rev</i>	5'-GTAGCCACATACTGAACACC-3'	MWG
<i>Ldlrad3 probe</i>	5'-ACCCTCACCCTGCAACGTCACCTACAA-3'	MWG
<i>18S rRNA for</i>	5'-TGAGGCCATGATTAAGAGGG-3'	Sigma
<i>18S rRNA rev</i>	5'-AAGAATTTACCTCTAGCGGC-3'	Sigma
<i>Uqcrc2 for</i>	5'-GTCAGAGGGCTTCCTGAGTG-3'	Sigma
<i>Uqcrc2 rev</i>	5'-ACTCGTCGAGAAAAGGCGTA-3'	Sigma
<i>Cox8a for</i>	5'-ATCACCATTGGGCTCACTTC-3'	Sigma
<i>Cox8a rev</i>	5'-CGAGAGGTCATGATTGCAGA-3'	Sigma
<i>Cox8b for</i>	5'-ACATTCAGGGTGCCCTTTTG-3'	Sigma
<i>Cox8b rev</i>	5'-GAACCATGAAGCCAACGACT-3'	Sigma
<i>Atp6v1b2 for</i>	5'-CCACCTGTGAGTGGGAGTTT-3'	Sigma
<i>Atp6v1b2 rev</i>	5'-TTGGGAGACCCAAACAAGAC-3'	Sigma
<i>Atp6v0d2 for</i>	5'-GACCCTGTGGCACTTTTTGT-3'	Sigma
<i>Atp6v0d2 rev</i>	5'-GCTTGCATTTGGGGAATCTA-3'	Sigma
<i>ND2 for</i>	5'-AGGGATCCCACTGCACATAG-3'	Sigma
<i>ND2 rev</i>	5'-TGAGGGATGGGTTGTAAGGA-3'	Sigma

2.1.3 Reaktionskits

Alle verwendeten Kits wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Herstellerangaben verwendet.

Tab. 3: Verwendete Reaktionskits

Reaktionskit	Firma
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce, Rockford, IL, USA
<i>BigDye[®] Terminator v 3.2 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>CHOL-H L-Type 20R/30R</i>	Wako Chemicals, Neuss
<i>DNeasy[®] Blood & Tissue Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Free Glycerol Reagent</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
<i>GeneChip[®] One-Cycle Target Labeling and Control</i>	Affymetrix, Buckinghamshire, UK
<i>GenElute PCR Clean-Up Kit</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf
<i>Insulin Mouse Ultrasensitive ELISA</i>	DRG Instruments GmbH, Marburg
<i>Mouse Endocrine LINCoplex Kit</i>	LINCO/ Millipore, Schwalbach
<i>NEFA C</i>	Wako Chemicals, Neuss
<i>OxyBlot[™] Protein Oxidations Detection Kit</i>	Chemicon/ Millipore, Schwalbach
<i>peqGOLD RNAPure[™]- Systems</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>RNA 6000 Nano Chip Kit</i>	Agilent Technologies, Waldbronn
<i>RNase-Free DNase Set</i>	QIAGEN, Hilden
<i>RNeasy[®] Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>RNAqueous[®] Micro Kit</i>	Ambion/ Applied Biosystems, Darmstadt
<i>TransPlex[®] Whole Transcriptome Amplification Kit</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf
<i>WT-Ovation[™] Pico RNA Amplifications System</i>	NuGENE, Bommel, NL

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Haltungsbedingungen

Die tierexperimentellen Versuche erfolgten unter den von der *Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA)* vorgegebenen Vorschriften im MRL bei einer Raumtemperatur von 20 ± 2 °C, einer relativen Luftfeuchte von 50 - 60 % und einem konstanten Licht-Dunkel-Regime (Licht von 6.00 bis 18.00 Uhr). Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen Typ II oder Typ III (Fa. EBECO, Castrop-Rauxel) auf entstaubten Weichholzfasern gehalten. Die Käfige waren mit Edelstahlgittern mit integrierter Futterraufe verschlossen, sodass die Tiere jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser hatten. Die untersuchten Jungtiere wurden drei Wochen nach der Geburt von der Mutter getrennt und auf die jeweiligen Diäten geschlechtsspezifisch abgesetzt. Wurfgeschwister wurden auf die verschiedenen zu untersuchenden Diäten verteilt.

2.2.2 Diätische Intervention

Um den Einfluss der Nahrung auf die Genexpression zu untersuchen, wurden verschiedene Diäten (Tab. 4) verwendet.

Tab. 4: Zusammensetzung der verwendeten Diäten

Bei den Angaben handelt es sich um die vom Hersteller angegebene Zusammensetzung.

ME: metabolisierbare Energie

Standard-Kontrolldiät (SD; Ssniff, Soest):

Inhaltsstoffe	Anteil im Futter (% w/w)
Rohprotein	19,0
Rohfett	3,3
Rohfaser	4,9
Rohasche	6,4
N-freie Extraktstoffe	54,1
Stärke	36,5
Zucker	4,7
ME	12,8 MJ/kg

Hochfett-Diäten (Altromin, Lage):

Inhaltsstoffe	fettreiches Futter (HF) Typ C1057	fettreiches kohlenhydratarmes Futter (CHF) Typ C1057 Sonderdiät
	Anteil im Futter (% w/w)	Anteil im Futter (% w/w)
Rohprotein	17,1	26,4
Rohfett	14,6	30,2
Rohfaser	5,1	32,4
Rohasche	6,6	5,8
Wasser	6,3	3,5
Monosaccharide	5,7	--
Polysaccharide	26,8	--
ME	15,3 MJ/kg	15,3 MJ/kg

Nicht angegeben sind die im Futter enthaltenen Mineralstoffe, Spurenelemente, Vitamine und Aminosäuren.

2.2.3 Phänotypische Charakterisierung

2.2.3.1 Bestimmung der Körpermaße und der Körperzusammensetzung

Das Körpergewicht der Tiere wurde ab Lebenswoche 4 wöchentlich bis zum jeweiligen Versuchsende mit einer elektronischen Waage (Fa. Sartorius, Göttingen) bestimmt. Die Körperzusammensetzung, d.h. der Gehalt an Körperfett, die fettfreie Masse und die freie Körperflüssigkeit, wurde jeweils nach der Körpergewichtsbestimmung mittels NMR ermittelt. Dabei wurde für die NZO-Tiere ein Bruker-Minispec NMR-Analyser mq10 Kernresonanzspektrometer (Fa. Bruker, Karlsruhe) verwendet. Für die NZL-Mäuse wurde der EchoMRI™ Whole Body Composition Analyzer (Fa. Echo MRI, Houston, TX, USA) eingesetzt.

Die Bestimmung der Körperlänge erfolgte bei Versuchsende im hängenden Zustand nach der Herzpunktion. Hierfür wurden die Tiere auf einer Korkunterlage fixiert und deren Länge auf Millimeterpapier vermessen.

2.2.3.2 Bestimmung der Blutglucosewerte und der Plasmaparameter

Die Blutglucose der Tiere wurde wöchentlich im nicht-gefasteten Zustand morgens zwischen 8.00 und 10.00 Uhr bestimmt. Hierfür wurde eine Schwanzvenenpunktion durchgeführt und mit Hilfe des Ascensia® ELITE Blutzuckermessgeräts (Fa. Bayer, Leverkusen) die Blutglucose im Vollblut bestimmt. Hierbei beruht das Messprinzip auf der Reaktion der Glucose mit der FAD-Glucosehydrogenase und dem Kaliumhexacyano-(III)-ferrat im Sensorblättchen. Der dadurch entstehende Elektronenfluss ist proportional zum Glucosegehalt in der Probe.

Zur Bestimmung verschiedener Plasmaparameter wurde am jeweiligen Versuchsende (Lebenswoche 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 17 und 22) im nicht-gefasteten Zustand eine Herzpunktion zur finalen Blutentnahme durchgeführt.

2.2.3.3 Intraperitonealer Glucosetoleranztest (*i.p.* GTT)

Zur Durchführung eines *i.p.* GTT wurden die Mäuse für 16 h gefastet, hatten jedoch über den gesamten Versuchszeitraum freien Zugang zum Trinkwasser. Nach dem Fasten wurde zur anschließenden Bestimmung der Nüchtern-Blutglucose und des Nüchtern-Plasmainsulins aus der Schwanzvene eine Nullwert-Blutprobe entnommen. Im direkten Anschluss wurde jeder Maus eine Einmaldosis 20 %-iger Glucoselösung in Abhängigkeit des Körpergewichtes *i.p.* injiziert (2,0 g 20 %-ige Glucoselsg./kg KG). Zu den Zeitpunkten 7,5, 15, 30, 60, 120 und 240 min wurde die Blutglucose und die Insulinkonzentration bestimmt. Zur Gewinnung des Plasmas aus dem Vollblut wurden die Mikromonovetten unmittelbar nach der Blutentnahme bei 4 °C für 5 min bei 13000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und auf Trockeneis schockgefroren. Bis zur Analyse wurde das Plasma bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Tötung der Tiere und Gewebeentnahme

Zur Gewebeentnahme wurden die Tiere mit Diethylether anästhesiert, durch eine Herzpunktion entblutet und anschließend durch eine zervikale Dislokation getötet.

Das Blut wurde in 4,5 ml S-EDTA-Monovetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen und bei 4 °C für 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert (Fa. Heraeus, Varifuge 3.0 R, Kendro, Langenselbold). Der Plasmaüberstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Für weitere Versuche wurde den Tieren das weiße epididymale Fettgewebe (WAT), die Leber sowie das Pankreas entnommen. Die Gewebe wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C gelagert.

Zur histologischen Untersuchung wurden Teile der Leber sowie des Pankreas 24 h in einer 4,5 %-igen Paraformaldehydlösung fixiert.

Für den LCM-Versuch wurden die ganzen Pankreata sofort nach der Tötung auf Trockeneis gefroren und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Gesamt-DNA

Um Gesamt-DNA aus dem Fettgewebe zu isolieren wurde das DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Fa. QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden jeweils 20 - 30 mg weißes Fettgewebe eingesetzt. Die Konzentration der isolierten DNA wurde wie in 2.3.3 beschrieben bestimmt und die DNA bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA

DEPC-H₂O:

1 ml DEPC
ad 1000 ml ddH₂O

2.3.2.1 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus weißem Fettgewebe

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus dem weißen Fettgewebe, wurde das QIAzol[™]-Reagenz (Fa. QIAGEN, Hilden) in Kombination mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Fa. QIAGEN) verwendet. 100 - 300 mg weißes Fettgewebe wurden mit 1,0 ml QIAzol[™]-Reagenz versetzt und mit dem Ultrathurrax Polytron PT 1200 C (Fa. KINEATICA, Schweiz) ca. 30 s homogenisiert. Die entstandene Suspension wurde 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Probe kräftig geschüttelt. Danach wurde erneut für 3 min bei RT inkubiert. Die Mischung wurde bei 4 °C für 15 min bei 16100 x g (Biofuge Pico; Fa. Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Aus der oberen wässrigen Phase wurden 600 µl entnommen und mit gleichen Teilen Ethanol (75 %, v/v) vermischt. Zur weiteren Aufreinigung wurde das RNeasy[®] Mini Kit (Fa. QIAGEN) nach Herstellerangaben verwendet.

Da die RNA aus dem weißen Fettgewebe später zur Array Analyse verwendet werden sollte, wurde während der Isolation ein DNase-Verdau auf der Säule (siehe 2.3.4) durchgeführt. Zur Elution der RNA wurden 40 µl DEPC-H₂O verwendet. Die Konzentrationsbestimmung und Lagerung der RNA erfolgte wie unter 2.3.3 beschrieben.

2.3.2.2 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Lebergewebe

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Mäuselebern beruht auf der kombinierten Guanidinisothiocyanat-Phenol-Methode [Chomczynski *et al.*, 1987] unter Verwendung des peqGOLD RNAPure[™]-Systems (Fa. PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen).

50 - 70 mg Lebergewebe wurden in flüssigem Stickstoff zerkleinert und mit 1,0 ml peqGOLD RNAPure[™] versetzt. Das Gemisch wurde mit dem Ultrathurrax homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Zur entstandenen Suspension wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben. Die Probe wurde für 15 s kräftig geschüttelt und anschließend erneut für 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine

Zentrifugation bei RT für 5 min bei 16100 x g. Aus der oberen wässrigen Phase wurden 600 µl abgenommen und mit 500 µl Isopropanol gemischt. Die RNA wurde in einem 15-minütigen Inkubationsschritt (RT) gefällt und anschließend bei 4 °C für 10 min bei 16100 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das so erhaltene Pellet mit 100 µl Ethanol (75 %, v/v) gewaschen. Nachfolgend wurden erneut 900 µl Ethanol (75 %, v/v) zur Probe gegeben, kurz gemischt und bei 4 °C für 10 min bei 16100 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und der Waschschrift wiederholt. Nachdem der Ethanol vollständig entfernt worden war, wurde das Pellet in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung und Lagerung erfolgte wie unter 2.3.3 beschrieben.

2.3.2.3 Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Pankreasgewebe

Wegen des hohen Gehalts an Ribonukleasen erfolgte die Aufreinigung der Gesamt-RNA aus dem Pankreasgewebe durch eine Kombination von Guanidinthiocyanat mit β-Mercaptoethanol [Chirgwin *et al.*, 1979]. Die Extraktion und Aufreinigung der Nukleinsäuren erfolgte laut Herstellerangaben des RNeasy[®] Mini Kit (Fa. QIAGEN, Hilden). Es wurden jeweils 30 - 70 mg Pankreasgewebe je Probe eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung und Lagerung erfolgte wie unter 2.3.3 beschrieben.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde das NanoDrop ND-1000 der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH eingesetzt. Hierfür wurden jeweils 1,2 µl DNA- oder RNA-Lösung vermessen. Als Nullwert diente DEPC-H₂O. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die DNA-Proben bei -20 °C und die RNA-Proben bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.3.4 Verdau von genomischer DNA

Da die isolierte RNA teilweise für Gene Chip-Experimente verwendet wurde, musste eine Kontamination mit genomischer DNA vermieden werden. Aus diesem Grund wurde die RNA des Fettgewebes während der Isolation mit Hilfe des RNase-Free DNase Set der Firma QIAGEN behandelt. Der Verdau wurde wie vom Hersteller empfohlen auf der Säule durchgeführt.

2.3.5 Amplifikation von isolierter Inselzell-RNA

Um die Menge an isolierter RNA aus dem Gewebe der Langerhansschen Inseln für die Analyse mit der quantitativen *Real-Time*-PCR zu erhöhen, wurde das *TransPlex[®] Whole Transcriptome Amplification* Kit der Firma Sigma nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurden 20 - 50 ng RNA pro Reaktion eingesetzt. Das Prinzip des Kit beruht darauf, dass in einem ersten Schritt die RNA mittels Reverser Transkriptase in eine *Omniplex[®] cDNA library* umgeschrieben wird. Diese wird in einer anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert. Das erhaltene Produkt wurde wie, in 2.3.6 beschrieben, aufgereinigt. Anschließend wurde die Konzentration, wie in 2.3.3. beschrieben, ermittelt und die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.6 Aufreinigung der amplifizierten cDNA

Zur Aufreinigung der amplifizierten cDNA wurde das *GenElute™ PCR Clean-Up* Kit (Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf) verwendet. Dies ermöglicht eine schnelle Entfernung im Überschuss zugegebener Faktoren aus der amplifizierten cDNA ohne großen Verlust des Produktes. Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.7 Erststrang-cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung der SuperScript™ III Reverse Transkriptase (Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Die Synthese erfolgte nach Vorgaben des Herstellers. Für die cDNA-Synthese aus Leber- oder Pankreas-RNA wurden jeweils 2,0 µg RNA, für die cDNA-Synthese aus weißem Fettgewebe nur 1,0 µg RNA eingesetzt.

2.3.8 Amplifikation von DNA mittels *Polymerasekettenreaktion (PCR)*

Zur spezifischen Amplifikation eines DNA-Fragmentes aus einem Nukleinsäuregemisch wurde die PCR [Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986] verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit spezifischen Primern (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim), dNTPs (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) und einer thermostabilen DNA-Polymerase (JumpStart™ RED AccuTaq™, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim).

Die Primer wurden mit Hilfe des Primer3-Programmes konstruiert [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi].

Je nach DNA-Fragment und Anforderung wurde das Standard-PCR-Programm modifiziert.

Standard-PCR-Programm:

Für die Standard-PCR wurde ein Reaktionsansatz von 20 µl gewählt. Das Reaktionsgemisch wurde in 200 µl Reaktionsgefäßen in Thermozyklern der Firma Eppendorf (Hamburg) oder der Firma Bio-Rad (München) angesetzt.

40 ng	<i>Template</i> -DNA
1 µl	5'-Primer (10 µM)
1 µl	3'-Primer (10 µM)
2 µl	dNTPs (2 mM)
2 µl	10x Polymerasepuffer
1 U	DNA-Polymerase
ad 20 µl	ddH ₂ O

1 x		
95 °C	5 min	
30 x		
95 °C	30 s	Denaturierung
55 °C	45 s	Primer-Anlagerung
68 °C	45 s	Elongation
1 x		
68 °C	4 min	finale Elongation

Je nach Primer und Fragmentlänge wurden die Parameter *Annealing*-Temperatur oder Elongationszeit sowie die Zyklenzahl angepasst.

2.3.9 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese

TAE (1x) :

40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA
pH 8,0

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Nukleinsäuren eingesetzt. Hierbei wurden je nach Größe des zu untersuchenden DNA-Fragmentes Gele mit einer Konzentration zwischen 1,0 - 2,0 % Agarose (Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf) hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge an Agarose in TAE-Puffer (1x) aufgekocht und nach dem Abkühlen in die entsprechende Gelform gegossen. In die noch flüssige Agarose wurde zur Detektion der DNA-Fragmente 0,1 µg Ethidiumbromid (Fa. ICN Biomedicals, Eschwege) pro ml Agaroselösung zugegeben. Zur Größenbestimmung der einzelnen Fragmente wurde der Standard GeneRuler™ 100bp DNA Ladder oder der MassRuler™ DNA Ladder, Mix (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in einer Elektrophoresekammer der Firma Biometra (Göttingen) bei 80 - 100 Volt. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems E.A.S.Y. Win 32 (Fa. Herolab GmbH, Wiesloch) bei einer Wellenlänge von 312 nm.

2.3.10 Quantitative *Real-Time*-PCR

Zur Expressionsanalyse einzelner Gene in verschiedenen Geweben wurde die Methode der quantitativen *Real-Time*-PCR eingesetzt. Diese wurde mit dem Applied Biosystems 7300 *Real-Time-PCR* System (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Für kleine RNA Mengen (Inselzell-Analysen) wurde ein TaqMan® Gene Expression Assay (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt, hier wurde als endogene Kontrolle eine *Actb* (β-Actin) Sonde verwendet. Analysen in Geweben bei denen viel Ausgangsmaterial zu Verfügung stand (z.B. weißes Fettgewebe) wurden mittels SYBR® Green (Fa. Applied Biosystems, Darmstadt) untersucht. Hier wurden Primer für die 18S *rRNA* als endogene Kontrolle eingesetzt.

TaqMan® Gene Expression Assay:

10 µl TaqMan® Universal PCR Mastermix (2x)
1 µl TaqMan® Gene Expression Assay

10 - 20 ng cDNA (siehe 2.3.7)
ad 25 µl ddH₂O

SYBR® Green Assay:

12,5 µl SYBR® Green PCR Master Mix
0,5 µl 5'-Primer (50 µM)
0,5 µl 3'-Primer (50 µM)

20 ng cDNA (siehe 2.3.7)
ad 25 µl ddH₂O

Sowohl der TaqMan® Gene Expression Assay als auch der SYBR® Green Assay wurden in Triplikaten durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode [Livak *et al.*, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002].

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von zellfreien Proteinextrakten

Zell-Lyse-Puffer:

20 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	EGTA
1 %	Triton-X-100
2,5 mM	Natriumpyrophosphat
pH 7,5	

Inhibitoren:

40 µl/ml	Complete™ (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; 1 Tablette ad 2 ml ddH ₂ O)
1 mM	Na-Orthovanadat
1 mM	Glycerinphosphat
1 mM	PMSF
100 µM	Leupeptin

Zur Herstellung von zellfreien Proteinextrakten wurden 80 - 100 mg Gewebe in flüssigem Stickstoff abgewogen, 500 µl des mit Inhibitoren versetzten Lysepuffers zugegeben und das Gewebe mit einem Potter RW 20 (Fa. IKA Labortechnik, Staufen) zerkleinert. Um aus dem so gewonnenen Zellysate die Zellkerne zu entfernen, wurde dieses bei 4 °C für 10 min bei 16100 x g zentrifugiert (Biofuge fresco, Fa. Heraeus). Mit Hilfe einer Spritze wurde das Proteinlysate zwischen Pellet und Fettschicht abgenommen. Das so gewonnene Lysat wurde erneut zentrifugiert und vom noch vorhandenen Fett abgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde wie in 2.4.2 beschrieben ermittelt.

2.4.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde das *BCA Protein Assay Kit* (Fa. Pierce, Rockford, IL, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden jeweils Duplikate der einzelnen Proben vermessen. Als Eichreihe wurde Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0,5 - 7,0 µg Protein/µl verwendet.

2.4.3 Derivatisierungsblot

Sammelgel (4 %):

520 µl	0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8
260 µl	Acrylamid/ Bisacrylamid (30%) 37,5:1
1,22 ml	ddH ₂ O
2 mg	Ammoniumperoxodisulfat
2 µl	TEMED

Trenngel (12 %):

1,56 ml	1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8
2,40 ml	Acrylamid/ Bisacrylamid (30%) 37,5:1
2,04 ml	ddH ₂ O
6 mg	Ammoniumperoxodisulfat
6 µl	TEMED

Elektrodenpuffer (1x):

3,125 mM	Tris-HCl
31,25 mM	Glycin
0,1 %	SDS
pH 8,4	

Transferpuffer (1x):

2,5 mM	Tris-HCl
19,2 mM	Glycin
20 %	Methanol (v/v)
pH 8,4	

TBS:

10 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
pH 8,0	

Zur Bestimmung des oxidativen Status einer Proteinprobe wurden, wie in 2.4.1 beschrieben, die Gesamtproteine aus dem Gewebe isoliert. Es wurde jedoch zusätzlich zum Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren noch DTT (50 mM) zugesetzt um ein Oxidieren der Proteine während des Aufschlusses zu verhindern. Anschließend wurde zur Detektion von oxidativ veränderten Proteinen das *OxyBlot™ Protein Oxidation Detection* Kit (Fa. Chemicon / Millipore, Schwalbach) eingesetzt [Houstis *et al.*, 2006]. Die so erhaltenen Proben (5 µg Protein) wurden wie vom Hersteller empfohlen mittels PAGE [Laemmli *et al.*, 1970] aufgetrennt. Hierfür wurden 12 %-ige Trenngele verwendet (Elektrophorese Sammelgel: 20 mA, Trenngel: 40 mA). Die Proben wurden auf PVDF-Membranen transferiert (1 h, 200 mA). Die anschließende Detektion erfolgte mittels der im Kit enthaltenen Antikörper über peroxidasevermittelte Chemilumineszenz.

2.4.4 Quantitativer Nachweis von Insulin mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Zur quantitativen Bestimmung von Insulin im Blutplasma wurde der *Insulin Mouse Ultrasensitive ELISA EIA-3440* (Fa. DRG Instruments GmbH, Marburg) eingesetzt. Hierfür wurden die Plasmaproben entweder unverdünnt eingesetzt oder mit dem Nullkalibrator des Kits entsprechend des angegebenen Messbereichs zwischen 0,2 - 7,1 µg/l verdünnt. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte mit dem Stat Fax 2100 Microplate Reader (Fa. Awareness Technology, FL, USA). Die anschließende Auswertung erfolgte mit dem REGDRG Version 2.01 Programm (Fa. DRG Instruments GmbH)

2.4.5 Bestimmung verschiedener Blutlipide

Die Bestimmung der freien Fettsäuren im Plasma erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Kit NEFA C (Fa. Wako Chemicals, Neuss). Das freie Cholesterin wurde mit dem Kit CHOL-H L-Type WAKO 20R/30R derselben Firma bestimmt. Zur Bestimmung der Triglyceride wurde das *Free Glycerol Reagent* (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet. Alle eingesetzten Reaktionskits wurden wie vom Hersteller beschrieben verwendet. Das zu untersuchende Plasma wurde jeweils 1:2 mit ddH₂O verdünnt.

2.4.6 Nachweis von Zytokinen

Die im Blutplasma enthaltenen Zytokine wurden in einem so genannten Multiplex Assay gemessen. Dies ermöglichte die parallele Bestimmung von IL6, TNF- α , RANTES und MCP-1. Hierfür wurde das *Mouse Cytokine/ Chemokine LINCOpex Kit* (Fa. LINCO / Millipore, Schwalbach) verwendet. Das Probenmaterial wurde unverdünnt eingesetzt und der Assay laut Herstellerangaben durchgeführt. Die Durchführung erfolgte am Institut für Experimentelle Endokrinologie, Forschungs-Zentrum der Charité (Berlin).

2.5 Gewinnung von RNA aus den Langerhansschen Inseln

Die Gewinnung von RNA aus den Langerhansschen Inseln erfolgte in Kooperation mit Zorica Jovanovic (AG S. O'Rahilly, Universität Cambridge, UK).

2.5.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Von den auf Trockeneis gefrorenen Pankreata wurden mit Hilfe eines LEICA CM 1900 Schnellschnitt-Kryostaten (Fa. LEICA, Bensheim) 14 µm dicke Pankreasschnitte angefertigt. Es wurden jeweils 4 - 6 dieser Gewebeschnitte auf einen zuvor mit UV-Licht (30 min) behandelten Objektträger aufgebracht (P.A.L.M. membrane coated slides). Es wurden je Maus mindestens 9 Objektträger á 4 - 6 Schnitte angefertigt.

2.5.2 Schnellfärbung der Kryoschnitte

Zur besseren Identifikation und Abgrenzung der Langerhansschen Inseln wurde mit den Kryoschnitten eine Färbung mit *Cresyl Violet Stain* (Fa. Ambion, Huntingdon, UK) durchgeführt.

Tab. 5: Zeitschema zur Schnellfärbung von Kryoschnitten

Zeit [s]	EtOH [%]
30	95
30	75
25	50

Zugabe von 15 µl *Cresyl Violet Stain* seitlich zum Gewebeschnitt

Zeit [s]	EtOH [%]
25	50
25	75
30	95
30	100
30	100
120 - 300	Histoclear

Nach dem letzten Schritt in Histoclear (Fa. National Diagnostics, Eastbourne, UK) wurden die Objektträger ca. 5 min unter einer Sterilbank getrocknet.

2.5.3 Laserbasierte Mikropräparation von Inselzellen

Nach der Färbung wurde aus den getrockneten Gewebeschnitten das Inselzellgewebe mit Hilfe des P.A.L.M. Micro Beam IP 230V Z Systems (Fa. P.A.L.M., Bernried) und der P.A.L.M. ® RoboSoftware Version 2.2-0130(EN) präpariert. Hierfür wurden die Schnitte unter einem Axiovert 200M (Fa. Zeiss, Oberkochen) bei 10x Vergrößerung betrachtet. Folgende Laserparameter wurden für die Isolation des Gewebes gewählt:

UV-Energy:	68 - 78
UV-Focus:	79
Schnittgeschwindigkeit:	44 - 47

Die verwendeten Parameter mussten zum Teil an die Gewebebeschaffenheit angepasst werden. Es wurden mindestens 50 Inseln je Objektträger markiert und isoliert. Die Inseln von jeweils drei Objektträgern wurden im Deckel eines Reaktionsgefäßes (P.A.L.M. Adhesives caps 500 Clear, Fa. P.A.L.M.) gesammelt. Nach der Präparation der Inseln des dritten Objektträgers wurden 20 µl *RNAlater* (Fa. QIAGEN) auf das isolierte Gewebe pipettiert und das Reaktionsgefäß bis zur RNA-Isolation auf Trockeneis gelagert. Pro Tier wurden jeweils drei Reaktionsgefäße (mit jeweils drei Objektträgern) isoliert.

2.5.4 Aufreinigung von RNA aus den Langerhansschen Inseln

Die RNA wurde mit Hilfe des *RNAqueous*[®]-*Micro* Kit (Fa. Ambion, Darmstadt) nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA aus den drei einzelnen Reaktionsgefäßen wurde vereinigt. Zum Aufkonzentrieren der RNA wurden die Proben 6,5 min bei 60 °C mittels eines Eppendorf Concentrators 5301 (Fa. Eppendorf) auf ca. 8 µl evaporiert. Die Konzentration wurde wie in 2.3.3 beschrieben ermittelt.

2.5.5 Kapillarelektrophorese von isolierter RNA

Um die RNA-Qualität zu überprüfen, wurde eine Kapillarelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde das RNA 6000 Pico Kit (Fa. Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Nach der Qualitätsprüfung der RNA wurde diese bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Die Verwendung der RNA für Affymetrix GeneChip[®] erfolgte bis zu einer RIN von 3,0 [Schroeder *et al.*, 2006].

2.6 Herstellung der Microarrays

Für die genomweiten Expressionsanalysen wurde der Affymetrix GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 (Fa. Affymetrix, Buckinghamshire, UK) verwendet.

Die Herstellung der biotinmarkierten antisense cDNA sowie das Hybridisieren auf die Arrays wurde durch die Signature Diagnostics AG (Potsdam) durchgeführt.

Hierbei wurde für die Arrays des weißen Fettgewebes das Affymetrix „*One Cycle Target*“ Kit (Fa. Affymetrix) und für die Arrays aus dem Gewebe der Langerhansschen Insel das *WT-Ovation*[™] *Pico RNA Amplifications System* (Fa. NuGene, Bommel, NL) verwendet.

2.6.1 Vorverarbeitung der Arrays aus dem weißen Fettgewebe

Die von Signature Diagnostics erhaltenen Rohdaten (.Cel Files) wurden durch den Kooperationspartner Dr. Frank Kleinjung von MicroDiscovery GmbH (Berlin) auf deren Qualität überprüft. Anschließend wurde eine Kondensation ohne Background-Korrektur und Normalisierung mit der Methode „pmoly“ durchgeführt. Nachfolgend wurde mit einem Multi-Lowess-Verfahren (in-House Methode) normalisiert.

Aus den von MicroDiscovery erhaltenen Daten wurde der *logratio* (\log_2) gebildet, in dem man den Wert der Interventionsgruppe (HF) von dem der Kontrollgruppe (SD) abzieht. Anhand des Vorzeichens des *logratios* ist es möglich, Aussagen über die Expressionsstärke zu machen. Bei einem negativen Vorzeichen (z.B. *logratio* HF vs. SD -1,0) ist die Expression bei der HF im Gegensatz zur SD erniedrigt. Da es sich hierbei um logarithmische Werte handelt muss beachtet werden, dass es sich bei einem *logratio* von 1 um eine Verdoppelung (-1 Halbierung) der Expressionsstärke handelt.

Die so erhaltenen Daten wurden mit Hilfe einer Access-Datenbank verwaltet und je nach Fragestellung ausgewertet.

2.6.2 Vorverarbeitung der Arrays aus den Langerhansschen Inseln

Die Vorverarbeitung der Arrays aus dem Inselzellgewebe wurde durch Axel Rasche (AG. R. Herwig) vom MPI für molekulare Genetik in Berlin Dahlem durchgeführt. Für die Hintergrundkorrektur wurde das GC-RMA-Softwarepaket über R/BioConductor verwendet [Wu *et al.*, 2004]. Die Normalisierung wurde mittels der *Loess*-Methode erstellt. Dem angeschlossen wurde eine PM-Korrektur (*perfect match/ mismatch*-Korrektur) mit abschließender Kondensationsreaktion zur Errechnung der Expressionswerte angewendet. Die Annotation der Affymetrix Bezeichner basiert auf Ensembl (e!46) und resultierte in 15758 Genen.

Als differenziell regulierte Gene wurden all diejenigen betrachtet, die den folgenden drei Kriterien entsprachen:

- Das Gen muss bezogen auf die *presence tags/ detection calls* entweder in der Kontroll- (CHF) oder in der Behandlungsgruppe (HF) mit einem p-Wert unter 0,05 (Wilcoxon-Test) exprimiert sein.
- Das Verhältnis der Genexpression zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe muss mindestens $\frac{4}{3}$ oder maximal $\frac{3}{4}$ betragen.
- Der Welch-Test (angepasster t-Test; die Standardabweichungen der beiden untersuchten Gruppen kann unterschiedlich groß sein) muss zwischen den zwei Proben signifikant mit einem p-Wert kleiner 0,05 sein.

Die von Axel Rasche erhaltenen Daten wurden in eine Access-Datenbank geladen und je nach Fragestellung mit den jeweiligen Kriterien (z.B. nur differenziell exprimierte Gene) ausgewertet.

2.7 Histologie

2.7.1 Gewebeaufarbeitung

Die entnommenen Gewebe wurden für 24 h in 4,5 %-igem Paraformaldehyd (PFA)/PBS fixiert. Danach für 24 h mit fließendem Leitungswasser gespült und anschließend im Entwässerungsautomaten (Hypercenter[®] XP, Fa. Thermo Shandon, Frankfurt) über aufsteigende Ethanol-/ Toluol-Konzentrationen dehydriert und abschließend im Histocentre 2 mit Histoplast (Fa. Thermo Shandon) eingebettet.

Tab. 6: Entwässerungsschema zur Gewebeaufarbeitung

Reagenz [v/v]	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Vakuum
EtOH 55 %	40	40	nein
EtOH 70 %	50	40	nein
EtOH 96 %	30	40	nein
EtOH 96 %	60	40	nein
EtOH 100 %	80	40	nein
EtOH 100 %	150	40	ja
Toluol 100 %	120	40	ja
Toluol 100 %	150	40	ja
Histoplast	90	60	ja
Histoplast	150	60	ja

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden von den eingebetteten Geweben in Serie 2 µm dünne Mikrotom-Schnitte angefertigt, im Wasserbad bei 38 °C gestreckt, anschließend auf Adhäsivobjektträger aufgezogen und abschließend ÜN bei 38 °C getrocknet (durchgeführt von Frau E. Meyer ETOX, DIFE). Die so hergestellten Paraffinschnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und nach dem Färben wieder dehydriert.

Tab. 7: Übersicht zur Entparaffinierung und Dehydrierung von Gewebeschnitten

Entparaffinieren		Dehydrieren	
Reagenz	Zeit [min]	Reagenz	Zeit [min]
Toluol 100 %	3	EtOH 70 %	0,5
Toluol 100 %	5	EtOH 96 %	0,75
EtOH 100 %	3	EtOH 100 %	3
EtOH 100 %	5	EtOH 100 %	4
EtOH 96 %	2	Toluol 100 %	3
EtOH 70 %	2	Toluol 100 %	4
EtOH 40 %	2		
ddH ₂ O	3		

2.7.2 Immunhistochemie

TBS-Puffer 10x:

6,1 g Tris-HCl
 85 g NaCl
 37 ml 1 M HCl
 ad 1l ddH₂O
 pH 7,6

TBS 1x:

50 ml 10x TBS
 450 ml ddH₂O

TBS/T 1x:

50 ml 10x TBS
 500 µl Tween 80
 450 ml ddH₂O

Tab. 8: Verwendete Primärantikörper

Alle verwendeten Primärantikörper wurden über Nacht (ÜN) bei 4 °C eingesetzt.

Primärantikörper		Verdünnung	Inkubationsdauer	Firma
GLUT2	Kaninchen VI 3. Blutung	1:1000	ÜN	[Juergens <i>et al.</i> 2007]
Foxo1 FKHR (H-128)	Kaninchen	1:200	ÜN	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-Cck Octapeptid	Kaninchen	1:500 1:1000	ÜN	Millipore, Schwalbach
Cck 9-20	Kaninchen	1:500 1:1000	ÜN	Biotrend, Köln
Anti ChREBP (Mlxipl)	Kaninchen	1:500	ÜN	Acris, Hiddenhausen
ChREBP blocking peptide		1:500	ÜN mit Primärantikörper	Acris, Hiddenhausen

Tab. 9: Verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Sekundärantikörper	Verdünnung	Detektion	Firma
GLUT2	Anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488	1:200	Fluoreszenz bei 488 nm	Invitrogen GmbH Karlsruhe
Foxo1	Anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488	1:200	Fluoreszenz bei 488 nm	Invitrogen GmbH Karlsruhe
Cck	Anti-Kaninchen Histofine®		DAB 5 min/ 10 min	Medacshop, Hamburg
ChREBP	Anti-Kaninchen Histofine®		DAB 2,5 min	Medacshop, Hamburg

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte einer 2,5 min andauernden Mikrowellenbehandlung (800W) in 1x *Target Retrieval Solution* (TRS) (Fa. Dako, Hamburg) unterzogen und für 30 min abgekühlt. Nach einer 10 min Inkubation in 3 % H₂O₂ wurden die Schnitte zweimal mit ddH₂O gespült und für 5 min in TBS/T gewaschen. Danach wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift (DakoCytomation Pen, Fa. Dako) umrandet und mit Antikörperverdünnungsmedium (Fa. Dako) für 20 min geblockt. Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper in der entsprechenden

Verdünnung aufgetragen und über Nacht (ÜN) bei 4 °C inkubiert. Nach der ÜN-Inkubation wurden die Objektträger dreimal für 2 min mit TBS/T und einmal mit TBS für 2 min gewaschen. Als sekundärer Antikörper (Peroxidase markiert) wurden 1 - 2 Tropfen Histofine *anti-rabbit* (Fa. Nichirei Bioscience bezogen über Medacshop, Hamburg) eingesetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde wie für den Primär-AK beschrieben gewaschen. Zur Detektion wurde *Liquid DAB⁺ Substrate* (Fa. Dako) verwendet. Nach der jeweiligen Entwicklungsdauer wurde die Reaktion in ddH₂O abgestoppt, die Schnitte dehydriert und mit Histofluid eingedeckt (Fa. Krankenhaus- und Laborbedarf M. Fremdling, Furth).

Bei der Detektion von ChREBP wurde der Folgeschnitt auf demselben Objektträger analog behandelt, jedoch wurde nach dem Blocken eine 1:500 Antikörperversüßung aufgetragen, der 12 h zuvor im gleichen Volumenverhältnis wie der AK das entsprechende *blocking peptide* zugesetzt worden war. Danach wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

Bei der Verwendung des fluoreszenzmarkierten Anti-Kaninchen Alexa Fluor[®]488 (Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe) Sekundärantikörpers wurde nicht der oben beschriebene Inkubationsschritt in 3 %-igem H₂O₂ durchgeführt, sondern gleich nach dem Abkühlen mit TBS/T gewaschen. Außerdem wurden die Gewebeschnitte direkt nach dem Waschschrift des Sekundärantikörpers mit *Vectashield[®] Mounting Media for Fluorescence* (Fa. Vector Labs, USA) überschichtet, eingedeckt und mit Nagellack versiegelt.

2.7.2.1 Hämatoxylinfärbung

Die rehydrierten Schnitte (2.7.1) wurden für 5 s in Hämatoxylin (Fa. Bio-Optica, Milano, Italien) geschwenkt und im Anschluss mit fließendem Leitungswasser für 2 min gebläut. Nach dem Dehydrieren wurden die Schnitte mit Histofluid (Fa. Krankenhaus- und Laborbedarf M. Fremdling) eingedeckt.

2.7.3 Mikroskopie

Die gefärbten Schnitte wurden an einem Eclipse E 800-Mikroskop (Fa. Nikon, Düsseldorf) analysiert und mittels CCD-1300 CB-Kamera (Fa. Vosskühler GmbH, Osnabrück) dokumentiert. Zur Auswertung wurde das Farbbildanalysesystem LUCIA G (Fa. Nikon, Düsseldorf) verwendet. Es wurde ein Nikon Plan Fluor-Objektiv mit einer 20x (20x / 0.50 Ph1 DLL ∞/0.17 WD 2.1) Vergrößerung verwendet. Für Fluoreszenzuntersuchungen wurde der Nikon VFM Filter FITC (EX 465 - 495, DM 505, Ba 515 - 555) eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des weißen epididymalen Fettgewebes (WAT) der NZO-Maus

Um die Prozesse und die daran beteiligten Gene, die zur Adipositas führen, besser verstehen zu können, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Hochfett-Diät auf die Expression im WAT der NZO-Maus zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe der Microarray-Technologie untersucht werden, um Kandidatengene und Stoffwechselwege, die zur Adipositas führen, zu identifizieren.

3.1.1 Generierung und Charakterisierung der Versuchstiere für die Expressionsanalyse

Um nachfolgend Expressionsanalysen im weißen Fettgewebe durchführen zu können, mussten die für den Versuch benötigten Tiere generiert werden. Hierfür wurde der NZO-Mausstamm, der wesentliche Merkmale des humanen metabolischen Syndroms zeigt, verwendet. Es sollte ein möglichst früher Zeitpunkt noch vor bzw. während der Adipositasausprägung untersucht werden, um mögliche, an der Entstehung der Adipositas beteiligte, Kandidatengene bzw. Stoffwechselforgänge zu identifizieren. Abbildung 3 zeigt das gewählte Versuchsdesign, welches sowohl den Vergleich einzelner Zeitpunkte untereinander, als auch die Betrachtung von Zeitreihen ermöglicht.

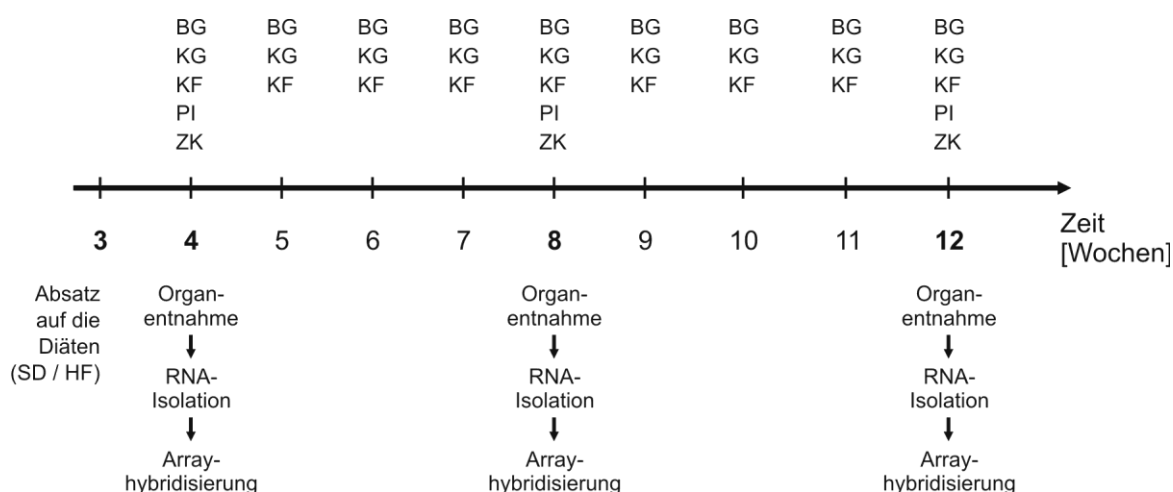


Abb. 3: Versuchsdesign zu den Expressionsanalysen des weißen Fettgewebes der NZO-Maus auf verschiedenen Diäten

Für diesen Versuch wurden die Tiere direkt in Woche drei auf die entsprechenden Diäten abgesetzt. Es sollte basierend auf der Microarray-Technologie ein Expressions-Profil in Lebenswoche 4, 8 und 12 sowohl auf der Hochfett-Diät (HF) als auch auf der Standarddiät (SD) erstellt werden. KG: Körpergewicht, KF: Körperfett, BG: Blutglucose, PI: Plasmainsulin, ZK: Zytokine.

Für den Versuch wurden, aufgeteilt zwischen der Standard- (SD) und der Hochfett-Diät (HF), insgesamt 19 Affymetrix GeneChips® 430 2.0 für das weiße Fettgewebe hybridisiert. Für die SD wurden jeweils 3 Arrays in Woche 4, 8 und 12 verwendet. Für die Hochfett-Diät ist zu beachten, dass einzelne Zeitpunkte zusammengefasst wurden, um auch Zeitreihen innerhalb der Hochfett-Diät untersuchen zu können, d.h. die HF-Gruppe Woche 4 besteht aus zwei Tieren in Lebenswoche 4 und einem Tier in Lebenswoche 5. Analog dazu besteht die Woche 8 aus einem Woche 7, zwei Woche 8 und einem Woche 9 Tier. Für Woche 12 wurden ein Tier aus Lebenswoche 11 und zwei Tiere aus Lebenswoche 12 zusammengefasst.

Für den oben beschriebenen Versuch wurden die männlichen NZO-Jungtiere direkt nach dem Absatz (Woche 3) auf die zu untersuchenden Diäten (HF oder SD, Zusammensetzung: 2.2.2; Tab. 4) aufgeteilt und bis zur zwölften Lebenswoche charakterisiert (2.2.3; Abb. 3). Tabelle 10 zeigt die erhaltenen phänotypischen Parameter der NZO-Männchen.

Tab. 10: Charakterisierung der NZO-Maus in den Lebenswochen 4, 8 und 12

Gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung des Körpergewichtes (KG), des mittels NMR bestimmten Körperfetts (KF) und der Blutglucose (BG). Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem (Student)-t-Test. n: Anzahl der Tiere.

Woche 4	NZO ♂	NZO ♂	SD vs. HF
	SD	HF	p-Wert
KG [g]	18,6 ± 3,7	22,3 ± 3,1	0,0004
KF [g]	2,6 ± 0,8	4,6 ± 1,2	< 0,0001
BG [mM]	8,1 ± 1,6	9,2 ± 1,8	0,027
n	24	24	

Woche 8	SD	HF	p-Wert
KG [g]	37,5 ± 3,2	46,5 ± 3,0	< 0,0001
KF [g]	9,1 ± 2,3	16,9 ± 3,5	< 0,0001
BG [mM]	9,0 ± 2,4	11,3 ± 3,0	0,016
n	18	19	

Woche 12	SD	HF	p-Wert
KG [g]	44,1 ± 3,3	56,4 ± 3,8	< 0,0001
KF [g]	14,8 ± 3,2	26,8 ± 3,6	0,0003
BG [mM]	10,4 ± 2,9	8,7 ± 1,8	0,243
n	6	7	

Betrachtet man das Körpergewicht, so wird deutlich, dass die Tiere der HF-Gruppe zu allen untersuchten Zeitpunkten ein signifikant erhöhtes Gewicht im Vergleich zur SD aufwiesen. Dies spiegelt sich ebenfalls in signifikant erhöhtem Körperfett wieder. Die Blutglucose ist an den beiden frühen Zeitpunkten signifikant durch die Hochfett-Diät erhöht. Unerwarteterweise

wies die HF gefütterte Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe zum späten Zeitpunkt (Woche 12) jedoch keine erhöhten Blutglucosewerte auf.

3.1.2 Auswertung der Microarrays für das weiße Fettgewebe

Für die Microarrays wurde die RNA aus dem epididymalen Fettgewebe der NZO-Mäuse in den entsprechenden Wochen isoliert und die markierte cRNA auf die verwendeten Affymetrix GeneChips 430 2.0 hybridisiert. Die Vorverarbeitung sowie die Auswertung der GeneChips wurde in Kooperation mit der MicroDiscovery GmbH (Berlin) durchgeführt (2.6.1).

3.1.2.1 Differenziell exprimierte Gene im WAT

Bei der Untersuchung der differenziell exprimierten Gene wurden all diejenigen Gene betrachtet, deren Expression in mindestens einer der untersuchten Wochen durch die Hochfett-Diät doppelt bzw. weniger als halb so stark im Vergleich zur Standarddiät exprimiert war. Dieses Kriterium erfüllen 226 Gene. Durch die Diätintervention mit der Hochfett-Diät konnten Expressionsunterschiede von bis zu 8,8-fach höherer Expression bzw. 18,6-fach niedrigerer Expression im Vergleich zur Standarddiät beobachtet werden. Auflistungen der am stärksten in der Expression geänderten Gene im weißen Fettgewebe der NZO-Maus für die Wochen 4, 8 und 12 sind im Anhang (siehe Anhang A1-A6) aufgeführt. In Tabelle 11 sind beispielhaft die 15 am stärksten durch die Diätintervention in der Expression erhöhten und erniedrigten Gene in Woche 8 dargestellt.

Tab. 11: Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erhöht und erniedrig exprimierten Gene im WAT der NZO-Männchen in Woche 8

HF: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die HF-Gruppe; SD: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die SD-Gruppe; logRatio: Entspricht der Differenz der logarithmierten Scan-Intensitäten für HF und SD; p-Wert: (Student)-t-Test (nicht für *multiple testing* korrigiert)

Affymetrix-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	HF	SD	logRatio	p-Wert
1449153_at	<i>Mmp12</i>	<i>matrix metalloproteinase 12</i>	10,4	7,31	3,13	0,042
1435314_at	<i>Tph2</i>	<i>tryptophan hydroxylase 2</i>	10,4	7,32	3,12	0,013
1449254_at	<i>Spp1</i>	<i>secreted phosphoprotein 1</i>	9,65	6,62	3,03	0,013
1448303_at	<i>Gpnmb</i>	<i>glycoprotein nmb</i>	10,3	7,44	2,84	0,004
1419762_at	<i>Ubd</i>	<i>ubiquitin D</i>	9,99	7,37	2,62	0,011
1450826_a_at	<i>Saa3</i>	<i>serum amyloid A 3</i>	10,3	7,84	2,45	0,001
1444176_at	<i>Atp6v0d2</i>	<i>ATPase, H⁺ transporting, V0 subunit D</i>	9,07	6,67	2,40	0,005
1449164_at	<i>Cd68</i>	<i>CD68 antigen</i>	11,1	9,09	2,00	0,035
1450355_a_at	<i>Capg</i>	<i>capping protein, gelsolin-like</i>	10,3	8,35	1,96	0,016
1448591_at	<i>Ctss</i>	<i>cathepsin S</i>	12,2	10,3	1,94	0,023
1420380_at	<i>Ccl2</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	9,61	7,69	1,93	0,029
1421792_s_at	<i>Trem2</i>	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>	9,09	7,18	1,90	0,007
1416871_at	<i>Adam8</i>	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain 8</i>	9,01	7,12	1,89	0,004
1419128_at	<i>Itgax</i>	<i>integrin alpha X</i>	8,96	7,13	1,83	0,019
1420394_s_at	<i>Gp49a</i>	<i>glycoprotein 49 A</i>	11,0	9,24	1,80	0,022

Affymetrix-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	HF	SD	logRatio	p-Wert
1423556_at	<i>Akr1b7</i>	<i>aldo-keto reductase family 1, member B7</i>	6,38	9,84	-3,46	0,219
1416325_at	<i>Crisp1</i>	<i>cysteine-rich secretory protein 1</i>	5,90	8,82	-2,91	0,238
1417404_at	<i>Elovl6</i>	<i>ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids</i>	8,47	10,8	-2,36	0,028
1456124_x_at	<i>Svs5</i>	<i>seminal vesicle secretion 5</i>	7,03	9,25	-2,22	0,376
1423436_at	<i>Gsta3</i>	<i>glutathione S-transferase, alpha 3</i>	8,31	10,4	-2,08	0,006
1425326_at	<i>Acly</i>	<i>ATP citrate lyase</i>	9,22	11,2	-1,96	0,022
1422515_at	<i>Svs7</i>	<i>seminal vesicle protein, secretion 7</i>	6,42	8,33	-1,91	0,352
1417074_at	<i>Ceacam10</i>	<i>CEA-related cell adhesion molecule 10</i>	6,17	8,01	-1,84	0,348
1439379_x_at	<i>Prm1</i>	<i>protamine 1</i>	6,31	8,12	-1,81	0,180
1434185_at	<i>Acaca</i>	<i>acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha</i>	9,56	11,3	-1,79	0,015
1417992_a_at	<i>Svs3</i>	<i>seminal vesicle secretion 3</i>	5,98	7,74	-1,76	0,399
1415994_at	<i>Cyp2e1</i>	<i>cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1</i>	11,3	13,0	-1,70	0,015
1415965_at	<i>Scd1</i>	<i>stearoyl-Coenzyme A desaturase 1</i>	10,3	12,0	-1,65	0,002
1435999_at	<i>C630041L24Rik</i>	<i>RIKEN cDNA C630041L24 gene</i>	6,41	8,04	-1,63	0,290
1427222_a_at	<i>Svp2</i>	<i>seminal vesicle protein 2</i>	7,04	8,67	-1,63	0,492

3.1.2.2 Differenziell regulierte Stoffwechselwege

Da bedingt durch das Versuchsdesign (Vergleich von Parentaltieren auf zwei verschiedenen Diäten) auf der Ebene der Einzelgene nur relativ geringe Änderungen in der Expressionsstärke, diese jedoch in großer Anzahl, auftraten, wurde im nachfolgenden Schritt eine auf der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)-Datenbank basierende *Pathway*-Analyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich im direkten Vergleich der Änderung einzelner Gene im Stoffwechselweg gegenüber der Gesamtheit an Genen ein hoch signifikanter Unterschied in der Expression zwischen der Hochfett- und der Standarddiät für die oxidative Phosphorylierung (Oxphos). Dies konnte für alle untersuchten Zeitpunkte (Wochen: 4, 8 und 12) bei männlichen NZO-Mäusen beobachtet werden. Tabelle 12 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der *Pathway*-Analyse für die Lebenswoche 8.

Tab. 12: Signifikant regulierte Stoffwechselwege im weißen Fettgewebe der NZO-Maus in Lebenswoche 8

Regulation: Änderung der Gene eines Stoffwechsel-/ Signalwegs vs. Änderung der restlichen Gene des Arrays, p-Wert berechnet mit den (Student)-t-Test

Stoffwechselweg	Anzahl der Gene	p-Wert	Regulation
Oxidative Phosphorylierung	108	2,82E-12	-0,13
Killerzellen vermittelte Zytotoxizität	103	6,83E-11	0,19
Citratzyklus	27	3,55E-09	-0,39
B-Zellrezeptor Signalweg	64	1,27E-08	0,23
Antigenprozessierung und -präsentation	61	2,31E-06	0,25
Regulation des Actinzytoskeletts	181	2,31E-06	0,12
Propanoatmetabolismus	31	3,12E-06	-0,34
Metabolismus von Xenobiotica durch Cytochrom P450	66	4,21E-06	-0,19
<i>Toll-like</i> -Rezeptor Signalweg	78	2,93E-05	0,16
<i>MAPK</i> Signalweg	236	0,000629	0,07
Zytokin-Zytokinrezeptor Wechselwirkung	209	0,00102	0,10
Fettsäuremetabolismus	43	0,00112	-0,15
Zelladhäsion	185	0,00169	0,10
Apoptose	85	0,00215	0,07
T-Zellrezeptor Signalweg	93	0,00215	0,10
Pyruvatmetabolismus	39	0,00271	-0,39
Stärke- und Saccharosemetabolismus	55	0,00271	-0,15
Glycolyse / Gluconeogenese	53	0,00347	-0,18
Glutathionmetabolismus / Glycanbiosynthese und -metabolismus	37	0,00415	-0,20
<i>VEGF</i> Signalweg	54	0,00979	0,09

Hierbei ist zu beachten, dass die Tabelle nach dem p-Wert der Änderung zwischen dem Stoffwechselweg im Vergleich zur Änderung der Gesamtheit sortiert ist. Der errechnete Wert der „Regulation“ gibt an, ob die Summe der Gene des Stoffwechselwegs in Bezug auf die

Diätintervention erhöht oder erniedrigt ist. Gezeigt sind nur die Stoffwechselwege, deren Änderung gegenüber der Gesamtheit signifikant war. Es wird deutlich, dass neben der hohen Signifikanz für Oxphos vermehrt mit dem Immunsystem assoziierte Stoffwechselwege wie z.B. Killerzellen vermittelte Zytotoxizität, B-Zellrezeptor Signalweg oder Antigenprozessierung und -präsentation auftreten. In Abbildung 4 sind die Gene der oxidativen Phosphorylierung dargestellt.

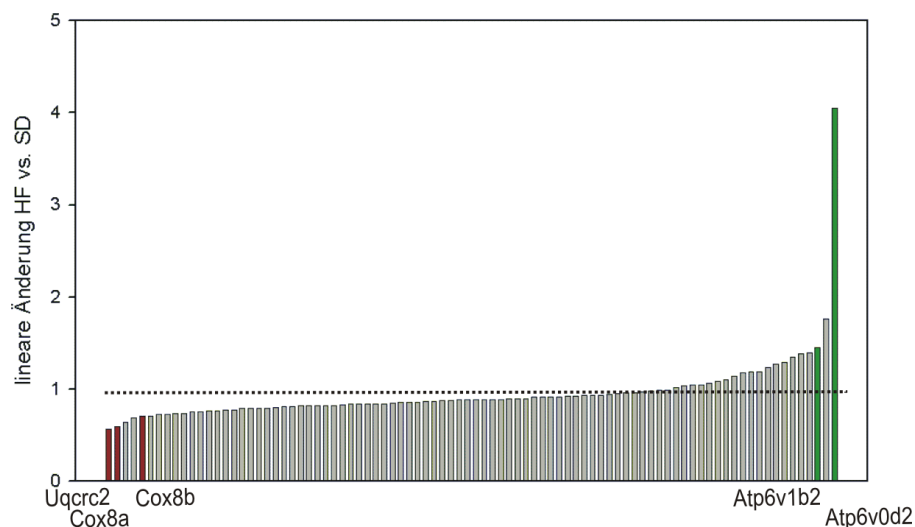


Abb. 4: Gene der oxidativen Phosphorylierung und deren Änderung

Dargestellt ist die lineare Änderung der Expression für die Hochfett-Diät im Verhältnis zur Standarddiät. Farblich markiert sind all jene Gene die mittels *Real-Time-PCR* validiert wurden. Rot = Expression der markierten Gene durch die HF erniedrigt, grün = Expression der markierten Gene durch die HF erhöht.

Betrachtet man die Änderungen in der Expression der Gene für die oxidative Phosphorylierung so wird deutlich, dass mehr als 3/4 aller Gene (77,5 %) in ihrer Expression durch die Hochfett-Diät erniedrigt wurden.

3.1.3 Validierung der beobachteten Änderung in der Genexpression der oxidativen Phosphorylierung durch *Real-Time-PCR*

Auf den Befund aus den *Pathway-Analysen* aufbauend, wurden *Real-Time-PCR*-Untersuchungen (2.3.10) im weißen Fettgewebe der NZO- und der schlanken *Swiss Jim Lambert* (SJL)-Maus durchgeführt, um die Ergebnisse der Microarrayanalysen mit Hilfe einer unabhängigen Methode bestätigen zu können. Dabei wurden 5 Gene exemplarisch ausgewählt, die entweder eine erhöhte oder eine erniedrigte Expression auf der Hochfett-Diät aufwiesen. Das weiße Fettgewebe der schlanken SJL-Maus wurde als Kontrolle verwendet, da sie eine Resistenz gegenüber der diätinduzierten Adipositas aufweist. Unter der verabreichten HF-Diät konnte für die NZO-Maus eine erniedrigte Expression einzelner Gene aus den Komplexen III - V der Atmungskette beobachtet werden (Abb. 5 (A)). Es

zeigte sich jedoch, dass das Gen *Atp6v0d2*, welches in Komplex V für eine Untereinheit der eigentlichen ATP-Synthase, codiert, durch die HF verstärkt exprimiert wird. In der SJL-Maus wurde eine komplett entgegengesetzt regulierte Expression der untersuchten Gene festgestellt. Hier zeigten die untersuchten Gene für die Komplexe III - V eine erhöhte Expression auf der HF und nur das Gen *Atp6v0d2* eine erniedrigte Expression unter der HF (Abb. 5 (B)).

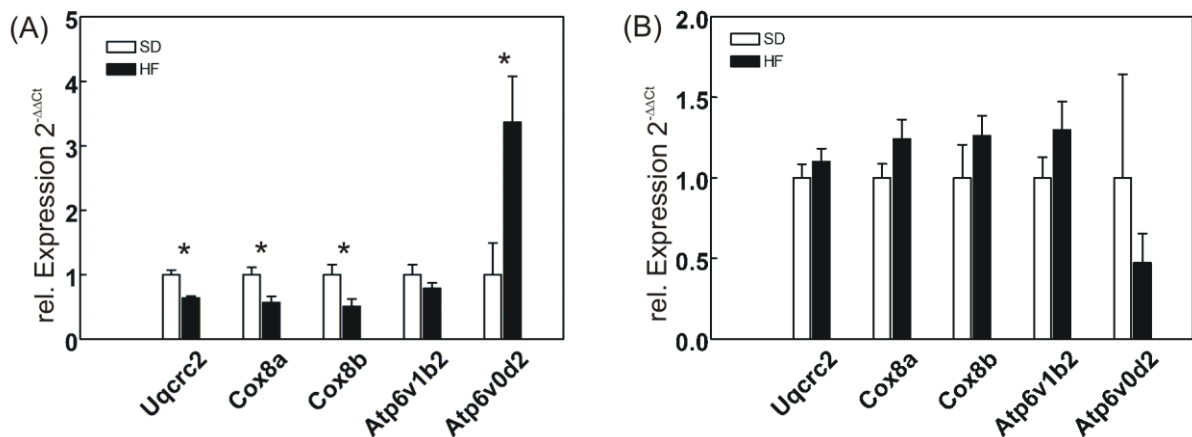


Abb. 5: Validierung der Oxphos-Expression mittels quantitativer *Real-Time-PCR*

mRNA-Expression des weißen Fettgewebes von (A) männlichen NZO-Tieren in Lebenswoche 8 (n: 5 Tiere / Gruppe) und (B) schlanken SJL-Kontrollmännchen (n: 4 Tiere / Gruppe; Woche 8). Dargestellt ist die relative Expression von Standarddiät gefütterten Tieren (weiß) und Hochfett-Diät gefütterten Tieren (schwarz). Die eingesetzte Menge an cDNA wurde auf die endogene Kontrolle *18S rRNA* normalisiert. Ausgewertet nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode [Livak *et al.*, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002]. *: $p < 0,05$ (HF vs. SD)

3.1.4 Untersuchung zur Mitochondrienanzahl im weißen Fettgewebe

Da sich durch zwei unabhängige Methoden eine erniedrigte Expression der Gene für die oxidative Phosphorylierung im weißen Fettgewebe von Hochfett-Diät gefütterten NZO-Mäusen beobachten ließ, sollte nachfolgend untersucht werden, ob dies durch eine geringere Mitochondrienanzahl erklärt werden kann [Kim *et al.*, 2008]. Choo *et al.* konnten zeigen, dass die *ND2*-Amplifikation (*NADH dehydrogenase subunit 2*) als Marker für die mitochondriale DNA in Adipozyten von *db/db*-Mäusen im Gegensatz zu Wildtypmäusen signifikant reduziert ist [Choo *et al.*, 2006]. Um sich die *ND2*-Amplifikation zu Nutze machen zu können, wurde die Zyklusanzahl bei der ein deutliches, jedoch noch im exponentiellen Bereich liegendes, Amplifikat erhalten wurde, sowohl für *ND2* (mitochondrial codiert) als auch für die endogene Kontrolle *18S rRNA* (genomisch) bestimmt (2.3.8) (Abb. 6 (A)). Die nachfolgende Bestimmung der mitochondrialen DNA aus einer Gesamt-DNA-Probe erfolgte bei 17 Zyklen für das *ND2* Gen und bei 25 Zyklen für die endogene Kontrolle *18S rRNA*. Über das Verhältnis zwischen *18S rRNA* und *ND2* können Aussagen über die Kopienzahl der mtDNA (*copy number*) im untersuchten Gewebe gemacht werden.

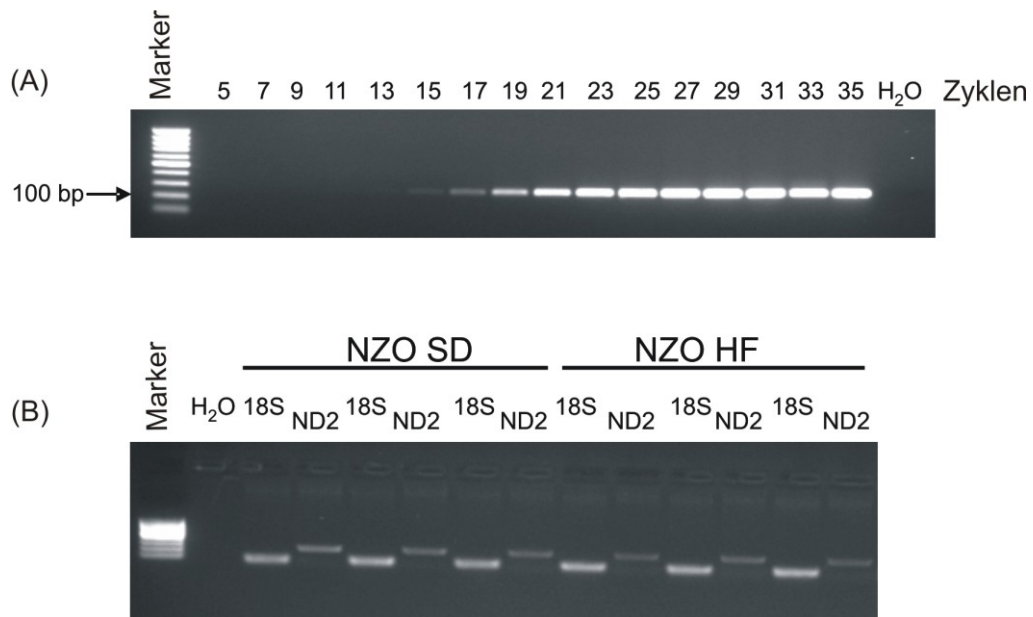


Abb. 6: Semiquantitative Bestimmung der Mitochondrienanzahl im weißen Fettgewebe
 (A) *ND2*-Amplifikat für verschiedene PCR-Zyklen mit einer eingesetzten Startmenge von 40 ng DNA aus dem WAT je Reaktionsansatz. (B) *ND2*-Amplifikat bei 17 Zyklen von NZO-Männchen in Lebenswoche 8 auf beiden Diätinterventionsgruppen. Zur Normalisierung auf die endogene Kontrolle *18S rRNA* wurde diese bei 25 Zyklen mitgeführt. Beides aufgetragen auf einem 1 %-igen Agarosegel.

Bei der densitometrischen Auswertung mittels *Image-Quant*-Software konnte kein Unterschied in der Bandenintensität zwischen der NZO SD- und HF-Gruppe in Lebenswoche 8 beobachtet werden (Abb. 6 (B)). Aus diesem Grund wurde die Menge an mitochondrialer DNA erneut zu einem späteren Zeitpunkt (Woche 22), an dem die Tiere einen noch adipöseren Phänotyp aufwiesen, bestimmt. Es wurde auch hier kein Unterschied zwischen den beiden Diätgruppen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Nachfolgend wurde der mitochondriale DNA-Gehalt in der schlanken SJL-Maus untersucht. Es wurde jedoch auch hier im direkten Vergleich mit der adipösen NZO-Maus (bei gleicher Diät) kein Unterschied in der Bandenintensität der *ND2*-Amplifikation festgestellt (Daten nicht gezeigt). Dies lässt den Schluss zu, dass anders als bei der *db/db*-Maus die erniedrigte Expression von Genen aus der oxidativen Phosphorylierung bei der NZO-Maus nicht in einer verringerten Anzahl an Mitochondrien bzw. mtDNA Kopien begründet liegt.

3.1.5 Untersuchung zur Mitochondrienstruktur im weißen Fettgewebe

Da die Mitochondrienanzahl nicht verändert zu sein scheint, sollte untersucht werden, ob die Mitochondrienstruktur oder -größe verändert ist [Kim *et al.*, 2008], womit sich die erniedrigte Expression der Gene der oxidativen Phosphorylierung in der HF-Gruppe erklären ließe. Hierfür wurden in Kooperation mit Dr. Petra Wittschen (FU Berlin) elektronenmikroskopische Untersuchungen am weißen Fettgewebe durchgeführt. Abbildung 7 zeigt transmissions-

elektronenmikroskopische Bilder des WAT von NZO-Männchen auf den unterschiedlichen Diäten.

Es konnten keinerlei strukturelle Veränderungen oder morphologische Anomalitäten der Mitochondrien im weißen Fettgewebe festgestellt werden.

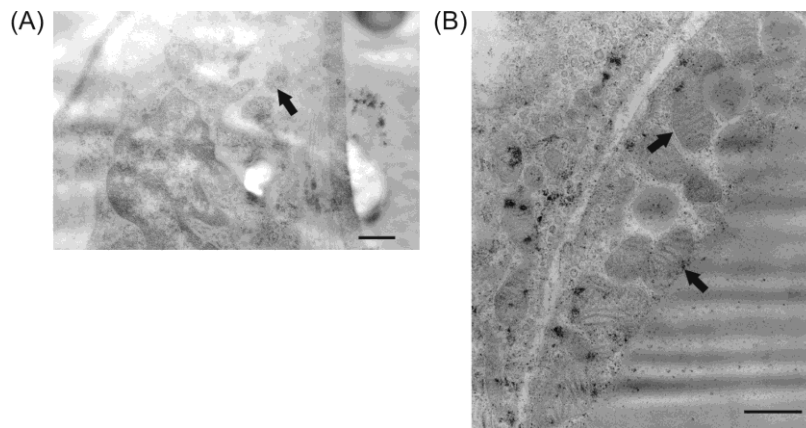


Abb. 7: Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung des weißen Fettgewebes

Gezeigt ist die Mitochondrienstruktur eines (A) Standarddiät NZO-Männchens in Woche 16 und eines (B) hochfettgefütterten NZO-Männchens in Lebenswoche 17.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an der Freien Universität Berlin in Kooperation mit Dr. Petra Wittschen (AG Prof. Gruber) angefertigt. Maßstab 1 μm

3.1.6 Oxidationsstatus der Gesamtproteine aus dem weißen Fettgewebe

In der Literatur wird zunehmend über die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an der Entstehung von Zell- und Proteinschäden sowie von zahlreichen Krankheiten diskutiert [Guichard *et al.*, 2008]. ROS entstehen hauptsächlich im Komplex I und III der Atmungskette, wobei die Entstehung durch eine erhöhte Energieaufnahme und einen verminderten Energieverbrauch (ATP) begünstigt wird [Nohl *et al.*, 2003]. Es sollte untersucht werden, ob die beobachteten Änderungen der oxidativen Phosphorylierung auf der Ebene der mRNA zu einer verstärkten ROS-Bildung führen, was indirekt über Modifikationen wie z.B. Veränderungen an Methionin-/ Histidin-Seitenketten oder die Bildung von Disulfidbrücken bzw. durch Veränderungen im Proteinmuster nachweisbar sein sollte. Abbildung 8 zeigt einen Derivatisierungsblot („Oxyblot“) (2.4.3) aus Gesamtproteinlysaten sowohl von SD- als auch von HF-gefütterten NZO-Mäusen im Vergleich mit schlanken SJL- und C57BL/6 (B6)-Mäusen (Lebenswoche 8). Dabei wurden die Carbonylgruppen der Proteine, mittels des verwendeten Reaktions-Kits, durch 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu 2,4-Dinitrophenylhydrazonen derivatisiert. Detektiert werden nur die Proteine, die nicht vor der Derivatisierung z.B. durch ROS oxidiert waren. Parallel zu dem hier gezeigten

derivatisierten „Oxyblot“ wurde ein nicht derivatisierter „Oxyblot“ angefertigt (Daten nicht gezeigt).

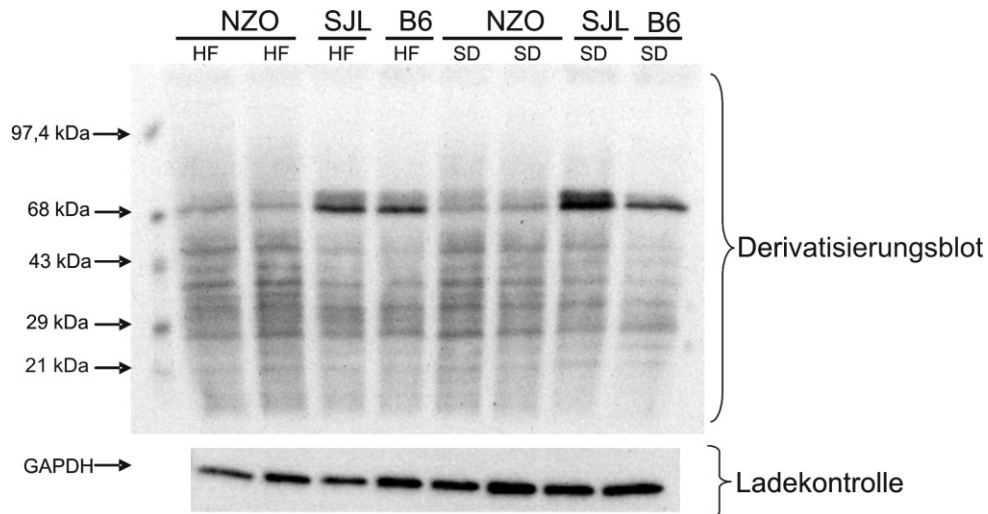


Abb. 8: Nachweis oxidativ veränderter Proteine im weißen Fettgewebe der NZO-Maus im Vergleich zu schlanken Mäusen der Kontrollstämme SJL und B6

Dargestellt ist ein derivatisierter „Oxyblot“ aus Gesamtproteinlysat des weißen Fettgewebes von NZO-, SJL- und B6-Mäusen auf HF und SD. Es wurden jeweils 10 µg Protein je Probe für 15 min derivatisiert, anschließend neutralisiert und auf einem 12 %-igen Polyacrylamidgel getrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden unterschiedlich oxidierte Proteine detektiert.

Interessanterweise trat bei ca. 70 kDa eine stärkere Bande in den schlanken Mausstämmen SJL und B6 auf, was darauf hindeutet, dass dieses Protein im NZO-Mausstamm modifiziert/oxidiert vorliegt (nicht durch das Reaktions-Kit derivatisierbar). Da dies unabhängig von der Diätinterventionsgruppe auftrat, die Microarray-Daten des weißen Fettgewebes jedoch die Auswirkungen der Diätintervention aufzeigen, wurde dieser Befund nicht weiter verfolgt. Es konnten keine weiteren Unterschiede im Bandenmuster zwischen den einzelnen Mausstämmen beobachtet werden.

3.1.7 Untersuchung zur Expression von Genen des Immunsystems

Der zweite wichtige Befund der Microarray-Analysen war ein verstärktes Auftreten von mit dem Immunsystem assoziierten Stoffwechselwegen im weißen Fettgewebe. Abbildung 9 stellt alle auf der KEGG-Datenbank [http://www.genome.jp/kegg/pathway.html] basierenden Stoffwechsel-/ Signalwege unter dem Überbegriff Immunsystem dar.

Immunsystem	Diätvergleich			Zeitreihen			
	4 HF/SD	8 HF/SD	12 HF/SD	4/8 SD	4/8 HF	8/12 SD	8/12 HF
Hämatopoese			↑				↑
Komplement und Koagulation	↑	↑	↑		↑		↑
Toll-like-Rezeptor Signalweg		↑	↑		↑		
Killerzellen vermittelte Zytotoxizität		↑	↑		↑	↑	↑
Antigenprozessierung und -präsentation			↑		↑		
T-Zellrezeptor Signalweg			↑				↑
B-Zellrezeptor Signalweg		↑	↑		↑		↑
Fc epsilon RI Signalweg		↑	↑		↑		
Transendotheliale Leukozytenmigration	↑	↑	↑		↑		↑

	keine Änderung
↑	signifikant erhöht
SD	Standarddiät
HF	Hochfett-Diät

Abb. 9: Regulation der Immunstoffwechselwege im weißen Fettgewebe

Dargestellt sind die Stoffwechsel-/ Signalwege der Immunklasse aus der KEGG-Datenbank (NZO: HF vs. SD) für die einzelnen Lebenswochen 4 (z.B. 4 HF/SD), 8 und 12 sowie im Zeitverlauf innerhalb einer Diätgruppe (z.B. 4/8 HF).

Betrachtet man die Regulation dieser Stoffwechselwege auf Expressionsebene genauer, so ist auffällig, dass bei allen differenziell regulierten Stoffwechsel-/ Signalwegen die Expression der Gene (grün dargestellt) im Vergleich der beiden Diätinterventionsgruppen sowie bei der Betrachtung der Zeitreihen auf der Hochfett-Diät erhöht ist. Für die Zeitreihen auf der Standarddiät (z.B. Woche 4 vs. Woche 8 beide auf Standarddiät; 4/8 SD) wurde keine differenzielle Regulation beobachtet, obwohl die Tiere zwischen Woche 4 und Woche 8 auf beiden Diäten mehr als 15 g Körpergewicht zunehmen. Eine Ausnahme stellen die Gene der „Killerzellen vermittelten Zytotoxizität“ dar, die unter der SD in der Zeitreihe 8/12 erhöht exprimiert sind. Besonders viele zwischen den beiden Diäten (HF vs. SD) differenziell exprimierte Stoffwechsel-/ Signalwege sind zum späten Zeitpunkt in Lebenswoche 12 zu beobachten. Auf Einzelgenebene tritt eine starke Zunahme für die beiden spezifischen Makrophagenmarker F4/80 und CD68 nach 5 Wochen HF-Intervention (Lebenswoche 8) im weißen Fettgewebe der untersuchten NZO-Männchen auf und nimmt bis zum Versuchsende (Lebenswoche 12) noch weiter zu (Abb. 10). Bei den untersuchten SJL-Männchen kann ebenfalls ein schwaches Signal für die beiden Makrophagenmarker beobachtet werden,

wobei in Woche 8 unter der HF-Intervention die Signalstärke lediglich ein mit der NZO-Maus (SD-Gruppe) in Woche 4 vergleichbares Niveau erreicht, sodass die sehr starke Zunahme, im Gegensatz zu den untersuchten NZO-Tieren, nicht auftritt.

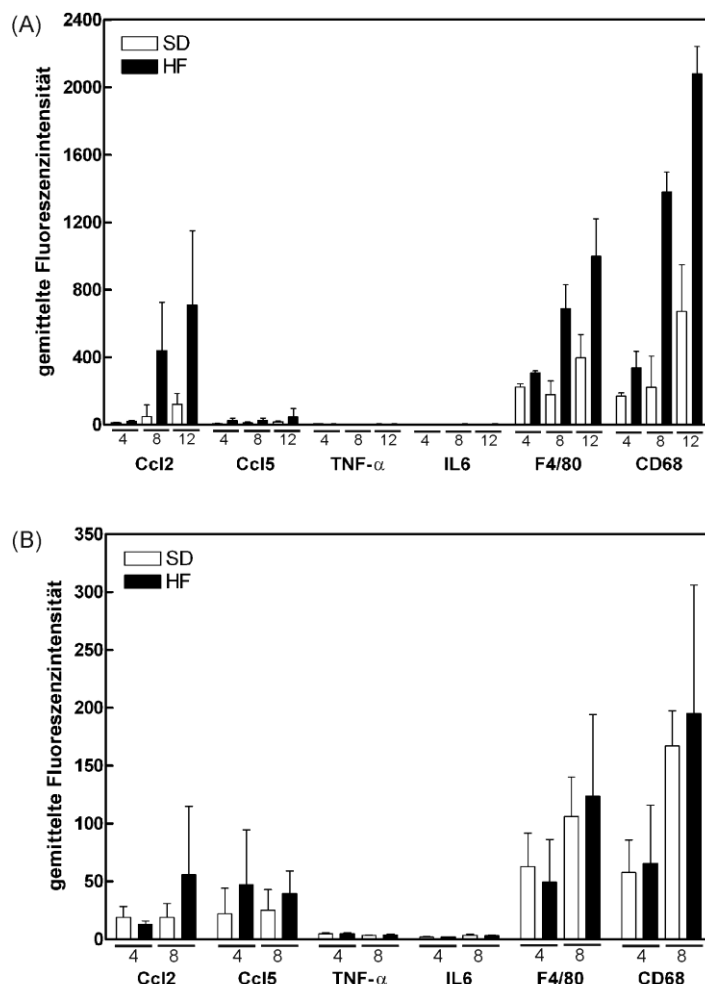


Abb. 10: Immun- und Makrophagenmarker im weißen Fettgewebe

Dargestellt ist die gemittelte Fluoreszenzintensität aus den Rohdaten der Microarrays während der Diätintervention für das weiße Fettgewebe (A) der NZO-Maus und (B) der SJL-Maus zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Zur besseren Visualisierung wurden die beiden Achsen nicht einheitlich skaliert.

Ccl2 = MCP-1; Ccl5 = RANTES; F4/80 = Emr1

NZO n = 3 - 4 Arrays pro Zeitpunkt und Diät; SJL n = 3 Arrays pro Zeitpunkt und Diät

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob es sich hierbei um Änderungen der mRNA-Spiegel begrenzt auf das weiße Fettgewebe handelt oder ob sich dies auch systemisch durch geänderte Proteinmengen einzelner zirkulierender Entzündungsmarker im Plasma nachweisen lässt. Aus diesem Grund wurden die Plasmakonzentration von IL6, TNF- α , RANTES (Ccl5) und MCP-1 (Ccl2) bestimmt (2.4.6). Tabelle 13 zeigt die gemessenen Plasmaparameter, wobei jedoch im Wesentlichen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Diätgruppen festgestellt werden konnten. Lediglich für RANTES (Ccl5), ein proinflammatorisches Zytokin, konnten in den Wochen 8 und 12

zwischen den beiden Diätgruppen signifikante Unterschiede in der Plasmakonzentration gemessen werden, die sich auf mRNA-Ebene nicht beobachten ließen. Dies zeigt, dass die durch die Hochfett-Diät auftretende Immunantwort lokal auf der Ebene der mRNA des weißen Fettgewebes begrenzt zu sein scheint. Als weiterer Parameter wurde der Insulingehalt im Plasma (2.4.4) bestimmt. Die erhaltenen Werte sind ebenfalls in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13: Gemessene Plasmaparameter der NZO-Maus

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung *post mortem* gemessen an den drei Untersuchungszeitpunkten Woche 4, 8 und 12. IL6: Interleukin 6, TNF- α : *Tumor necrosis factor-alpha*, RANTES: *Chemokine (C-C motif) ligand 5*, MCP-1: *monocyte chemoattractant protein-1*, n: Anzahl der Tiere. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigen U-Tests. *: p-Wert < 0,05

Woche 4	NZO ♂ SD	NZO ♂ HF	SD vs. HF p-Wert
Plasmainsulin [μ g/l]	1,9 \pm 1,0	4,2 \pm 1,7	0,03 *
IL6 [pg/ml]	7,9 \pm 5,1	25,4 \pm 18,2	0,13
TNF- α [pg/ml]	5,6 \pm 2,7	13,0 \pm 6,1	0,13
RANTES [pg/ml]	12,7 \pm 2,0	15,9 \pm 9,5	0,83
MCP-1 [pg/ml]	43,3 \pm 16,8	51,4 \pm 17,1	0,51
n	3 - 4	3 - 5	

Woche 8	SD	HF	p-Wert
Plasmainsulin [μ g/l]	8,0 \pm 6,2	12,8 \pm 9,4	0,36
IL6 [pg/ml]	8,9 \pm 5,0	6,3	--
TNF- α [pg/ml]	7,7 \pm 4,4	6,5 \pm 1,7	0,83
RANTES [pg/ml]	13,6 \pm 2,0	9,5 \pm 1,8	0,05 *
MCP-1 [pg/ml]	122,5 \pm 186,6	21,9 \pm 4,1	0,83
n	3 - 5	3 - 6	

Woche 12	SD	HF	p-Wert
Plasmainsulin [μ g/l]	14,3 \pm 2,7	17,5 \pm 4,0	0,17
IL6 [pg/ml]	4,5 \pm 0,6	8,0 \pm 3,9	--
TNF- α [pg/ml]	6,1 \pm 3,2	3,7	--
RANTES [pg/ml]	14,3 \pm 0,7	5,4 \pm 3,1	0,05 *
MCP-1 [pg/ml]	14,2 \pm 3,3	19,0 \pm 13,3	--
n	3 - 5	3 - 5	

3.1.8 Vergleich des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels in den Mausstämmen NZO und SJL

Parallel zu den Microarray-Analysen des weißen Fettgewebes der NZO-Maus wurden Microarray-Untersuchungen mit RNA aus dem weißen Fettgewebe des schlanken Kontrollstamms SJL durchgeführt (Dissertation Katja Leicht). Abbildung 11 vergleicht die Anzahl der durch die Hochfett-Diät in der Expression erhöhten oder erniedrigten Gene in einzelnen Stoffwechselwegen des Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus der beiden Mausstämme. Die Auswertung erfolgte nach Powelka *et al.* indem die Anzahl der Gene mit einer linearen Änderung größer 1 (erhöht) und kleiner 1 (erniedrigt) gezählt und die Anzahl der Gene anschließend im Balkendiagramm dargestellt wurde [Powelka *et al.*, 2006].

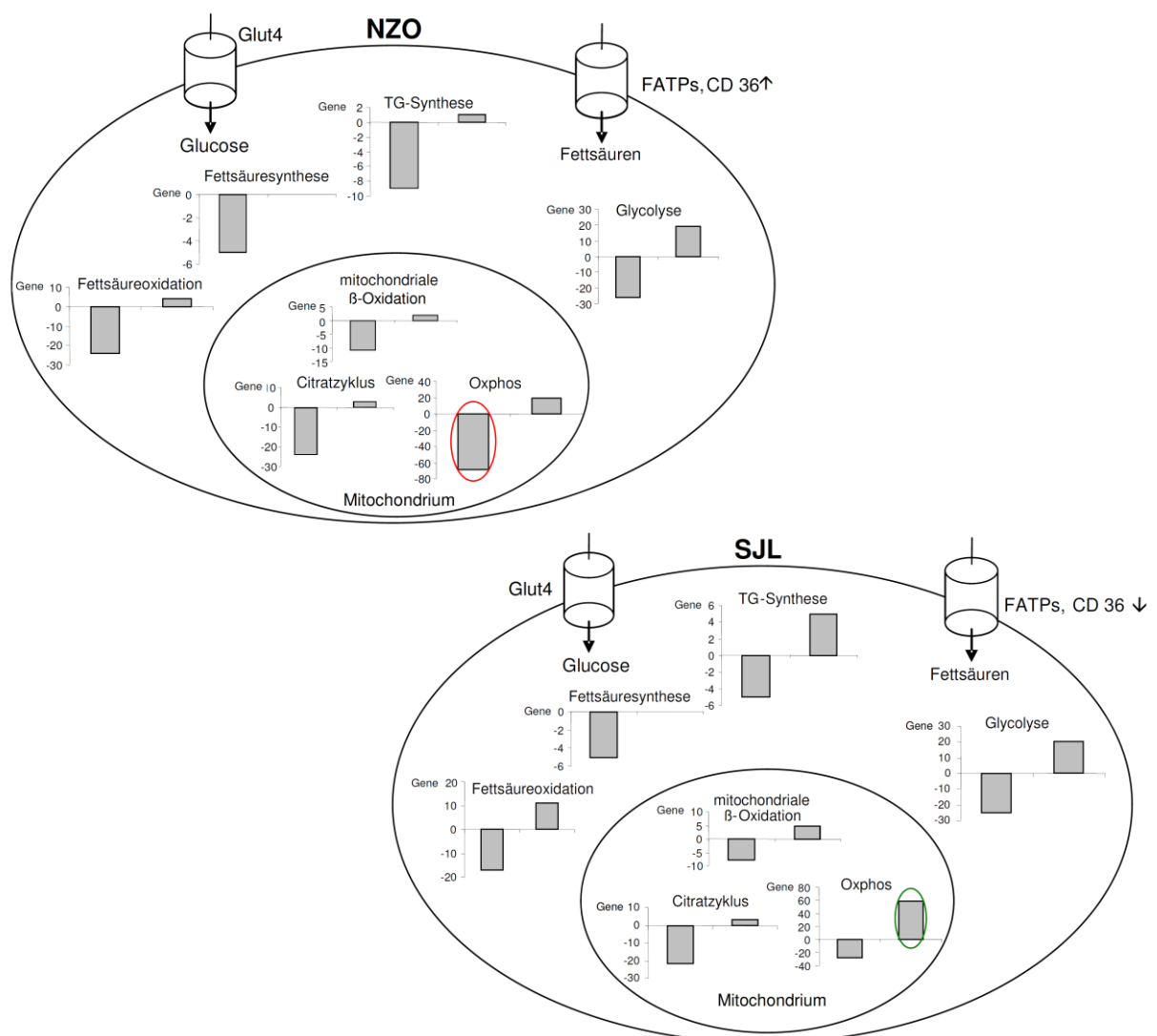


Abb. 11: Vergleich des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels der beiden Mausstämme NZO und SJL

Dargestellt ist die Anzahl der durch die Hochfett-Diät in der Expression erhöhten oder erniedrigten Gene des weißen Fettgewebes in den beiden Mausstämmen NZO und SJL in Woche 8. In der Auswertung wurden alle Gene mit einer linearen Änderung größer 1 als erhöht und kleiner 1 als erniedrigt gezählt und die Anzahl der Gene im Balkendiagramm dargestellt [Powelka *et al.*, 2006].

In Abbildung 11 ist auffällig, dass unabhängig vom Mausstamm die Expression vieler Gene aus dem Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus durch die HF erniedrigt ist. Die oxidative Phosphorylierung ist der einzige hier untersuchte Stoffwechselweg, der deutliche Unterschiede in der Expression aufweist, wobei die Expression von 62 Genen der oxidativen Phosphorylierung bei der SJL-Maus erhöht und die Expression von 68 Genen bei der NZO-Maus erniedrigt ist. Unerwarteterweise sind sich die vom Phänotyp sehr unterschiedlichen Mäuse auf der Ebene der Expression bei der untersuchten Diätintervention sehr ähnlich.

3.2 Untersuchungen zur Ursache des β -Zelluntergangs in einem alternativen Mausmodell

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten, in Anlehnung an Fütterungsstudien von Hella Jürgens im NZO-Modell, an einem neu etablierten Mausmodell (NZL) Untersuchungen zum β -Zelluntergang in den Langerhansschen Inseln durchgeführt werden [Juergens *et al.*, 2007]. Hierbei wurde eine 3 bzw. 5 Wochen andauernde Diätintervention einer kohlenhydrathaltigen Hochfett-Diät (HF, diabetogen) im Vergleich zu einer kohlenhydratrestriktiven Hochfett-Diät (CHF; protektiv) untersucht. Dabei sollte eine Methode zur schonenden Inselzellisolation etabliert werden.

3.2.1 Etablierung und Charakterisierung eines neuen Mausmodells zur Untersuchung der Genexpression in β -Zellen

Vor den Expressionsanalysen der Langerhansschen Inseln wurde der neue Mausstamm NZL, dessen Genom zu 97 % identisch mit der NZO-Maus ist, über 22 Lebenswochen auf verschiedenen Diäten phänotypisch charakterisiert. Tabelle 14 zeigt zusammenfassend für die beiden untersuchten Geschlechter die gemessenen Parameter (2.2.3) Körpergewicht, Körperfett und Blutglucose exemplarisch für die Lebenswoche 17 und die Plasmaparameter (2.4.4/ 2.4.5) Insulin, Cholesterin, Triglyceride und freie Fettsäuren sowie die Körperlänge, die *post mortem* in Woche 22 bestimmt wurden. Der Körpergewichtsverlauf sowie der Körperfettverlauf und die gemessenen Blutglucosewerte über die gesamte Charakterisierung sind im Anhang (siehe Anhang A7-A12) abgebildet.

Tab. 14: Charakterisierung der NZL-Tiere auf verschiedenen Diäten

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung gemessen in der 17. Lebenswoche. Die Plasmaparameter sowie die Körperlänge wurden *post mortem* in Woche 22 bestimmt. SD: Standarddiät, HF: Hochfett-Diät, CHF: kohlenhydratfreie Hochfett-Diät, KG: Körpergewicht, KF: Körperfett, BG: Blutglucose, KL: Körperlänge, PI: Plasmainsulin, Chol: Cholesterin, TG: Triglyceride, FFA: freie Fettsäuren, n: Anzahl der Tiere. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem (Student)-t-Test. *: p-Wert < 0,05 ; **: p-Wert < 0,0005.

Phänotypische Parameter:

Woche 17	NZL ♂	NZL ♂	NZL ♂	NZL ♀	NZL ♀	NZL ♀
	SD	HF	CHF	SD	HF	CHF
KG [g]	51,6 \pm 2,6	52,5 \pm 7,2	52,5 \pm 5,5	40,2 \pm 3,9	53,9 \pm 5,4	48,7 \pm 6,4
KF [g]	16,0 \pm 1,2	17,3 \pm 6,6	18,3 \pm 4,2	11,7 \pm 4,6	25,4 \pm 3,4	19,6 \pm 4,8
BG [mM]	19,0 \pm 6,1	17,7 \pm 10,9	6,4 \pm 1,4	8,3 \pm 1,6	9,5 \pm 4,2	6,7 \pm 1,7
n	18	16	14	14	11	12
Woche 22						
KL [cm]	11,6 \pm 0,2	11,7 \pm 0,4	11,7 \pm 0,3	11,1 \pm 0,4	11,7 \pm 0,3	11,5 \pm 0,3
PI [μ g/l]	12,2 \pm 0,8	9,4 \pm 5,7	4,9 \pm 2,6	5,4 \pm 2,8	60,1 \pm 59,8	4,5 \pm 3,0
Chol [mM]	5,7 \pm 0,7	6,4 \pm 1,7	6,7 \pm 1,0	4,7 \pm 1,0	5,9 \pm 0,9	5,1 \pm 0,8
TG [mM]	1,4 \pm 0,7	1,5 \pm 0,8	1,5 \pm 0,3	0,9 \pm 0,4	0,7 \pm 0,4	1,9 \pm 1,1
FFA [mM]	0,9 \pm 0,1	0,7 \pm 0,4	0,7 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
n	10	8	8	6	7	8

Statistische Auswertung (p-Werte):

Woche 17	NZL ♂	NZL ♂	NZL ♂	NZL ♀	NZL ♀	NZL ♀
	SD vs. HF	SD vs. CHF	HF vs. CHF	SD vs. HF	SD vs. CHF	HF vs. CHF
KG	0,685	0,624	0,957	< 0,0001 **	0,001 *	0,044 *
KF	0,433	0,063	0,613	< 0,0001 **	0,004 *	0,003 *
BG	0,683	< 0,0001 **	0,001*	0,370	0,021 *	0,057
n	18	16	14	14	11	12
Woche 22						
KL	0,571	0,310	0,980	0,008 *	0,053	0,148
PI	0,205	< 0,0001 **	0,068	0,052	0,603	0,049 *
Chol	0,323	0,035 *	0,634	0,056	0,410	0,122
TG	0,656	0,750	0,786	0,351	0,038 *	0,015 *
FFA	0,099	0,008 *	0,893	0,005 *	0,003 *	0,627
n	10	8	8	6	7	8

Bei der Körpergewichtsentwicklung (siehe Anhang A7) der männlichen Tiere wurde festgestellt, dass die NZL-Maus auf den drei untersuchten Diäten einen adipösen Phänotyp mit nahezu gleichem Körpergewicht aufweist und somit im Gegensatz zur NZO-Maus [Giesen *et al.*, 2003], keine diätinduzierte Adipositas aufzeigt. Dies wurde in einem zweiten unabhängigen Fütterungsversuch erneut über 22 Wochen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Einhergehend mit dem Körpergewicht wurden keine diätbedingten Unterschiede in der Ausprägung des Körperfettes (siehe Anhang A8) festgestellt. Die männlichen Tiere entwickelten sowohl auf der SD als auch auf der HF eine Hyperglykämie, die sich in einem Anstieg der Blutglucose zwischen Woche sechs und Woche acht zeigte und sich bis hin zur 22. Woche manifestierte (siehe Anhang A9). Im Gegensatz dazu blieben die CHF gefütterten Tiere, wie von Juergens *et al.* für die NZO-Maus publiziert, über den gesamten Versuchszeitraum normoglykämisch [Juergens *et al.*, 2007]. Die beobachtete Diabetesprävalenz (Blutglucose > 250 mg/dl (13,9 mM)) in Woche 17 lag bei den Hochfett-Diät gefütterten NZL-Männchen bei 63 %, bei den Standarddiät gefütterten Tieren bei 72 %, hingegen konnten in der CHF-Gruppe keine diabetischen Tiere beobachtet werden.

Analog zum NZO-Mausstamm zeigten die weiblichen Tiere erst zum Versuchsende eine leichte Hyperglykämie (siehe Anhang A12). Weiterhin wurde beim Körpergewicht (Körpergewichtsverlauf siehe Anhang A10) und Körperfett (Körperfettverlauf siehe Anhang A11) der Weibchen ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Diätinterventionsgruppen beobachtet. Die Körperlänge wies, mit Ausnahme der Gruppe Weibchen SD vs. HF, keine Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen auf. Bei den Plasmaparametern konnten lediglich vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Diäten festgestellt werden. z.B. weisen die SD gefütterten NZL-Männchen signifikant höhere Insulinwerte (Hyperinsulinämie) als die CHF gefütterten Männchen auf.

Bei der Reproduktivität konnte festgestellt werden, dass 87 % der NZL-Verpaarungen (n = 61 Zuchtweibchen) und nur 78 % der NZO-Verpaarungen (n = 141 Zuchtweibchen, mündliche Mitteilung R. Kluge) reproduktiv waren. Somit konnte eine erhöhte Reproduktionsrate bei den NZL-Tieren beobachtet werden, jedoch ist der Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen nicht so ausgeprägt, wie es von McInerney *et al.* publiziert wurde [McInerney *et al.*, 2004].

Betrachtet man die Einzeldaten, so bringen die NZL-Weibchen durchschnittlich 2,5 Würfe mit insgesamt 10,3 abgesetzten Jungtieren, was 4,2 Tieren pro Wurf entspricht, hervor. Bei den NZO-Weibchen werden durchschnittlich 3,0 Würfe geboren und insgesamt 12,0 Jungtiere abgesetzt, was durchschnittlich 3,9 Jungtieren pro Wurf entspricht.

Um Aussagen über die Insulinresistenz des NZL-Mausstamms machen zu können, wurden *i.p.* Glucosetoleranztests durchgeführt (2.2.3.3). Die Blutglucosewerte und die korrespondierenden Insulinwerte sind in Abbildung 12 dargestellt.

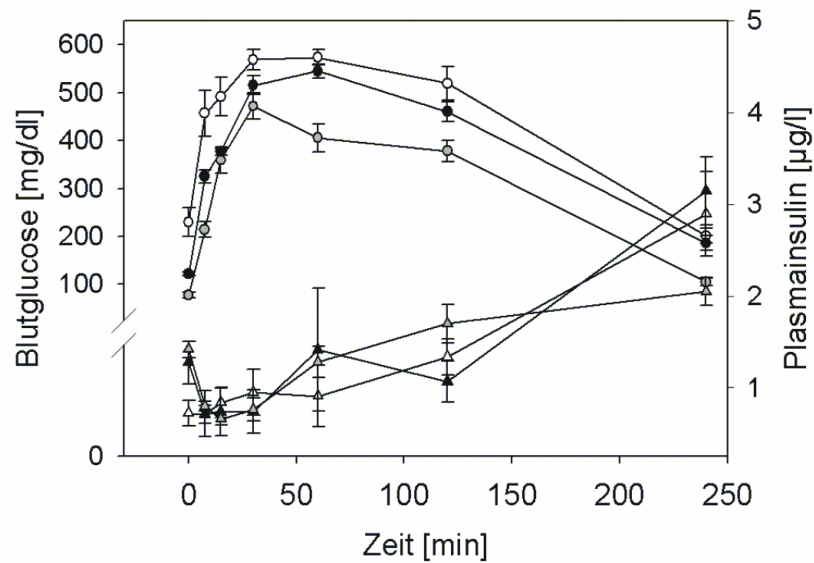


Abb. 12: *i.p.* Glucosetoleranztest der NZL-Männchen in Lebenswoche 8

Blutglucosekonzentration (runde Symbole) und die korrespondierenden Insulinwerte (dreieckige Symbole) für die verschiedenen Diäten: SD (grau), HF (schwarz) und CHF (weiß). Untersucht wurden die Tiere nach einer 16 h Fastenperiode, an die im Anschluss eine Einmaldosis von 2,0 g/kg Körpergewicht 20 %-ige Glucoselösung *i.p.* appliziert wurde.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass die männlichen NZL-Mäuse in Woche 8 auf allen drei Diäten eine gestörte Insulinwirkung aufwiesen, was sich in einer deutlich verzögerten Glucose-Clearance zeigte. Unerwartet war, dass die gemessenen Insulinspiegel zwischen 120 min und 240 min stark anstiegen. Dies könnte auf eine Insulinsekretionsstörung hindeuten. Auffällig waren auch der hohe Nüchternblutglucose-Ausgangswert bei der CHF- und der hohe Nüchterninsulinwert der SD- und HF-Gruppe nach 16-stündigem Fasten. In Anlehnung an histologische Untersuchungen im NZO-Modell (Lebenswoche 18 - 24) von Oliver Kluth wurden zusätzlich zum Glucosetoleranztest immunhistochemische Färbungen für den Glucosetransporter 2 (GLUT2) (Abb. 13 (oben)) und den Transkriptionsfaktor Foxo1 (Abb. 13 (unten)) an Pankreasschnitten durchgeführt. Hierbei sollte der β -Zellstatus nach einer kohlenhydrathaltigen Hochfett- und einer kohlenhydratfreien Hochfett-Diätintervention verglichen werden [Kluth *et al.*, 2008].

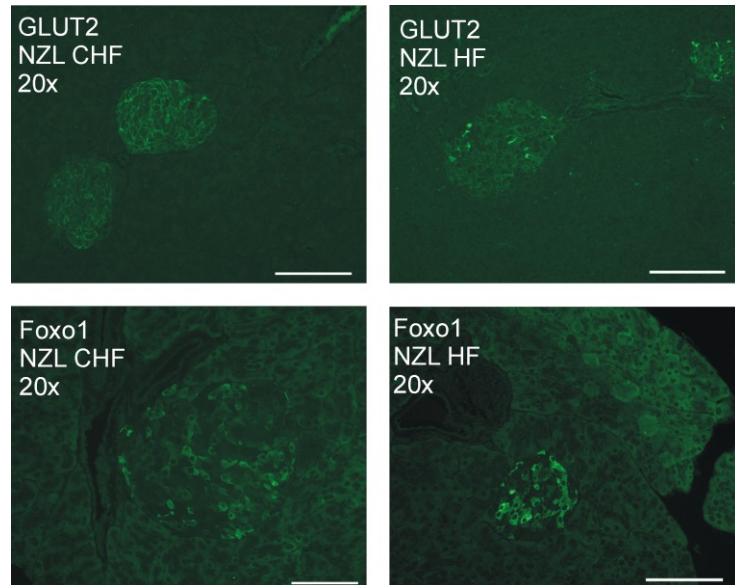


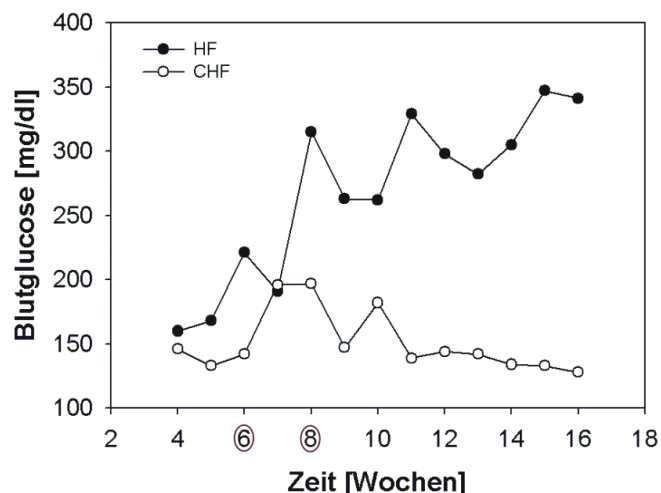
Abb. 13: Immunhistochemische Färbung des Pankreas

Dargestellt sind Paraffinschnitte (2 µm) des Gesamtpankreas (linke Spalte CHF- und rechte Spalte HF-gefütterte NZL-Männchen in Lebenswoche 8). Die obere Reihe zeigt die Expression des Glucosetransporters GLUT2, die untere Reihe die des Transkriptionsfaktors Foxo1 in einer repräsentativen Insel. Sichtbar gemacht durch die jeweiligen spezifischen Primärantikörper und einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488). Maßstab 100 µm.

An den histologischen Schnitten wird deutlich, dass durch die HF die Menge an nachweisbarem GLUT2 gegenüber der CHF-Gruppe deutlich verringert ist. Für Foxo1 konnte kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Allerdings scheint etwas mehr Foxo1-Protein in den Inseln der HF-Gruppe detektierbar zu sein.

3.2.2 Auswertung der Microarrays aus der isolierten Insel-RNA

Um die diätabhängige Genexpression in den β-Zellen untersuchen zu können, wurde das Versuchsdesign so gewählt, dass die verwendeten NZL-Tiere nach dem Absatz in Woche 3 direkt auf die beiden zu untersuchenden Diäten (kohlenhydrathaltige Hochfett-Diät (HF) und kohlenhydratfreie Hochfett-Diät (CHF)) aufgeteilt wurden. Für die Microarrayanalyse wurden die Zeitpunkte Woche 6 (2 Arrays je Diätgruppe) und 8 (3 Arrays je Diätgruppe) gewählt, da beobachtet wurde, dass in diesem Zeitraum die Blutglucosespiegel ansteigen (Abb. 14) und genau diese frühe Phase in der Diabetesentwicklung genauer betrachtet werden sollte.



Woche		4	5	6	7	8
HF	KG [g]	23,2 ± 4,7	34,1 ± 6,7	40,0 ± 7,0	41,2 ± 8,5	46,7 ± 6,9
CHF	KG [g]	19,5 ± 5,0	28,1 ± 1,8	33,4 ± 1,7	39,1 ± 0,3	42,3 ± 2,3
HF	KF [g]	4,6 ± 1,7	4,0 ± 2,8	10,6 ± 3,7	12,1 ± 4,5	14,4 ± 4,7
CHF	KF [g]	2,6 ± 0,6	4,0 ± 0,6	6,1 ± 0,5	9,5 ± 0,7	10,5 ± 1,6
HF	BG [mM]	9,1 ± 1,8	12,7 ± 2,8	13,1 ± 5,2	12,8 ± 6,3	19,5 ± 4,7
CHF	BG [mM]	7,3 ± 4,3	10,4 ± 2,6	9,6 ± 0,5	10,4 ± 0,9	9,5 ± 3,0

Abb. 14: Versuchsdesign zu den Untersuchungen an den isolierten Langerhansschen Inseln und phänotypische Parameter der für die Arrays verwendeten NZL-Mäuse

Dargestellt ist der Blutglucoseverlauf der Hochfett-Diät (HF) gefütterten und der kohlenhydratfreien Hochfett-Diät (CHF) gefütterten NZL-Männchen für die Wochen 4 - 16. Die roten Kreise markieren die Zeitpunkte, an denen die isolierte RNA aus den Langerhansschen Inseln von männlichen NZL-Mäusen isoliert und auf Affymetrix GeneChips® hybridisiert wurde. Zusätzlich sind die jeweiligen phänotypischen Parameter (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 5 Tiere je Diätgruppe) der für die Arrays verwendeten NZL-Männchen gezeigt.

Um die Expressionsunterschiede zwischen der diabetogenen HF und der protektiven CHF genauer untersuchen zu können, sollte nicht das gesamte Pankreas untersucht, sondern eine Methode zur schonenden Isolierung von Inselzellen etabliert werden. In Kooperation mit Zorica Jovanovic (AG S. O’Rahilly, Universität Cambridge, UK) wurden Langerhanssche Inseln mittels *Laser capture microdissection*-Technologie aus den Pankreata der beiden Interventionsgruppen für die Wochen 6 und 8 isoliert (2.5.3). Trotz des mehrstufigen Prozesses der Färbung und Isolierung war die gewonnene RNA mit einer *RNA integrity number* (RIN; Software Algorithmus zur Klassifizierung der RNA-Qualität) von durchschnittlich 4,6 von ausreichender Qualität um auf Microarray-GeneChips hybridisiert zu werden [Schroeder *et al.*, 2006].

Die Hybridisierung wurde von der SignatureDiagnostics AG (Potsdam) durchgeführt. Die Vorverarbeitung der erhaltenen Microarray-Daten wurde durch Axel Rasche (MPI für molekulare Genetik; Berlin-Dahlem) basierend auf der Ensembl-Datenbank (e!46)

vorgenommen. Dabei wurden Gene als differenziell exprimiert betrachtet, wenn die folgenden Kriterien erfüllt waren [Rasche *et al.*, 2008]:

- Das Gen muss bezogen auf die *presence tags/ detection calls* entweder in der Kontroll- (CHF) oder in der Behandlungsgruppe (HF) mit einem p-Wert unter 0,05 (Wilcoxon-Test) exprimiert sein.
- Das Verhältnis der Genexpression zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe muss mindestens 4/3 oder maximal 3/4 betragen.
- Der Welch-Test (angepasster t-Test; die Standardabweichungen der beiden untersuchten Gruppen kann unterschiedlich groß sein) muss zwischen den zwei Proben signifikant mit einem p-Wert kleiner 0,05 sein.

Aus den vorverarbeiteten Daten konnten 1397 Gene bestimmt werden, deren Expression durch die Diät mehr als den Faktor 2 in beide Richtungen geändert wurde. Auszüge aus den daraus resultierenden Listen sind im Anhang (siehe A13 - A16) dargestellt. Ausgehend von dieser Zahl konnten 1039 Gene (776 Gene: in der Expression erhöht in Woche 8; 167 Gene in der Expression erniedrigt in Woche 8) einer Annotation entweder in der *Gene Ontology*-Datenbank (GO; beschreibt Gene z.B. nach biologischen Prozessen, molekularer Funktion) [<http://www.geneontology.org/>] oder der KEGG-Datenbank [<http://www.genome.jp/kegg/>] zugeordnet werden. Die restlichen 358 Gene konnten in keiner der beiden Datenbanken einer eindeutigen Annotation und somit keiner biologischen Funktion zugeordnet werden. Aus den annotierten Genen wurden diejenigen weiterbetrachtet, die in der NCBI *Pubmed* basierten Datenbank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] *Gene References Into Function* (Genrif) einen Eintrag für die Schlüsselwörter „*islet*“, „*pancreas*“ oder „*β-cell*“ aufwiesen. Hierfür wurden die gesamten Genrif-Einträge aus der NCBI-Datenbank geladen (ca. 161000) und nach den aufgeführten Schlüsselwörtern durchsucht. Dabei konnten 1257 Gen-Einträge (1812 Publikations-Einträge), die für die oben aufgeführten Begriffe annotiert sind, identifiziert werden. Abbildung 15 zeigt die Eingrenzung der so ermittelten Kandidatengene.

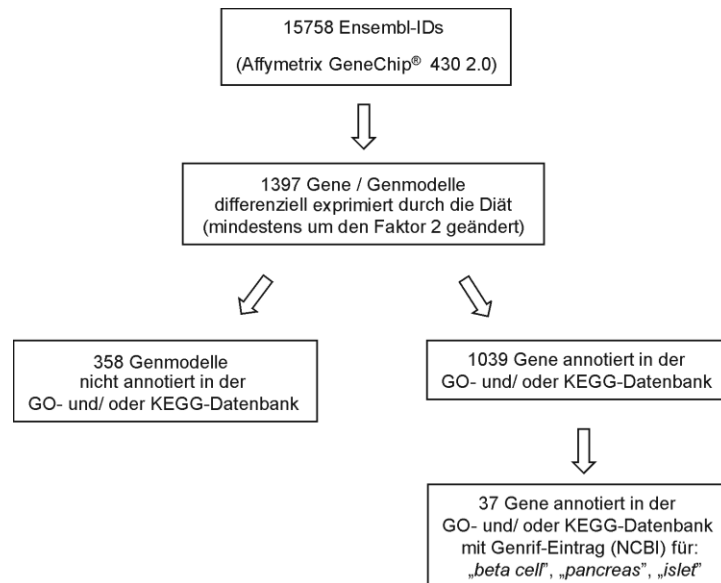


Abb. 15: Übersichtsdiagramm zur Eingrenzung der Kandidatengene

Basierend auf der Ensembl-Datenbank (e!46), wurden die 45101 Affymetrix Probesets auf 15758 korrespondierende Ensembl-Gene eingegrenzt. Anschließend wurden nur die als differenziell exprimiert (siehe 2.6.2) betrachteten Gene in der Analyse weiter mit einbezogen. Im nächsten Schritt wurden nur noch solche Gene untersucht, welche entweder in der GO- oder KEGG-Datenbank als annotiert gelten. Diese wurden dann in einer literaturbasierten Suche auf einen vorhandenen NCBI Genrif-Eintrag für die Schlagwörter „*islet*“, „*pancreas*“ oder „*β-cell*“ abgeglichen.

Die erhaltenen 37 Kandidatengene wurden in die vier Kategorien „Enzyme und Metabolismus“, „Inflammation“, „Insulinsekretion“ und „Pankreas/ Inselentwicklung“ geordnet [Sandhu *et al.*, 2007]. Tabelle 15 zeigt die Zuordnung der Gene in die jeweilige Gruppe, sowie die Änderung der Expressionsstärke zwischen den beiden untersuchten Diäten für die Wochen 6 und 8 (z.B. ist in Woche 6 *Scd1* in der HF-Gruppe 2,7-fach stärker exprimiert als in der CHF-Gruppe).

Tab. 15: Zusammenfassung der durch die Diät regulierten Kandidatengene

Die identifizierten Gene wurden in die Kategorien: Enzyme und Metabolismus, Inflammation, Insulinsekretion, Pankreas/ Inselentwicklung nach Sandhu *et al.* 2007 geordnet. Die aufgeführte Liste wurde um die in unserer Studie differenziell exprimierten Gene aus der Publikation von Sandhu *et al.* ergänzt [Sandhu *et al.*, 2007].

Dargestellt sind die jeweiligen linearen Änderungen zwischen der Hochfett-Diät und der kohlenhydratfreien Hochfett-Diät für die Lebenswochen 6 und 8. Die Expression der hervorgehobenen Gene wurden nochmals mittels *Real-Time-PCR* validiert (siehe Abb. 16).

Enzyme und Metabolismus				Inflammation			
erhöht	erniedrigt	HF vs. CHF		erhöht	erniedrigt	HF vs. CHF	
		wk 6	wk 8			wk 6	wk 8
Scd1		2,72	2,82	<i>Cd44</i>		3,84	2,92
<i>Prdx2</i>		2,15	2,22	<i>Vip</i>	<i>Vip</i>	0,50	2,86
<i>Pnliprp2</i>			2,42	<i>Socs3</i>		2,07	
<i>Pnlip</i>			2,31	<i>Ptprc</i>		1,98	2,31
	Mlxipl	0,30	0,27		<i>Ptges</i>	0,49	0,70
<i>Cat</i>		2,02	1,99	<i>Cuzd1</i>	<i>Cuzd1</i>	0,39	2,42
				<i>Ctss</i>		14,05	12,54

Insulinsekretion				Pankreas/ Inselentwicklung			
erhöht	erniedrigt	HF vs. CHF		erhöht	erniedrigt	HF vs. CHF	
		wk 6	wk 8			wk 6	wk 8
<i>Vti1b</i>		2,23	1,66		<i>Vipr1</i>	0,20	
<i>Vamp8</i>		2,29	3,90	Tmem27		2,23	1,81
	<i>Ucn3</i>	0,60	0,40	<i>Pcbd2</i>		2,51	2,20
Txnip		1,98	6,88		<i>Pax6</i>	0,50	0,50
<i>Sycn</i>			2,76	<i>Ifitm3</i>		1,65	2,07
<i>Scg5</i>		2,64	2,52	<i>Hdac2</i>		1,88	2,25
	<i>Ppp1r1a</i>	0,47	0,33	<i>Frk</i>		2,61	2,39
Pcsk2		2,28	1,63	<i>Egf</i>		2,63	1,77
<i>Pcsk1</i>		2,65	2,42	<i>Cops5</i>		2,12	2,60
	<i>Nnat</i>	0,42			<i>Cdkn1b</i>	0,45	0,39
	<i>Kcnn3</i>	0,50		<i>Cdkn1a</i>		2,41	1,83
<i>Ids</i>		2,72	2,80	Cck		6,16	11,83
<i>Cdc42</i>		2,10	2,35				
	Cacna1d	0,47	0,49				
<i>Adipor1</i>		1,95	2,11				

3.2.3 Validierung der Ergebnisse mittels quantitativer *Real-Time-PCR*

Aufgrund des geringen Restmaterials nach der Hybridisierung der Arrays wurde die noch vorhandene aus den Langerhansschen Inseln isolierte RNA mittels Reverser-Transcriptase in eine Omniplex[®] *cDNA* Bibliothek umgeschrieben. Diese wurde anschließend in einer *PCR*-Reaktion amplifiziert, um mittels *Real-Time-PCR* (2.3.10) einige differenziell exprimierte Kandidatengene zu validieren (in Tabelle 15 hervorgehoben dargestellt). Hierbei wurde bei der Auswahl zum einen die Änderung der Expression zwischen den beiden Diäten herangezogen, zum anderen wurden auch gut dokumentierte Gene berücksichtigt (z.B. *Pcsk2*, eine bei der Insulinprozessierung beteiligte Endopeptidase; der Ca²⁺-Kanal

Cacna1d; *Cck*, ein im Magen-Darm-Trakt sezerniertes Neuropeptid). Die Ergebnisse der *Real-Time-PCR* zeigten (Abb. 16 (A)), dass sich die erhaltenen Ergebnisse aus den Array-Analysen der Langerhansschen Inseln, mit Ausnahme von *Txnip*, bestätigen ließen.

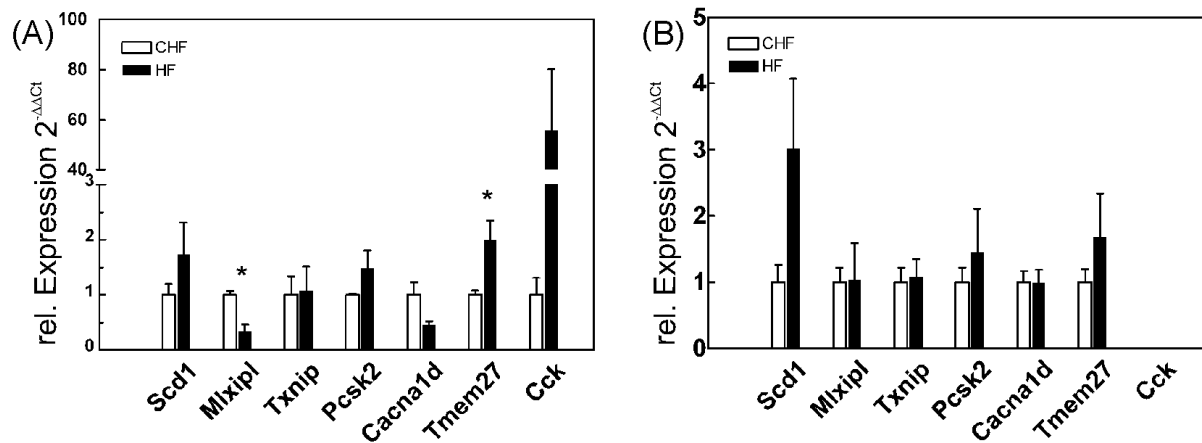


Abb. 16: Validierung der Arrayergebnisse mittels *Real-Time-PCR*

Relative Expression, ausgewertet nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode, normalisiert auf die endogene Kontrolle *Actb*. (A) amplifizierte Inselzell-RNA (n: 5 NZL-Männchen / Diät, Woche 6 und 8), (B) Gesamtpankreas RNA (n: 5 NZL-Männchen / Diät, Woche 8). Dargestellt in weiß die CHF-Gruppe und in schwarz die HF-Gruppe [Livak *et al.*, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002]. *: $p < 0,05$ (HF vs. CHF)

Parallel dazu wurde die Expression der gleichen Gene auch mit RNA des ganzen Pankreas untersucht, um feststellen zu können, ob sich das Expressionsmuster zwischen dem aus exokrinen Teil und endokrinen Teil bestehenden Gesamtpankreas und den isolierten Langerhansschen Inseln unterscheidet (Abb. 16 (B)). Betrachtet man die Abbildung, so wird ersichtlich, dass einige der untersuchten Gene durch die Diätintervention ähnlich reguliert werden (*Scd1*). Jedoch wird für den Großteil der Gene deutlich, dass es zwischen den isolierten Inselzellen und dem Gesamtpankreas erhebliche Unterschiede im Expressionsmuster gibt. Für *Cck* konnte mit der verwendeten TaqMan-Sonde kein Amplifikat im Gesamtpankreas detektiert werden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, welche der Kandidatengene spezifisch in den Langerhansschen Inseln exprimiert werden. Hierfür wurden die erhaltenen Ct-Werte der *Real-Time-PCR* für das Gesamtpankreas denen der Langerhansschen Inseln gegenübergestellt (Abb. 17).

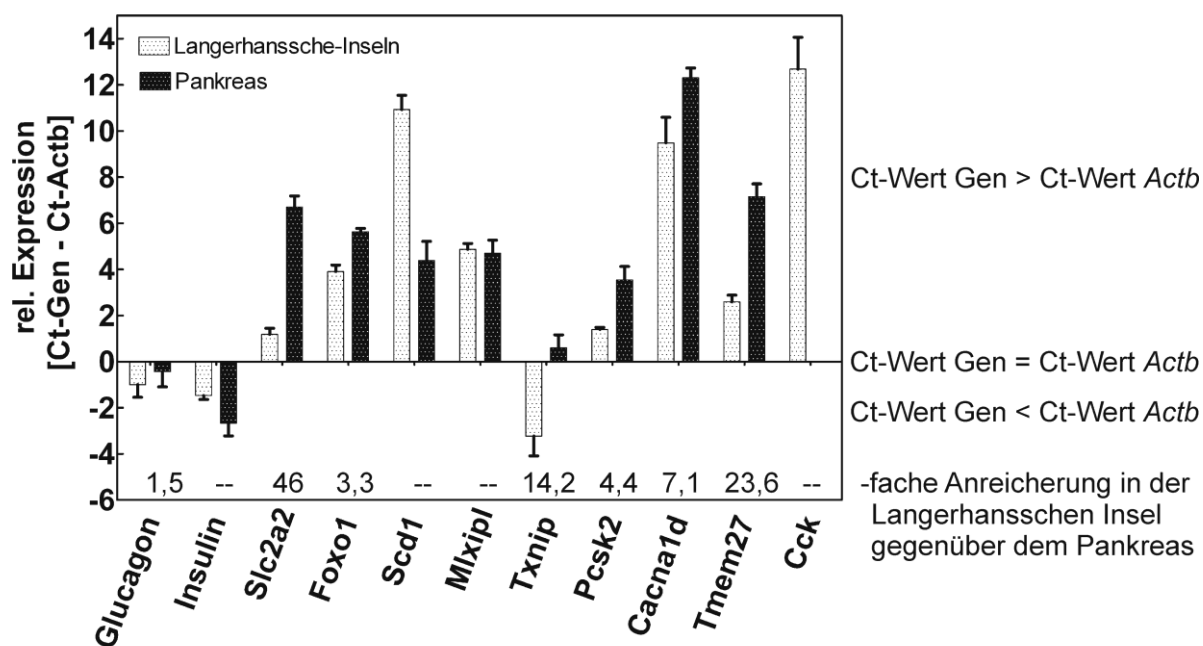


Abb. 17: Expressionsvergleich zwischen den Langerhansschen Inseln und dem Gesamtpankreas

Dargestellt sind die gemittelten Ct-Werte der untersuchten Gene für die Langerhansschen Inseln (hellgrau) und das Gesamtpankreas (dunkelgrau) normalisiert auf die endogene Kontrolle *Actb*. Negative Werte stellen eine höhere Expression des jeweiligen Gens im Vergleich zu *Actb* dar. Die Zahlenwerte geben den Anreicherungsfaktor in der Langerhansschen Insel an.

Dabei wird deutlich, dass *Glucagon*, *Insulin* aber auch *Txnip* in den beiden untersuchten Geweben stärker als die endogene Kontrolle *Actb* exprimiert werden (negative Werte). Ferner wird deutlich, dass mit Ausnahme von *Insulin*, *Scd1* und *Mlxipl* alle untersuchten Gene stärker in den Langerhansschen Inseln exprimiert werden (niedrigere Ct-Werte) als im Gesamtpankreas und man von einer Anreicherung in den Inselzellen sprechen kann. Für *Mlxipl* konnte kein Unterschied zwischen Gesamtpankreas und isolierter Insel beobachtet werden. Für *Cholecystokin* (*Cck*) konnte keine Gegenüberstellung erfolgen, da die verwendete TaqMan-Sonde kein Amplifikat im Gesamtpankreas ergab und somit kein Signal detektiert werden konnte.

3.2.4 *Mlxipl* als diätreguliertes Gen in der Inselzelle?

Mlxipl ist auch unter dem Namen *carbohydrate response element binding protein* (ChREBP) bekannt und in der Leber als Transkriptionsfaktor beschrieben [Uyeda *et al.*, 2006; Postic *et al.*, 2007]. ChREBP wird glucoseabhängig aktiviert und führt zur Expression lipogener Gene (z.B. *Pklr*, *Scd1*, *malic enzyme*) in der Leber und somit zur Umwandlung von Glucose in Fettsäuren. Da es in der Literatur wenige Hinweise über die Expression im Pankreas bzw. der Langerhansschen Insel gibt [Wang *et al.*, 2002; da Silva Xavier *et al.*, 2006], die Arrayanalysen aber eine 3,78-fach schwächere Expression in den HF-Tiere als den CHF-Tieren in Woche 8 zeigten, sollte nun mittels Histologie untersucht werden, ob sich *Mlxipl*/ChREBP auch auf Proteinebene im Pankreas bzw. der Langerhansschen Insel nachweisen lässt.

3.2.4.1 Histologische Untersuchung zur Verteilung von ChREBP im Gesamtpankreas

Zum Nachweis von *Mlxipl* auf Proteinebene wurden Paraffinschnitte des Gesamtpankreas eingesetzt (2.7.1). Um der hohen Kreuzreaktivität der Inselzellen Rechnung zu tragen, wurde als Kontrolle ein *blocking peptide* verwendet und dieses mit dem verwendeten Antikörper vorinkubiert (2.7.2), um ein falsch-positives Ergebnis auszuschließen. Beim verwendeten *blocking peptide* handelt es sich um das Epitop gegen welches das Kaninchen immunisiert wurde. Abbildung 18 zeigt Gesamtpankreasschnitte mit einer Doppelfärbung Hämatoxylin (Kernfärbung) und DAB⁺ (ChREBP).

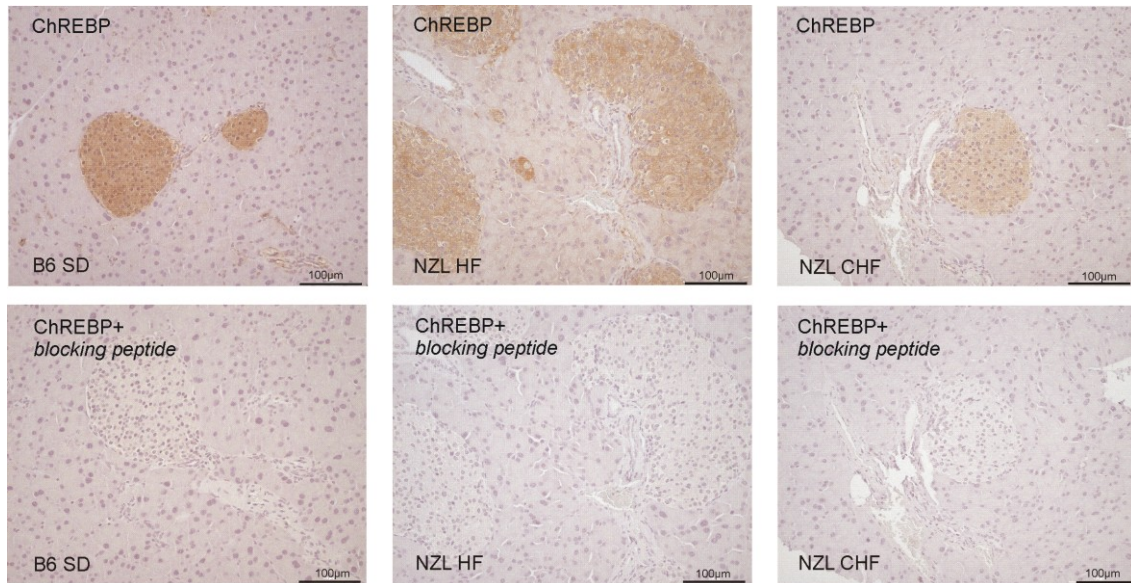


Abb. 18: Verteilung von ChREBP im Gesamtpankreas

Untersucht wurde die Verteilung von ChREBP mit und ohne Inkubation mit dem entsprechenden *blocking peptide* auf 2 µm dicken Paraffin-Gesamtpankreasschnitten. Im Anschluss wurde eine Hämatoxylinfärbung zur Visualisierung der Zellkerne durchgeführt. In der linken Spalte sind Schnitte eines Kontrolltiers (B6) gezeigt, in der mittleren Spalte die eines NZL-Tiers aus der Hochfett-Diät (HF) Gruppe und in der rechten Spalte aus der kohlenhydratfreien Hochfett-Diät (CHF) Gruppe. In der oberen Reihe sind Gesamtpankreasschnitte mit Langerhansschen Inseln bei einer 20-fachen Vergrößerung gezeigt. In der unteren Reihe sind die gleichen Bereiche im Folgeschnitt gezeigt, jedoch wurde hier mit dem *blocking peptide* vorinkubiert.

An den histologischen Schnitten wird deutlich, dass *Mlx1p* auch auf Proteinebene spezifisch in den Langerhansschen Inseln nachzuweisen ist. Da bei der Verwendung des *blocking peptides* kein Signal erhalten wurde, kann davon ausgegangen werden, dass das in den Inselzellen detektierte Signal spezifisch ist. Für den exokrinen Teil des Pankreas konnte keine spezifische Färbung detektiert werden. Über die Verteilung von ChREBP innerhalb der Zelle (Cytosol/ Zellkern) ließen sich mit den verfügbaren Präparaten keine Aussagen treffen. Nachfolgend sollte untersucht werden, welche Rolle ChREBP in der Langerhansschen Insel spielt.

3.2.4.2 Untersuchung der bekannten *Mlx1p* Zielgene

Da es möglich war, *Mlx1p* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in der Inselzelle spezifisch nachzuweisen und *Mlx1p* eine wichtige Rolle bei der Regulation von lipogenen Genen in der Leber spielt sowie bei der Entstehung der Glucolipotoxizität in der β-Zelle beteiligt sein könnte, sollte im nächsten Schritt die Expression der verschiedenen in der Leber bekannten Zielgene (z.B. *Leber-Pyruvatkinase (Pklr)*, *Scd1*, *Malatenzym* [Uyeda et al., 2006]) von *Mlx1p* in Abhängigkeit von der Diät mittels *Real-Time-PCR* untersucht werden [da Silva Xavier et al., 2006].

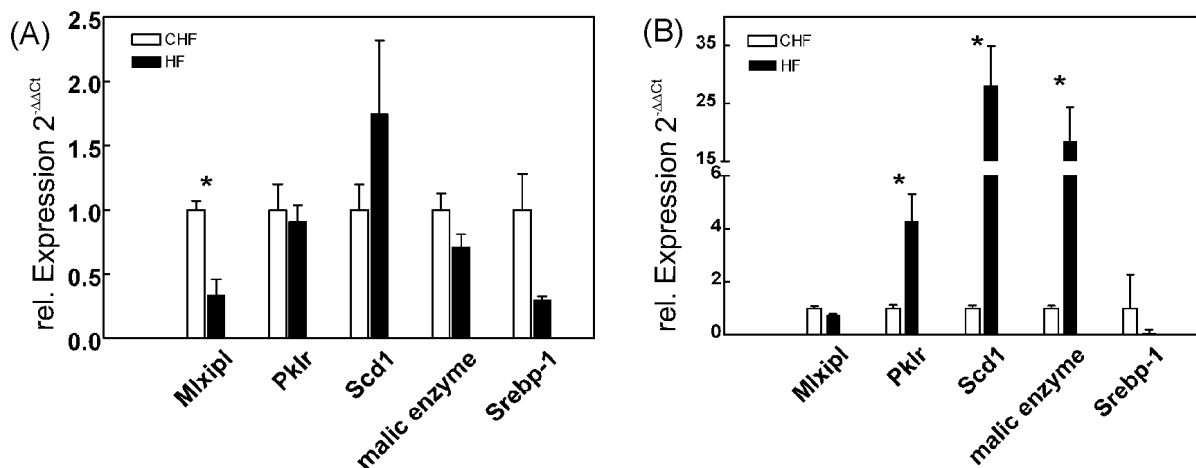


Abb. 19: Expressionsmuster der bekannten Zielgene von *Mlxipl*

Dargestellt sind die Ergebnisse der *Real-Time-PCR* nach der Normalisierung auf *Actb*. Untersucht wurde jeweils die isolierte RNA (NZL-Männchen, Woche 6 und 8) aus den Inseln von fünf Einzel-Pankreata je Diätgruppe (A). Nach der Isolation wurde die Insel-RNA amplifiziert und die cDNA direkt zur Expressionsuntersuchung eingesetzt. (B) zeigt die Expression in den Lebern der identischen Mäuse. Ausgewertet nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode [Livak *et al.*, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002]. *: $p < 0,05$ (HF vs. CHF)

Abbildung 19 (A) zeigt die Unterschiede in der Expression der Zielgene in Inselzellen zwischen der protektiven CHF und der diabetogenen HF für die bekannten Zielgene von *Mlxipl* aus der Leber. Da jedoch nicht wie erwartet eine erniedrigte Expression durch die HF festgestellt werden konnte, wurde in den gleichen Tieren die Expression in der Leber auf den Einfluss der Diätintervention auf die *Mlxipl* Zielgene untersucht (Abb. 19 (B)). Hier zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression der bekannten *Mlxipl* Zielgene durch die HF, wobei *Mlxipl* selbst nur einen geringen Expressionsunterschied zwischen der HF und der CHF aufweist. Da der *sterol regulatory element binding transcription factor 1* (*Srebp-1*) ebenso wie *Mlxipl* einen Einfluss auf die Lipogenese hat, wurde auch dessen Expression in beiden Geweben getestet und ebenfalls eine erniedrigte Expression durch die HF detektiert.

3.2.5 *Cck* als diätreguliertes Gen in der Inselzelle

Ein weiteres Kandidatengen aus den Arrayanalysen der Langerhansschen Inseln, dessen Expression durch die Hochfett-Diät stark erhöht wurde (11,8-fach), ist *Cholecystokinin* (*Cck*). Es handelt sich hierbei um ein Peptidhormon, welches primär im Magen-Darm-Trakt produziert wird und für die Freisetzung pankreatischer Enzyme verantwortlich ist [Chandra *et al.*, 2007]. In den *Real-Time-PCR*-Analysen konnte *Cck* nur in den Langerhansschen Inseln, jedoch nicht im Gesamtpankreas nachgewiesen werden (Abb. 16).

3.2.5.1 Histologischer Nachweis von Cck im Gesamtpankreas

Da die *Cck*-mRNA durch zwei unabhängige Methoden (*Real-Time-PCR* im 5'-Bereich/*Affymetrix Probesets* im 3'-Bereich) in den Inselzellen nachgewiesen werden konnte, sollte nun versucht werden, *Cck* auch auf Proteinebene in den Inselzellen zu detektieren [Schweiger *et al.*, 2005]. Hierfür sollten mittels Paraformaldehyd fixierte Paraffinschnitte des Gesamtpankreas und zwei unterschiedliche kommerziell erworbene Antikörper verwendet werden (2.7.1/ 2.7.2). Es war jedoch nicht möglich ein spezifisches Signal für *Cck* in Langerhansschen Inseln bzw. im exokrinen Teil des Pankreas zu erhalten (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurde versucht *Cck* in Duodenumschnitten, dem primären Produktionsort (I-Zellen), nachzuweisen. Es war jedoch auch hier nicht möglich, ein spezifisches Signal in der Immunhistochemie zu detektieren.

3.2.6 Untersuchung zu differenziell regulierten Stoffwechselwegen

Um Aussagen über die durch die Gabe der verschiedenen Diäten hervorgerufene Stoffwechselsituation machen zu können, wurden die Daten des Microarray-Versuchs der Inselzellen nun auf signifikant differenziell regulierte Stoffwechselwege hin analysiert. Dafür wurden Anreicherungsanalysen mit Hilfe der hypergeometrischen Verteilung durchgeführt um die Anhäufung einer bestimmten Funktionsklasse in den differenziell exprimierten Genen zu beurteilen. Die Schnittmenge der differenziell exprimierten Gene mit der gewählten Funktionsklasse wurde mit der Schnittmenge von zwei zufällig gewählten Mengen gleicher Stärke aus der Grundgesamtheit verglichen (durchgeführt von A. Rasche MPI, Berlin Dahlem).

Tabelle 16 zeigt all diejenigen Stoffwechselwege, die in beiden untersuchten Wochen durch die Diätintervention signifikant geändert sind sowie die Anzahl der geänderten Gene und die Gesamtanzahl der den Stoffwechselwegen zugrunde liegenden Gene.

Tab. 16: Signifikant regulierte Stoffwechselwege für die Wochen 6 und 8

Dargestellt sind die p-Werte, die Anzahl der signifikant regulierten Gene je Zeitpunkt sowie die Gesamtgenanzahl des jeweiligen Stoffwechselweges und der übergeordneten Stoffwechselklasse, basierend auf der KEGG-Datenbank.

Stoffwechselklasse	Stoffwechselweg	wk6 p-Wert	sig. reg. Gene / wk6	wk8 p-Wert	sig. reg. Gene / wk8	Gene / Stoff- wechselweg
Energiemetabolismus	Oxidative Phosphorylierung	6,64E-13	62	5,18E-14	55	96
Faltung, Sortierung und Abbau	Proteasom	6,71E-05	17	1,27E-08	19	25
Translation	Ribosom	0,0216	11	8,86E-05	13	21
Lipidmetabolismus	Biosynthese von Steroiden	0,0154	8	0,00233	8	13
Aminosäurestoffwechsel	Glutamatmetabolismus	0,00587	15	0,0105	12	28
Biosynthese von sek. Metaboliten	Terpenoidbiosynthese	0,0249	3	0,0105	3	3
Abbau und Metabolismus von Xenobiotica	Benzoatabbau durch CoA-Ligation	0,0455	11	0,017	10	23
Energiemetabolismus	Reduktiver Carboxylat-Zyklus	0,0186	7	0,0183	6	11
Metabolismus anderer Aminosäuren	Glutathionmetabolismus	0,00847	17	0,0228	13	34
Glycanbiosynthese und -metabolismus	Glycanstrukturbiosynthese 1	0,0257	35	0,0652	26	89

Bei der Betrachtung der *Pathway*-Analysen ist auffällig, dass die oxidative Phosphorylierung, der Proteasom-Stoffwechsel sowie der Ribosom-Stoffwechsel hochsignifikant zwischen den beiden untersuchten Diäten (HF vs. CHF) geändert sind. Bei allen drei Stoffwechselwegen liegt die Anzahl der signifikant regulierten Gene über 50 % (Oxphos: 57,3 % 50 Gene in der Expression erhöht und 5 Gene in der Expression erniedrigt in Woche 8; Proteasom: 76,0 % alle 19 differenziell exprimierten Gene in Woche 8 sind in der Expression erhöht; Ribosom: 61,9 % 12 Gene in der Expression erhöht und 1 Gen in der Expression erniedrigt in Woche 8).

3.3 Vergleich von Kandidatengen aus den humanen genomweiten Assoziationsstudien mit den Microarray-Daten aus den Langerhansschen Inseln

Da im vorliegenden Modell durch die Diätintervention (kohlenhydrathaltige Hochfett-Diät) ein Diabetes induziert werden konnte, sollten nun die vorliegenden Microarray-Daten aus den isolierten Langerhansschen Inseln auf Übereinstimmungen mit den humanen genomweiten Assoziationsstudien (GWA) für Typ-2-Diabetes untersucht werden, um Gene der frühen Diabetesentwicklung zu identifizieren. Bei den durchgeführten humanen genomweiten Assoziationsstudien wurden einzelne Polymorphismen mit dem Auftreten von verschiedenen Krankheiten wie z.B. Typ-2-Diabetes korreliert [Saxena *et al.*, 2007; Zeggini *et al.*, 2007].

Für die von uns durchgeführten Analysen wurden die freiverfügbaren humanen Daten der *Broad DGI T2D*-Studie [<http://www.broad.mit.edu/node/562>] und der *WTCCC*-Studie [<http://www.wtccc.org.uk/>] kombiniert. Für die weitere Analyse (Abb. 20) wurden nur all jene humanen *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) betrachtet (873 SNPs), die in beiden Studien eine signifikante Assoziation mit T2DM zeigten.

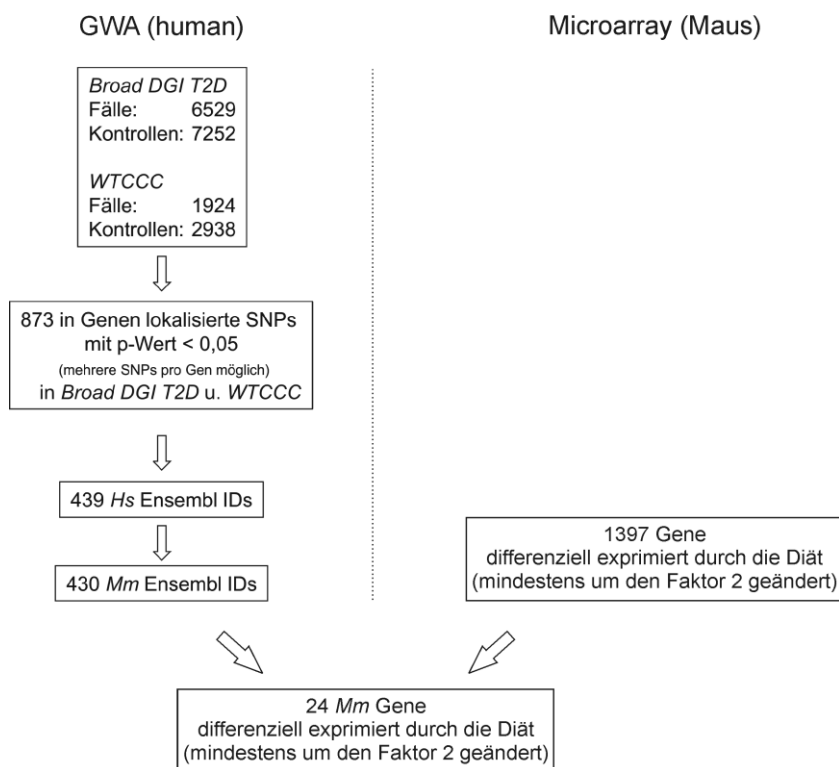


Abb. 20: Identifikation von diätregulierten Genen in der Inselzelle der NZL-Maus mit Assoziation zu den GWA (*Broad DGI T2D* und *WTCCC*)

Aus den frei verfügbaren Daten der beiden Studien wurden nur die SNPs betrachtet, die in beiden Studien signifikant mit Typ-2-Diabetes assoziiert waren. Im Anschluss wurden die zu den SNPs korrespondierenden humanen Gene ermittelt. Durch eine *Biomart* gestützte *compara homology*-Suche [<http://www.ensembl.org/biomart/index.html>] wurden die orthologen Mausgene identifiziert. Aus diesem Set von Genen wurden die in der Inselzellstudie differenziell regulierten Gene, die durch die Diätintervention mindestens um den Faktor zwei geändert waren, ermittelt.

Im nächsten Schritt wurden mittels dem auf der Ensembl-Homepage [<http://www.ensembl.org/biomart/index.html>] freiverfügbaren *Webtool BioMart*, über die SNP-ID (z.B. rs52588528 [A/G in *Tcf7l2*]) die entsprechenden humanen Gene (439 Gene) identifiziert, um abschließend die orthologen Mausgene (430 Gene) zu erhalten. Mit dem so gewonnenen Datensatz wurden die Microarray-Daten abgeglichen. Es konnten 24 Gene, die durch die Diabetes induzierende bzw. protektive Diät in den Inselzellen differenziell reguliert und in den beiden GWA-Studien signifikant mit Type-2-Diabetes assoziiert sind, ermittelt werden. Tabelle 17 zeigt diese Gene mit den dazugehörigen linearen Änderungen für die beiden untersuchten Wochen, sowie die den Originaldaten entnommenen Informationen zu den SNPs.

Tab. 17: Gegenüberstellung der differenziell regulierten Gene aus den Langerhansschen Inseln mit den korrespondierenden Daten aus den genomweiten Assoziationsstudien
 Dargestellt ist die lineare Änderung zwischen den untersuchten Diäten in den Wochen 6 und 8 sowie die SNP-Referenzen.

Aus der *Broad DGI T2D*-Studie: Z-pval = p-Werte aus dem Z-score-Test (Statistik für die Populations-/ Familien-Meta-Analyse); OR-CMH = Odds ratio für den Cochran-Mantel-Haenszel-Test; Aus der WTCCC-Studie: add: additives Modell; gen: generelles Modell

Gen-Symbol	Änderung in Woche 6	Änderung in Woche 8	SNP-ID	Broad DGI T2D		WTCCC	
				Z-pval	OR-CMH	p-Wert add	p-Wert gen
Dach1	0,328	0,341	rs7991293	0,019	1,469	0,337	0,010
<i>Xkr6</i>	0,420	0,623	rs7016385	0,033	1,115	0,019	0,034
Clip2	0,427	0,430	rs2528994	0,020	1,118	0,021	0,069
			rs512023	0,029	1,098	0,042	0,123
<i>BC050210</i>	0,460	0,632	rs6707255	0,008	0,886	0,035	0,105
Cacna1d	0,469	0,487	rs12487452	0,018	0,796	0,024	0,075
<i>Camkk2</i>	0,474	0,537	rs9805130	0,004	0,841	0,044	0,074
Igf2bp2	0,515	0,459	rs4402960	0,034	1,110	0,002	0,007
			rs7651090	0,039	1,103	0,002	0,007
<i>Phactr1</i>	0,638	0,401	rs17617584	0,027	0,770	0,048	0,106
			rs9296486	0,009	0,794	0,043	0,126
			rs9296488	0,011	0,799	0,032	0,094
			rs9349350	0,012	0,802	0,023	0,071
			rs9357503	0,033	0,837	0,028	0,082
			rs9381439	0,013	0,804	0,035	0,102
Chd2	0,723	0,393	rs1406712	0,039	1,379	0,023	0,048
<i>D12Etd551e</i>	2,018	1,336	rs3816465	0,037	1,198	0,115	0,009
Sil1	2,035	1,746	rs1560656	0,022	0,871	0,206	0,042
<i>Tmem135</i>	2,087		rs10898589	0,018	1,428	0,044	0,128
			rs10898590	0,013	1,449	0,009	0,019
<i>Stxbp6</i>	2,336	1,654	rs17257773	0,006	1,352	0,517	0,024
<i>H2-Ea</i>	2,359	1,676	rs7194	0,041	0,872	0,045	0,110
<i>Igf2r</i>	2,439	1,478	rs10945645	0,007	0,780	0,952	0,039
			rs3798197	0,028	0,869	0,153	0,032
			rs9295119	0,040	0,836	0,782	0,012
Plekha1	2,663	2,124	rs17103541	0,023	1,303	0,028	0,045
<i>Tacr3</i>	2,928	1,409	rs1384401	0,011	0,828	0,015	0,018
			rs5005634	0,011	0,835	0,011	0,015
			rs7663664	0,009	0,821	0,010	0,018
Pdia3	3,160	3,585	rs8040336	0,012	0,852	0,045	0,059
<i>Pkib</i>	3,238	1,655	rs17084680	0,025	1,085	0,614	0,025
<i>Cobll1</i>	3,283	1,815	rs6717858	0,027	0,892	0,026	0,073
Ldlrad3	4,513	5,756	rs12361738	0,020	0,869	0,023	0,066
Tspan8	5,060	4,033	rs10506625	0,019	0,860	0,00007	0,00035
			rs10506626	0,015	1,146	0,00002	0,00007
			rs11178648	0,014	1,158	0,00005	0,00021
			rs2270584	0,012	1,146	0,00002	0,00010
<i>Qpct</i>	5,869	2,725	rs2255991	0,029	1,368	0,01805	0,01805
<i>Spg11</i>		0,474	rs10152685	0,021	1,501	0,00006	0,00006

Auch hier sollten die erhaltenen Expressionsunterschiede aus den Arrayanalysen durch eine unabhängige Methode validiert werden. Aus diesem Grund wurde die Expression der in Tabelle 17 hervorgehobenen Gene nochmals mittels *Real-Time-PCR* für die beiden Diäten HF und CHF bestimmt. Dabei wurde als Auswahlkriterium die Änderung zwischen den beiden Zeitpunkten (Woche 6 und 8), sowie die aktuelle Literatur herangezogen [Sanghera *et al.*, 2008].

3.3.1 Validierung der Kandidatengene aus den GWA

Um die Ergebnisse der Microarray-Analysen in den Langerhansschen Inseln zu verifizieren, wurde die Expression ausgewählter Gene mit Hilfe der *Real-Time-PCR* bestimmt. Abbildung 21 (A) zeigt die Expressionsunterschiede zwischen der HF und der CHF in den Langerhansschen Inseln. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 21 (B) das Expressionsmuster des Gesamtpankreas dargestellt.

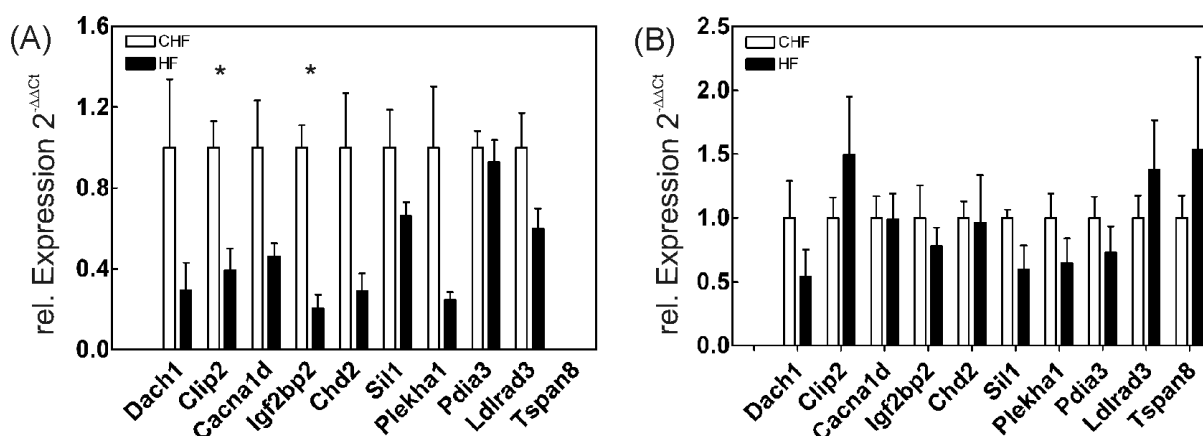


Abb. 21: *Real-Time-PCR*-Ergebnisse der aus dem Vergleich der genomweiten Assoziationsstudien erhaltenen Gene

Gezeigt ist die relative Expression der durch die Diät differenziell regulierten Kandidatengene aus den GWA (A) Inselzell-RNA (Woche 6 und 8, n = 5 NZL-Männchen / Diätgruppe) im Vergleich zum (B) Gesamtpankreas (Woche 8, n = 5 NZL-Männchen / Diätgruppe). Ausgewertet nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode [Livak *et al.*, 2001; Vandesompele *et al.*, 2002]. Normalisiert auf die endogene Kontrolle *Actb*. *: p < 0,05 (HF vs. CHF)

Es konnte mittels *Real-Time-PCR* bestätigt werden, dass die Gene *Dach1* (30,3-fach in der Langerhansschen Insel gegenüber des Gesamtpankreas angereichert), *Clip2* (26,4-fach), *Cacna1d* (7,1-fach), *Igf2bp2* (76,0-fach) und *Chd2* (3,6-fach) durch die HF eine, im Gegensatz zur CHF erniedrigte, Expression aufweisen. Jedoch war es für die Gene *Ldlrad3*, *Tspan8*, *Sil1*, *Plekha1* und *Pdia3* nicht möglich, die erhöhte Expression durch die HF im Gegensatz zur CHF nachzuweisen. Mit der kommerziell erworbenen TaqMan-Sonde konnte mit der isolierten Insel-RNA kein Amplifikat für *Tspan8* nachgewiesen werden. Für das

Gesamtpankreas konnten lediglich die Ergebnisse der Arrayanalyse für *Dach1*, *Igf2bp2*, *Ldlrad3* und *Tspan8* bestätigt werden.

4 Diskussion

4.1 Microarray-Analysen des weißen Fettgewebes der NZO-Maus – Identifizierung von Kandidatengen für die Adipositas

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Verabreichung einer Hochfett-Diät zu einer reduzierten Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung im weißen Fettgewebe von NZO-Mäusen kommt. Dabei ist die Anzahl und die Morphologie der Mitochondrien unverändert. Für die schlanke SJL-Maus wurde hingegen eine erhöhte Expression dieser Gene im weißen Fettgewebe beobachtet. Dies legt den Schluss einer zentrale Rolle der oxidativen Phosphorylierung bei der Entstehung der Adipositas/ Insulinresistenz im weißen Fettgewebe nahe. Zusätzlich zu den Microarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den beobachteten entzündlichen Veränderungen im weißen Fettgewebe der NZO-Maus um eine lokale Reaktion in diesem Gewebe handelt, da die untersuchten Entzündungsmarker im Plasma nicht erhöht waren.

4.1.1 Die Diätintervention führt zu spezifischen Änderungen im Expressionsprofil des weißen Fettgewebes von NZO-Mäusen

Im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Expressionsstudien, in denen zumeist monogene Mausmodelle (*ob/ob*- und *db/db*-Mäuse) untersucht wurden [Rong *et al.*, 2007], sollten in der vorliegenden Arbeit Expressionsprofile anhand eines polygenen Mausmodells für Adipositas und Diabetes, der NZO-Maus, erstellt werden. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, welche Gene bei der diabetogenen Hochfett-Diät (HF; 14,6% Fettanteil) im Vergleich zur Standarddiät (SD; 3,3% Fettanteil) im weißen Fettgewebe differenziell exprimiert werden. Zudem wurde die Zeitabhängigkeit der Genexpression im Zeitraum von Lebenswoche 4 bis 12 analysiert. Die, mit Hilfe der Microarray-Technologie identifizierten, differenziell regulierten Gene und Stoffwechselwege sollten neue Hinweise auf den Pathomechanismus der Adipositas und der daraus entstehenden Insulinresistenz liefern [Al-Hasani *et al.*, 2005].

Aus den Analysen der Microarray-Daten resultieren 226 im weißen Fettgewebe differenziell regulierte Gene mit einer linearen Änderung der Expression um mindestens den Faktor zwei in mindestens einer untersuchten Woche. Dies macht deutlich, dass es, bedingt durch die hohe Anzahl an geänderten Genen und die relativ niedrigen Veränderungen der Expression, nur sehr schwer möglich ist, einzelne Kandidatengene zu identifizieren. Aus diesem Grund sollte, losgelöst von der Einzelgenebene, ein systembiologischer Ansatz, nämlich die Analyse komplexer Stoffwechselwege untersucht werden, da bereits kleine Änderungen in einer Vielzahl an Genen einen großen Effekt auf den Gesamtstoffwechselweg haben können

[Lusis *et al.*, 2008]. Bei den durchgeführten *Pathway*-Analysen stellte sich heraus, dass vor allem die Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung durch die Hochfett-Diät signifikant erniedrigt wurde (Tab. 12). Dies konnte mittels quantitativer *Real-Time-PCR* bestätigt werden (Abb. 5), mit der sowohl Gene aus Komplex III (*Uqcrc2*), der so genannten *Cytochrom-c-Reduktase*, als auch aus Komplex IV (*Cox8a*; *Cox8b*), der *Cytochrom-c-Oxidase*, validiert wurden. Diese Enzyme katalysieren die Translokation von Protonen aus dem Matrix- in den Intermembranraum und führen somit zum Aufbau eines Protonengradienten. Eine verminderte Expression dieser Gene kann zu einer verminderten ATP-Verfügbarkeit führen, was die erhöhte Expression der in Komplex V codierten Gene (*Atp6v1b2*, *Atp6v0d2*) als Kompensationsreaktion erklären könnte.

Beim Menschen sind Änderungen in der oxidativen Phosphorylierung im Skelettmuskel bereits seit mehreren Jahren bekannt. Dabei soll eine verminderte oxidative Phosphorylierung im Muskel in einem kausalen Zusammenhang mit erhöhten Mengen von intramyozellulären Lipiden und der beobachteten Insulinresistenz stehen [Petersen *et al.*, 2003]. Ferner wurde über eine inverse Beziehung von oxidativer Phosphorylierung und dem Körpergewicht sowie der Suszeptibilität für Adipositas berichtet [Pomplun *et al.*, 2007]. Über die Regulation der oxidativen Phosphorylierung im weißen Fettgewebe bei der Adipositas ist hingegen nur wenig bekannt, sodass die im polygenen Mausmodell gewonnenen Ergebnisse neue Einblicke in die Bedeutung der oxidativen Phosphorylierung bei der Entwicklung der Insulinresistenz und des T2DM liefern können.

Um diese Expressionsunterschiede in der oxidativen Phosphorylierung im weißen Fettgewebe der NZO-Tiere besser erklären zu können, wurde sowohl die Mitochondrienanzahl als auch deren Morphologie untersucht. Hierfür wurde die DNA aus dem weißen Fettgewebe isoliert und mittels PCR ein mitochondrial codiertes Gen (*NADH dehydrogenase subunit 2*) amplifiziert. Über die Bandenintensität konnte auf die Mitochondrienanzahl rückgeschlossen werden.

Choo *et al.* führten in einer neueren Untersuchung ebenfalls Experimente zur Genexpression im WAT von diabetischen, Leptinrezeptor defizienten *db/db*-Mäusen durch. In diesem monogenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein reduzierter mtDNA-Gehalt in Adipozyten von *db/db*-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen mit der Entwicklung von T2DM korreliert [Choo *et al.*, 2006]. Hingegen konnten im polygenen NZO-Mausmodell weder in der Mitochondrienanzahl/ dem mtDNA-Gehalt (*ND2*-Amplifikation, Abb. 6) noch bei der Mitochondrienstruktur (Abb. 7) Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Diäten festgestellt werden. Eine erniedrigte *ND2*-Amplifikation konnte zudem weder zu einem späteren Zeitpunkt (Woche 22) zwischen den beiden untersuchten Diäten noch zwischen dem adipösen NZO-Mausmodell und dem schlanken SJL-Modell für das weiße Fettgewebe detektiert werden. Die Rolle von Leptin in der Regulation der mitochondrialen Funktion im

braunen Fettgewebe ist bereits seit langem bekannt [Klaus, 2001]. Man kann daher spekulieren, dass die Reduktion der Mitochondrienzahl im weißen Fettgewebe von *db/db*-Mäusen auf den Leptinrezeptordefekt dieses Modells zurückgeht und im polygenen NZO-Modell nicht in diesem Ausmaß reproduziert werden kann. Dennoch weisen beide Experimente, die hier demonstrierte Reduktion von Genen der oxidativen Phosphorylierung und die reduzierte Zahl von Mitochondrien bei *db/db*-Mäusen auf eine mögliche pathomechanistisch wichtige Funktion bei der Entstehung der Insulinresistenz hin.

Da *PGC-1 α* bei der Regulation der oxidativen Phosphorylierung eine wichtige Rolle spielt [Attie *et al.*, 2003], wurde zusätzlich untersucht, ob *PGC-1 α* in den Microarray-Daten der NZO-Tiere differenziell exprimiert ist. Es konnte jedoch keine, durch die Diätintervention hervorgerufene, Änderung in der Expression von *PGC-1 α* im weißen Fettgewebe beobachtet werden, wie es für den Skelettmuskel von C57B1/6J-Mäusen beschrieben wurde [Sparks *et al.* 2005; Semple *et al.*, 2004]. Ob es zu anderen posttranslationalen Modifikation wie z.B. Acetylierungen oder Phosphorylierungen kommt [Wang *et al.*, 2008], wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Obwohl auch in der aktuellen Literatur Änderungen in der oxidativen Phosphorylierung und der Expression von *PGC-1 α* im Skelettmuskel beschrieben werden [Mootha *et al.*, 2003, Pirinen *et al.*, 2007], sind Veränderungen in der Mitochondrienanzahl und -struktur umstritten [Sparks *et al.*, 2006; Boushel *et al.*, 2007].

Bei den Untersuchungen zur Mitochondrienstruktur wurde beobachtet, dass es besonders in Hochfett-gefütterten Tieren Probleme bereitet, elektronenmikroskopische Schnitte anzufertigen, da die Aufarbeitung des Gewebes durch den hohen Fettanteil technisch schwierig ist. Der Mitochondrienanteil im weißen Fettgewebe ist im Gegensatz zum braunen Fettgewebe stark reduziert. Es konnten jedoch keine strukturellen Unterschiede beobachtet werden, die auf eine Fehlfunktion der Mitochondrien hindeuten würden.

Ein weiterer Ansatz war es, zu untersuchen, ob durch die Änderungen der oxidativen Phosphorylierung vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden, was auf eine Funktionsstörung der Mitochondrien schließen lassen würde. Dies könnte wiederum zu Modifikationen in der Proteinzusammensetzung im weißen Fettgewebe oder zur Insulinresistenz führen [Houstis *et al.*, 2006]. Welchen Einfluss die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies auf den Gesamtorganismus haben, wird noch kontrovers diskutiert [Schulz *et al.*, 2007]. Um dies zu untersuchen, wurde ein Gesamtproteinlysate aus dem weißen Fettgewebe gewonnen. Die Proteine wurden an den Carbonylgruppen derivatisiert (2,4-Dinitrophenylhydrazin zu 2,4-Dinitrophenylhydrazonen) und über einen Derivatisierungsblot („Oxyblot“, Abb. 8) sichtbar gemacht, um durch ROS induzierte Proteinmodifikationen detektieren zu können. Es konnten jedoch keine unterschiedlichen Modifikationen an einzelnen Proteinen im Gesamtproteinlysate zwischen den Standarddiät-

und den Hochfett-Diät gefütterten Tieren innerhalb des NZO-Stammes gefunden werden. Tatsächlich fand sich ein Intensitätsunterschied bei einer 70 kDa Bande zwischen dem adipösen NZO-Stamm und den schlanken Kontrollstämmen C57BL/6 und SJL. Das Fehlen dieser Bande, das auf eine erhöhte Oxidation des Proteins im NZO-Stamm hindeutet, wurde jedoch nicht näher untersucht, da kein Unterschied im Zusammenhang mit der Diät auftrat. Dies liegt entweder daran, dass die Änderungen in der oxidativen Phosphorylierung durch die Hochfett-Diät keine Auswirkungen auf die ROS-Entstehung im weißen Fettgewebe haben oder dass die gebildete ROS-Menge zu gering ist (geringe Anzahl an Mitochondrien im weißen Fettgewebe) um die Auswirkungen mit der angewandten Methode zu detektieren. Ob die erniedrigte oxidative Phosphorylierung im weißen Fettgewebe der Hochfett-gefütterten NZO-Männchen evtl. Auswirkungen auf das Energiepotenzial der Fettzellen hat, konnte durch die Experimente nicht geklärt werden. Das mitochondriale Membranpotenzial könnte aber durch eine Färbung mit dem JC-1-Farbstoff untersucht werden. Dies ist jedoch im Zellverband schwierig und funktioniert besser in Einzelzellen wie z.B. Spermien oder in 3T3-L1 Adipozyten [Gawlik *et al.*, 2008]. Es stellt sich nun die Frage, welche Rolle die beobachteten Expressionsänderungen in der oxidativen Phosphorylierung spielen. Durch den geringen Mitochondrienanteil könnte es zu einer veränderten ATP-Verfügbarkeit im weißen Fettgewebe kommen, was z.B. die Transportprozesse in den Adipozyten beeinträchtigen könnte. Dies muss in weiterführenden funktionellen Untersuchungen geklärt werden.

4.1.2 Vergleich der Genexpression im WAT der beiden Mausstämme SJL und NZO

Parallel zu den Expressionsanalysen des weißen Fettgewebes der NZO-Maus wurde mittels Microarray-Technologie die Diätintervention (HF vs. SD) am weißen Fettgewebe der schlanken, gegenüber der diätinduzierten Adipositas resistenten SJL-Maus untersucht. Beide Mausmodelle unterscheiden sich bei der Diätintervention gravierend im Phänotyp, wie Körpergewicht (Woche 12 HF: NZO 56,4 g vs. SJL 25,5 g) und Körperfettanteil (Woche 12 HF: NZO 26,8 g vs. SJL 2,9 g) belegen. Im Versuch sollten dementsprechend differenziell exprimierte Gene identifiziert werden, die stammspezifisch durch die Hochfett-Diät reguliert werden. Bei der Gegenüberstellung einzelner Stoffwechselwege des Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus der beiden Stämme (Abb. 11) wurde jedoch deutlich, dass mit Ausnahme der Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung, die in den beiden Mausstämmen invers reguliert ist, keine wesentlichen Unterschiede in der Expression anderer Gene für die genannten Stoffwechselwege vorliegen.

Die biologische Relevanz der invers regulierten oxidativen Phosphorylierung im weißen Fettgewebe muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Es ist jedoch wahrscheinlich,

dass eine verminderte Kapazität der oxidativen Phosphorylierung funktionelle Veränderungen im Fettzellstoffwechsel bedingt, die sowohl den Energiestoffwechsel als auch die Adipokinsynthese, -prozessierung und -sekretion umfassen könnten.

Zusätzlich zur veränderten Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung konnte im adipösen polygenen NZO-Modell eine erniedrigte Expression lipogener Enzyme (Fettsäure- und Triglyceridsynthese; Abb. 11) beobachtet werden. Der überraschende Befund, dass Adipositas mit einer verminderten Expression von Genen der Lipidspeicherung im weißen Fettgewebe einhergeht, wurde bereits vor mehreren Jahren von der Gruppe um Alan Attie publiziert, die Expressionsanalysen mit schlanken C57BL/6J-Mäusen, Adipositas sensitiven BTBR-Mäusen und monogenetisch adipösen *ob/ob*-Tieren durchgeführt hat [Nadler *et al.*, 2000]. Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass eine verminderte Fettspeicherung bei Adipositas ursächlich sein könnte für erhöhte ektopische Fetteinlagerung, Hepatosteatose und Insulinresistenz. Dieser Befund kann nun auch für das polygene Adipositasmodell bestätigt werden und weist auf eine inadäquate Fettspeicherung im weißen Fettgewebe der NZO-Maus unter der HF-Intervention hin, die verantwortlich für die beobachteten Fetteinlagerungen in der Leber und dem Pankreas sein könnte.

Interessanterweise findet sich in der HF-Gruppe bei der schlanken SJL-Maus ebenfalls eine reduzierte Expression von Genen der Fettsäuresynthese, nicht aber der Triglyceridsynthese (Abb. 11). Zusammen mit der durch die fettreiche Diät induzierten Erhöhung der oxidativen Phosphorylierung bewirkt die vermehrte Speicherung der Fettsäuren anscheinend einen effektiven Schutz vor Lipideinlagerungen und lipidinduzierter Insulinresistenz. Dies stimmt mit metabolischen Daten von, von der SJL-Maus abgeleiteten, Mauslinien überein, die einen erniedrigten respiratorischen Quotienten *in vivo* und eine erhöhte Fettaufnahme und -verbrennung im isolierten Skelettmuskel zeigen [Chadt *et al.*, 2008].

4.1.3 Die Rolle der Entzündungsreaktion im weißen Fettgewebe bei der Entstehung metabolischer Erkrankungen

Zusätzlich zu der durch die Diätintervention erniedrigten Expression der Gene für die oxidative Phosphorylierung wurde in den *Pathway*-Analysen beobachtet, dass die Gene der mit dem Immunsystem assoziierten Stoffwechselwege (z.B. Komplement und Koagulation, T-Zellrezeptor Stoffwechsel) durch die Hochfett-Diät signifikant erhöht exprimiert wurden (Tab. 12). Es ist seit mehreren Jahren bekannt, dass es bei chronischer Adipositas und daher fortschreitender Insulinresistenz zur Infiltration von Makrophagen ins Fettgewebe und zur Sekretion inflammatorischer Zytokine kommt [Weisberg *et al.*, 2003].

Dies konnte mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten nun auch für das polygene NZO-Mausmodell belegt werden. So wurde für den spezifischen

Makrophagen-Oberflächenmarker F4/80 (*Emr1*) ab Lebenswoche 8 eine deutliche Zunahme in der Expression durch die HF-Intervention beobachtet. Dies belegt eine Infiltration von Makrophagen in das weiße Fettgewebe (Abb. 10). Zusätzlich zu den Expressionsdaten wurden die Plasmakonzentrationen der Entzündungsmarker IL6, TNF- α , RANTES und MCP-1 (Tab. 13) bestimmt. Hierbei wurden keine erhöhten Plasmaspiegel beobachtet, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den entzündlichen Vorgängen um einen auf das weiße Fettgewebe beschränkten Prozess handelt, wie es bereits in der Literatur beschrieben ist [Blüher *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008]. Allerdings kann mit den durchgeführten Untersuchungen nicht unterschieden werden, ob die entzündlichen Vorgänge durch in den Adipozyten ablaufende Prozesse oder, wie in der Literatur beschrieben, durch infiltrierende Makrophagen ausgelöst werden.

Insgesamt wurde eine deutliche HF-induzierte Zunahme der Expression immunassoziierter Gene und Makrophagenmarker zu den späteren Untersuchungszeitpunkten (ab Woche 8) beobachtet; die Unterschiede in der Genexpression in Woche 4 waren vernachlässigbar gering. Dies legt den Schluss nahe, dass die Immunantwort im weißen Fettgewebe keine akute Reaktion des Gewebes auf den Diätstimulus darstellt, sondern sich erst nach 5 Wochen Intervention einstellt (Abb. 10). Die bereits zu frühen Zeitpunkten beobachtete Insulinresistenz der NZO-Maus [Ortlepp *et al.*, 2000] ist somit durch das inflammatorische Geschehen im WAT nicht erklärt.

4.1.4 Microarray-Analysen als Werkzeug zur Untersuchung des komplexen weißen Fettgewebes

Betrachtet man die Ergebnisse des Microarray-Versuchs unter der Diätintervention für das weiße Fettgewebe im polygenen NZO-Mausstamm, so muss festgestellt werden, dass es schwierig ist, ein Mischgewebe bestehend aus Adipozyten, Präadipozyten und infiltrierten Makrophagen zu untersuchen, da sich die Expressionsdaten nicht immer einem Zelltyp zuordnen lassen (z.B. IL6). Des Weiteren wurde durch die HF-Diätintervention nur eine milde Hyperglykämie ausgelöst, die offenbar keine großen Änderungen auf der Ebene der Expression auslöst. Der Unterschied im Fettanteil (14,6 %, w/w) bzw. der metabolisierbaren Energiedichte (15,3 MJ/kg) in der Hochfett-Diät (Tab. 4) ist im Vergleich zur verwendeten Standarddiät (3,3 %, w/w; 12,8 MJ/kg) verhältnismäßig gering. Dies könnte dazu geführt haben, dass zwar viele in der Expression geänderte Gene, jedoch nur mit geringen Expressionsunterschieden zwischen den beiden untersuchten Diäten identifiziert werden konnten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die diabetogene Hochfett-Diät bei der NZO-Maus eine erniedrigte Expression nukleärer Gene für die oxidative Phosphorylierung im weißen Fettgewebe induziert. Zudem bewirkt die Intervention eine erniedrigte Expression

von lipogenen Enzymen im weißen Fettgewebe, ein Befund, der auf eine inadäquate Fettspeicherung und -verwertung bei diesem Mausmodell hindeutet. Die verminderte Fettspeicherung und -oxidation ist spezifisch für das adipöse NZO-Modell und konnte bei der schlanken SJL-Maus nicht beobachtet werden, was auf eine mögliche Beteiligung an der Entstehung der Insulinresistenz hinweist. Zusätzlich wurde bestätigt, dass die Expansion des Fettgewebes eine zeitlich verzögerte Infiltration von Makrophagen in das weiße Fettgewebe und dort eine lokale Immunantwort auslöst.

4.2 Microarray-Analysen in isolierten Langerhansschen Inseln – Identifizierung von Kandidatengen für Typ-2-Diabetes

Im zweiten Teil der Arbeit wurden durch den Einsatz einer laserbasierten Mikropräparation Zellen aus Langerhansschen Inseln von mit kohlenhydrathaltiger (diabetogen) und kohlenhydratfreier (protektiv) Hochfett-Diät gefütterten NZL-Männchen gewonnen. Durch die nachfolgende Microarray-Analyse konnten 37 durch die Diätintervention differenziell exprimierte Kandidatengene für Diabetes identifiziert werden. ChREBP konnte durch histologische Untersuchungen als in der Langerhansschen Insel angereichertes Diabetes-Kandidatengen bestätigt werden. Durch den Abgleich der Microarray-Daten mit den humanen genomweiten Assoziationsstudien konnten 24 Gene identifiziert werden, die durch die diabetogene kohlenhydrathaltige Hochfett-Diät im Vergleich zur protektiven kohlenhydratfreien Hochfett-Diät differenziell exprimiert waren.

4.2.1 Die NZL-Maus als alternatives Modell für das metabolische Syndrom

Aufgrund der schlechten Reproduktivität und Verfügbarkeit der NZO-Mäuse sollte für die Untersuchungen an den Langerhansschen Inseln ein neues Mausmodell charakterisiert werden. Der von der Gruppe um Edward Leiter durch Rückkreuzung generierte NZL-Mausstamm trägt zu 3 % das Genom des NZB-Mausstamms und zu 97 % das der NZO-Maus [McInerney *et al.*, 2004]. Dieses neue Mausmodell sollte auf verschiedenen Diäten charakterisiert werden, um zu prüfen, ob sich die NZL-Maus für metabolische Studien eignet.

Hierfür wurden die NZL-Mäuse über einen Zeitraum von 22 Wochen sowohl auf der Standarddiät als auch auf der kohlenhydratfreien und kohlenhydrathaltigen Hochfett-Diät phänotypisch (Tab. 14) untersucht. Diese Analysen beinhalteten wöchentliche Messungen des Körpergewichts, der Körperzusammensetzung und der Blutglucose. Zu definierten Zeitpunkten wurde ein *i.p.* Glucosetoleranztest durchgeführt und das Plasmainsulin bestimmt. *Post mortem* wurde die Länge der Tiere gemessen und im gewonnenen Plasma einige Parameter (z.B. FFA, TG, Chol) untersucht. Für die NZL-Tiere konnte hinsichtlich der Körpergewichts- und Körperfettentwicklung (Tab. 14, siehe Anhang A7-8) beobachtet werden, dass die NZL-Männchen im Vergleich zu NZO-Männchen (Tab. 10) nicht mehr responsiv auf die Diätintervention waren. Im Gegensatz dazu konnte bei den untersuchten NZL-Weibchen (siehe Anhang A10-11) ein deutlicher Unterschied in der Körpergewichts- und Körperfettentwicklung zwischen den Diäten beobachtet werden. Dies kann entweder daran liegen, dass die NZL-Männchen auf der Standarddiät verstärkt Körpergewicht zunehmen (z.B. durch eine erhöhte Futteraufnahme) oder, dass die NZL-Männchen auf den

Hochfett-Diäten zu wenig Körpergewicht/ -fett zunehmen (z.B. durch eine zu geringe Futteraufnahme). Des Weiteren könnte dies durch eine geschlechtsspezifische Interaktion der 3 % NZB-Genom mit den restlichen 97 % NZO-Genom erklärt werden. Bei den NZL-Männchen konnte, wie bereits von Juergens *et al.* für den NZO-Stamm publiziert, beobachtet werden, dass durch die Restriktion der Kohlenhydrate (CHF) zwar eine Insulinresistenz hervorgerufen wurde (Tab. 14; siehe Anhang A9 / A12), die Tiere jedoch über den gesamten Versuchszeitraum normoglykämisch blieben, was für die beiden kohlenhydrathaltigen Diäten unabhängig vom Fettgehalt nicht auftrat [Juergens *et al.*, 2007]. Bezogen auf die Diabetesprävalenz (Blutglucose > 250 mg/dl (13,9 mM)) wurde für die Woche 17 beobachtet, dass 63 % der Hochfett-gefütterten NZL-Männchen diabetisch waren (SD: 72 %), jedoch wurde bei keinem CHF gefütterten Männchen ein Blutglucosewert über 250 mg/dl (13,9 mM) gemessen. Dies spricht eindeutig für eine Beteiligung der Glucotoxizität an der Diabetesentstehung und dafür, dass die Restriktion von Kohlenhydraten diabetesprotektiv wirkt.

Bei der Reproduktivität konnte zwar eine leicht erhöhte Reproduktionsrate (Jungtiere / Wurf) für die NZL-Weibchen beobachtet werden, jedoch liegt die Anzahl an hervorgebrachten Jungtieren (NZL: 4,2 Jungtiere / Wurf; NZO: 3,9 Jungtiere / Wurf) bei den NZL-Weibchen nur knapp über der der NZO-Tiere (3.2.1). Dies könnte daran liegen, dass die NZO-Verpaarungen im MRL sehr erfolgreich züchten und/ oder dass die NZL-Weibchen als adipöses Mausmodell nicht deutlich besser züchten als die nahverwandten NZO-Tiere.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der NZL-Mausstamm eine hohe Ähnlichkeit zum NZO-Mausstamm aufweist. Allerdings setzt die Hyperglykämie bei den NZL-Männchen früher ein (bei niedrigerem Körpergewicht), ein Phänotyp, der in Diabetesstudien den Versuchszeitraum verkürzen könnte. Problematisch ist jedoch, dass die NZL-Männchen keinen Unterschied in der Körpergewichtsentwicklung auf den verschiedenen Diäten zeigen, sodass dieses Mausmodell eher ungeeignet für Versuche zur diätinduzierten Adipositas scheint.

4.2.2 Morphologie der Langerhansschen Inseln in NZL-Tieren unter der Diätintervention

Um einen Einblick in die Morphologie der Inselzellen unter kohlenhydrathaltiger (HF) und kohlenhydratfreier (CHF) Hochfett-Diät zu bekommen, wurden sowohl der für die Glucoseaufnahme in die β -Zelle wichtige Glucosetransporter GLUT2 (Glucosensensor der β -Zelle), als auch der Transkriptionsfaktor Foxo1, der bei der Proliferation der β -Zelle eine Rolle spielt, immunhistochemisch angefärbt (Abb. 13) [Martinez *et al.*, 2006]. Beide Proteine gelten als frühe Marker für einen bevorstehenden β -Zelluntergang [Diplomarbeit O. Kluth]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte unter der Hochfett-Diät deutlich

weniger GLUT2 detektiert werden als in der CHF-Gruppe. Dies deutet auf eine beginnende Fehlfunktion der β -Zellen hin, die molekulare Ursache für die reduzierte *Slc2a2* Expression ist jedoch unklar [Jörns *et al.*, 2002]. Unerwartet war jedoch der Befund, dass trotz verminderter GLUT2-Verfügbarkeit eine erhöhte Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung beobachtet wurde.

Für Foxo1 konnte in den untersuchten Langerhansschen Inseln kein eindeutiger Befund erzielt werden, jedoch konnten tendenziell stärkere Signale in den HF-gefütterten Tieren detektiert werden. Die Färbungen wurden zu einem frühen Zeitpunkt in Lebenswoche 8 durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt können Tiere zwar auf der HF-Diät hyperglykämisch sein, jedoch liegt noch kein manifestierter Diabetes in den Tieren vor, wie es bei den Untersuchungen von O. Kluth der Fall war, bei denen die diabetischen Tiere (NZO Lebenswoche 18 - 24) ein deutlich schwächeres Foxo1-Signal zeigten [Diplomarbeit O. Kluth].

4.2.3 Laserbasierte Mikropräparation als Methode zur Isolation der Langerhansschen Inseln

Da es sich beim Pankreas um ein Mischgewebe aus endokrinem (α -, β -, δ -Zellen sowie PP-Zellen) und exokrinem Teil handelt, muss dieser Tatsache bei Untersuchungen der Langerhansschen Inseln Rechnung getragen werden. Um erstmalig gezielt genomweite Expressionsanalysen in nativen Langerhansschen Inseln durchzuführen, wurde in Zusammenarbeit mit Zorica Jovanovic (AG S. O’Rahilly, Universität Cambridge, UK) die laserbasierte Mikropräparation (LCM) als Methode zur Isolation von Inselgewebe aus Pankreasschnitten etabliert. Durch die LCM war es möglich, auf eine schonende Weise Inselzellgewebe zu gewinnen, welches für Transkriptom-, unter Umständen aber auch für Proteomanalysen, eingesetzt werden kann. Dabei war gewährleistet, dass die Aufarbeitung keine nennenswerten Änderungen im Expressionsprofil auslöst, wie es beispielsweise bei der Durchführung eines Kollagenaseverdaus von Pankreasgewebe der Fall gewesen wäre [Marselli *et al.*, 2008].

Nachteilig ist, dass sich für die LCM-Technik nicht alle Mausmodelle eignen, da man bei der Isolation der Langerhansschen Inseln innerhalb einer möglichst geringen Zeit (ca. 15 min pro Objektträger) möglichst viel Inselzellgewebe markieren/ isolieren muss. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Anzahl der vorhandenen und intakten Inseln ausreichend hoch ist oder falls hypertrophe Inseln vorliegen, da dann sogar innerhalb einer Insel mehrere Gewebestücke isoliert werden können. In Mausmodellen oder bei Diätinterventionen mit kleinen Inseln (SD) dürfte es schwer sein, eine ausreichend hohe Ausbeute innerhalb der Zeit zu erlangen, in der eine Isolation von RNA mit zufriedenstellender Qualität möglich ist.

Aufgrund der hohen RNase-Konzentration im Pankreas verschlechtert sich die RNA-Qualität bei einer zu lange andauernden Aufarbeitungszeit deutlich und macht die isolierte RNA für weitere Experimente unbrauchbar.

4.2.4 Expressionsuntersuchung in Langerhansschen Inseln von NZL-Mäusen

Um frühe Marker für die Diabetesentstehung identifizieren zu können, wurden für die Expressionsuntersuchung der Langerhansschen Inseln die Zeitpunkte Lebenswoche 6 und 8 gewählt, da zwischen diesen beiden Wochen der Blutglucosespiegel der mit Hochfett-Diät gefütterten Tiere stark anstieg (Abb. 14; siehe Anhang A9). Zu einem späteren Zeitpunkt, an dem die Tiere bereits einen manifesten Typ-2-Diabetes ausprägen, wäre es aufgrund des β -Zelluntergangs evtl. nicht möglich gewesen, genügend Gewebe mittels LCM zu gewinnen (4.2.3).

Ähnlich wie bei den Untersuchungen im weißen Fettgewebe der NZO-Maus konnte auch bei den Expressionsuntersuchungen der Langerhansschen Inseln der NZL-Mäuse eine Vielzahl von Genen (1397) mit veränderter Expression beobachtet werden. So ist beispielsweise die Expression von *Slc2a2* (GLUT2) in Woche 8 durch die HF 1,7-fach gegenüber der CHF erniedrigt, was somit den histologischen Befund bestätigt.

Es war auffallend, dass die Änderungen in der Expression deutlich ausgeprägter auftraten als im weißen Fettgewebe (z.B. ist *Cck* in der Langerhansschen Insel 11,8-fach stärker exprimiert durch die HF). Dies könnte an der Tatsache liegen, dass die Restriktion von Kohlenhydraten in der Diät (CHF) einen deutlich robusteren Phänotyp ausprägt als der Vergleich zweier kohlenhydrathaltiger Diäten mit unterschiedlichem Fettanteil.

Aufgrund der Vielzahl von zwischen den beiden Diäten differenziell exprimierten Genen (Auszüge aus den Genlisten siehe Anhang A13 - A16) wurden weitere Kriterien zur Eingrenzung der möglichen Kandidatengene herangezogen, da nur eine begrenzte Anzahl von Genen validiert werden konnte.

Im Folgenden sollten differenziell exprimierte Gene untersucht werden, die eine bereits dokumentierte Funktion im Pankreas bzw. in Langerhansschen Inseln erfüllen. Dazu wurden die 1397 differenziell exprimierten Gene mit drei Annotationsdatenbanken abgeglichen, der *Gene Ontology* (GO) Datenbank, der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Datenbank und der NCBI *Gene Reference Into Function* (Genrif) Datenbank. Während Gene in KEGG und GO manuell innerhalb eines Konsortiums anhand fester funktioneller Kategorien annotiert und kuriiert werden, basiert die Genrif Datenbank auf Schlüsselwörtern aus der *PubMed*-Literaturdatenbank. Zwei Drittel der differenziell exprimierten Gene (1039) waren in der GO- oder KEGG-Datenbank annotiert und wiesen mindestens rudimentäre Information über die biologische Funktion auf. In der NCBI Genrif Datenbank fanden sich

1257 Gen-Einträge (1812 Publikations-Einträge) für die Schlagwörter „*beta cell*“, „*pancreas*“ und „*islet*“. Insgesamt konnten durch die Kombination der angewendeten Kriterien 37 differenziell exprimierte Gene identifiziert werden, deren Expression und/ oder funktionelle Rolle in Inselzellen bereits beschrieben wurde (Abb. 15). Die in der Genrif-Datenbank ausgewählten Gene stellen jedoch eine Anreicherung potenzieller „Diabetesgene“ dar, da in den meisten Publikationen pathomechanistische Untersuchungen im Kontext von T2DM bzw. β -Zellfunktion beschrieben wurden.

4.2.5 Validierung und Beschreibung der Diabetes-Kandidatengene

Um die 37 identifizierten Diabetes-Kandidatengene besser charakterisieren zu können, wurden diese nach ihrer Funktion für die β -Zelle (z.B. Insulinsekretion, Inselentwicklung) in vier spezifische Gruppen unterteilt (Tab. 15) [Sandhu *et al.*, 2007]. Es konnte beobachtet werden, dass durch die kohlenhydrathaltige Hochfett-Diät (HF vs. CHF) deutlich mehr Gene in ihrer Expression erhöht (81 % in Woche 8) als erniedrigt (19 % in Woche 8) wurden. Man könnte spekulieren, dass dies auf eine Kompensationsreaktion aufgrund des beginnenden β -Zelluntergangs hindeutet.

Mit dem Ziel, die Ergebnisse der Arrayanalyse zu verifizieren, wurden einige repräsentative Gene ausgewählt und deren Expression erneut mittels *Real-Time-PCR* (Abb. 16) überprüft. Hierbei wurde als Kriterium sowohl die durch die Diätintervention hervorgerufene Stärke der Änderung, als auch die vorhandene Literatur herangezogen. Aufgrund der geringen RNA-Ausbeute war es nicht möglich, alle Kandidatengene zu validieren.

Aus der Gruppe „Enzyme und Metabolismus“ wurden die Gene *Scd1* und *Mlx1pl* ausgewählt.

Scd1: Die *Scd1*-Expression (*stearoyl-Coenzyme A desaturase 1*) wurde durch die Hochfett-Diät zu beiden untersuchten Zeitpunkten in der Langerhansschen Insel erhöht (2,8-fach erhöht durch die HF in Woche 8). Bei *Scd1* handelt es sich um ein Enzym, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Synthese von ungesättigten Fettsäuren katalysiert und somit primär in der Leber exprimiert werden sollte. Da es sich beim Pankreas bzw. der Langerhansschen Insel nicht um ein Fettsäure synthetisierendes Gewebe handelt und Fettsäuren einen toxischen Effekt auf die Langerhansschen Inseln haben, ist die Funktion von *Scd1* in der Inselzelle unklar. In der Maus sind vier Isoformen von *Scd1* bekannt (*Scd1 - 4*), dabei ist *Scd1* homolog zum humanen *SCD1*.

Mlx1pl: In der Leber wird die Expression des Transkriptionsfaktors *Mlx1pl* (ChREBP; *carbohydrate response element binding protein*) durch Glucose erhöht, eine Tatsache, die eine Funktion von ChREBP als Glucosesensor in der Leber nahe legt [Kabashima *et al.*, 2003, Iizuka *et al.*, 2008]. In Inselzellen hingegen bewirkte die kohlenhydrathaltige Hochfett-

Diät (HF) im Gegensatz zur kohlenhydratfreien Hochfett-Diät (CHF) eine verminderte Expression (3,8-fach erniedrigt durch die HF in Woche 8). Tatsächlich stellt ChREBP ein sehr stark herunter reguliertes Transkript in Inselzellen dar (siehe Anhang A14/ A16). In der Leber wird die über den GLUT2 aufgenommene Glucose durch die Glucokinase zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt und über den Pentosephosphatweg zu Xylulose-5-Phosphat oxidiert. Dieses aktiviert wiederum die Proteinphosphatase 2A, die im Anschluss die phosphorylierte und somit inaktive Form von ChREBP dephosphoryliert, welches daraufhin vom Cytosol in den Nukleus transloziert. Im Zellkern kommt es durch Dephosphorylierung zur DNA-Bindung und zur anschließenden Transkription der für die Leber bekannten lipogenen Zielgene von ChREBP (z.B. *Scd1*, *Fas*, *ACC*) [Iizuka *et al.*, 2004; Ishii *et al.*, 2004; Uyeda *et al.*, 2006]. Über die Rolle von ChREBP in den Langerhansschen Inseln ist bislang nur wenig bekannt. ChREBP wird in Min6-Zellen exprimiert und die Translokation durch einen Glucosestimulus in den Kern konnte von da Silva Xavier *et al.* beschrieben werden [da Silva Xavier *et al.*, 2006]. Die Ergebnisse der Microarrayanalysen lassen den Schluss zu, dass *Mlx1pl* zusätzlich zur Funktion in der Leber auch in den Langerhansschen Inseln einen Einfluss auf die Pathogenese des Typ-2-Diabetes haben könnte.

In der Gruppe „Insulinsekretion“ sind beispielsweise die Gene *Txnip* und *Pcsk2* in ihrer Expression unter der HF erhöht und das Gen *Cacna1d* erniedrigt.

***Txnip*:** In den Microarray-Daten der Langerhansschen Inseln findet sich eine erhöhte Expression (6,9-fach erhöht durch die HF in Woche 8) von *Txnip* (*thioredoxin interacting protein*) unter der Gabe der kohlenhydrathaltigen Hochfett-Diät. Dies stützt die These, dass *Txnip* durch Glucose induziert wird. Auffallend ist außerdem, dass die Expression in Woche 8 (stärker ausgeprägter Phänotyp mit einsetzender Hyperglykämie) deutlich zunimmt (Tab. 15). *Txnip* ist ein durch Glucose reguliertes ubiquitär exprimiertes Protein. Es bindet mit hoher Affinität an Thioredoxin und inhibiert so die Fähigkeit des Thioredoxins, Sulfhydrylgruppen mittels NADPH-Oxidation zu reduzieren und führt so zu Veränderungen im Redoxzustand der Zellen, verbunden mit oxidativen Stress [Hui *et al.*, 2004]. Es konnte gezeigt werden, dass *Txnip* einen proapoptotischen Effekt auf die β -Zelle hat und somit ein mögliches Bindeglied zwischen der Glucotoxizität und dem β -Zelluntergang darstellen könnte [Hui *et al.*, 2004; Minn *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Corbett 2008]. Der in den Microarrays auftretende Expressionsunterschied von *Txnip* konnte mittels *Real-Time-PCR* nicht bestätigt werden. Dies könnte zum einen an der verwendeten TaqMan-Sonde liegen oder zum anderen daran, dass es sich beim Arrayergebnis um ein Artefakt aufgrund des verwendeten *Probesets* handelt.

***Pcsk2*:** Die Expression von *Pcsk2* (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 2*) wird durch die Hochfett-Diät in Woche 8 1,6-fach erhöht. *Pcsk2* katalysiert die Spaltung von

sogenannten Precursorproteinen in die biologisch aktive Form. Eines der Substrate ist Proinsulin, welches durch Pcsk2 zu Insulin prozessiert wird. Die Endopeptidase Pcsk2 spaltet das so genannte C-Peptid, welches für die korrekte Faltung und Ausbildung der Disulfid-Brücken notwendig war, an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin ab [Linde *et al.*, 1993; Zündorf *et al.*, 2001]. Somit spielt Pcsk2 eine wichtige Rolle in der Regulation der Insulin-Biosynthese, was sich in den Expressionsdaten der Langerhansschen Inseln und einer Assoziation mit T2DM widerspiegelt [Leak *et al.*, 2007]. Die erhöhte Expression kann durch den vermehrten Insulinbedarf/ -freisetzung unter der HF in diesen frühen Lebenswochen der NZL-Mäuse erklärt werden (Kompensation). Interessant wäre es, den Befund der *Pcsk2*-Expression zu einem späteren Zeitpunkt erneut zu untersuchen, um zu prüfen, ob mit dem Verlust der Insulinkompensation und dem einhergehenden manifesten Typ-2-Diabetes auch die *Pcsk2*-Expression vermindert wird.

Cacna1d: In den Langerhansschen Inseln ist die Expression von *Cacna1d* (*calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit*) durch die Hochfett-Diät erniedrigt (2,1-fach erniedrigt durch die HF in Woche 8). *Cacna1d* ist ein spannungssensitiver Ca^{2+} -Kanal, welcher unter anderem die Freisetzung von Hormonen und Neuropeptiden sowie die Muskelkontraktion reguliert. *Cacna1d* zeigt eine signifikante Assoziation zum Typ-2-Diabetes in den genomweiten Assoziationsstudien (3.2; Tab. 17). Im Pankreas werden zwei Isoformen von *Cacna1d* (α_{1c} und α_{1d}) exprimiert. α_{1d} -*knockout*-Mäuse sind hypoinsulinämisch und glucoseintolerant [Namkung *et al.*, 2001]. Des Weiteren zeigen die adulten Tiere eine geringere Anzahl von kleineren Langerhansschen Inseln als Wildtypgeschwister [Platzer *et al.*, 2000]. Im Gegensatz zu den *knockout*-Tieren, waren die untersuchten Tiere unter der HF allerdings hyperinsulinämisch (Tab. 14) und wiesen hyperplastische Inseln auf.

Für die Gruppe „Pankreas/ Inselentwicklung“ wurden die Gene *Tmem27* und *Cck* verifiziert.

Beide Gene zeigten eine erhöhte Expression unter der Hochfett-Diät. *Cck* zeigt eine der stärksten Änderungen unter dieser Diätintervention im Experiment (11,8-fach erhöht durch die HF in Woche 8).

Tmem27: In den Langerhansschen Inseln der NZL-Mäuse ist die Expression von *Tmem27* (*collectrin, transmembrane protein 27*) durch die kohlenhydrathaltige Hochfett-Diät erhöht (1,8-fach erhöht durch die HF in Woche 8). Als Transmembranprotein mit 2 N-Glycosylierungsmotiven an den Aminosäureresten 76 und 93 ist *Tmem27* in der Lage, Dimere zu bilden. Die molekulare Funktion ist nur ansatzweise bekannt und beschrieben. Akpinar *et al.* konnten 2005 zeigen, dass *Tcf1*^{-/-}-Mäuse eine verminderte *Tmem27*-Expression aufweisen, verbunden mit einer verminderten Zellreplikation. In Mausmodellen mit hypertrophen Inseln (*ob/ob*-; *db/db*-Mäuse), konnte hingegen eine erhöhte Expression von *Tmem27* beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass *Tmem27* eine Rolle bei der

Zellentwicklung von Langerhansschen Inseln spielt [Akpinar *et al.*, 2005]. Ein Einfluss von *Tmem27* auf die Insulin-Exocytose und somit auf die β -Zell-Funktion wurde von Fukui *et al.* aufgezeigt [Fukui *et al.*, 2005]. Der Befund der Microarray-Daten passt zu den Arbeiten an *ob/ob*-Mäusen aus der Literatur, da die untersuchten Inseln der NZL-Männchen eine beginnende Hypertrophie zeigten.

Cck: Sowohl mit Hilfe des Microarrays als auch durch *Real-Time-PCR* konnte ein valides Signal für *Cck* (*cholecystokinin*) in den Inselzellen detektiert werden. Dabei stellt *Cck* eines der am stärksten herauf regulierten Transkripte in der HF-Gruppe dar. Die erhöhte Expression (11,8-fach erhöht durch die HF in Woche 8) von *Cck* durch die HF könnte die verstärkte Proliferation der β -Zellen erklären, die einem einsetzenden β -Zelluntergang entgegen wirken soll. Dabei korreliert die Zunahme der *Cck* Expression mit den gemessenen phänotypischen Parametern.

Cck ist ein in den I-Zellen des Magen-Darm-Trakts (Duodenum) sezerniertes Neuropeptid, welches in die Freisetzung pankreatischer Enzyme sowie die Gallenblasenkontraktion involviert ist. Die Funktion von *Cck* im Gehirn ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Beinfeld *et al.* wiesen im Jahr 2005 eine Kolo-kalisierung von *Pcsk2* und *Cck* im Gehirn von Mäusen und eine Beteiligung von *Pcsk2* an der Prozessierung von *Cck* nach [Beinfeld *et al.*, 2005; Lavine *et al.*, 2008].

Cck wird als Prohormon mit 95 Aminosäuren gebildet und anschließend in mehrere Formen prozessiert (z.B. *Cck8*, *Cck12*, *Cck33*). In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *Cck* und die entsprechenden Rezeptoren auch im exokrinen Pankreas von Ratten nachgewiesen werden können [Shimizu *et al.*, 1998; Kageyama *et al.*, 2005; Kuntz *et al.*, 2004]. Über die Expression in Langerhansschen Inseln ist jedoch nur wenig bekannt. Durch Attie *et al.* wurde *Cck* 2006 als Diabetesmarker patentiert [Method of identifying agents to prevent or treat diabetes / Pub. No.: US2007/0065839 A1].

Betrachtet man die hier beschriebenen Diabetes-Kandidatengene, so wird deutlich, dass bei der Validierung mittels *Real-Time-PCR* (Abb. 16 (A)) mit Ausnahme von *Txnip* alle Microarrayergebnisse bestätigt werden konnten, was die Qualität und Aussagekraft der Arraydaten noch erhöht. Zusammenfassend ergibt sich bei der Betrachtung der Expressionsergebnisse und deren Validierung ein komplexes Bild der Langerhansschen Insel. Die Regulation von *Pcsk2*, *Tmem27* und *Cck* spricht für eine Kompensationsantwort, um dem, zu diesem Zeitpunkt einsetzenden, β -Zelluntergang durch die erhöhte Proliferation entgegenzuwirken. Somit stellen diese Gene interessante Ausgangspunkte für weitere Untersuchungen dar.

Am mittels *Real-Time-PCR* erstellten Expressionsprofil dieser Diabetes-Kandidatengene für das Gesamtpankreas (Abb. 16 (B)) wird deutlich, dass die Expressionsmuster für einige Gene deutliche Unterschiede aufweisen. So wäre die differenzielle Expression unter der

Diätintervention für *Mlxip1* und *Cacna1d* bei der Betrachtung des Gesamtpankreas nicht beobachtet worden. Dies rechtfertigt die zeitaufwendige Vorverarbeitung des Gesamtpankreas mittels LCM, um reines Inselgewebe für die Hybridisierung der Microarrays zu erhalten und veranschaulicht die Notwendigkeit, für die detaillierte Untersuchung des β -Zelluntergangs isoliertes Inselgewebe zu betrachten. So scheint die detektierbare *Cck*-mRNA-Menge in der Inselzelle so gering zu sein, dass aufgrund des Verdünnungseffekts bei der Betrachtung von Gesamtpankreas-RNA kein Signal detektiert werden kann.

4.2.6 Expressionsuntersuchung einzelner Stoffwechselwege in den NZL-Männchen unter der Diätintervention

Um in den Langerhansschen Inseln einen weiteren Einblick über die einzelnen Stoffwechselwege und deren Regulation zu erhalten, wurden, analog zum weißen Fettgewebe *Pathway*-Analysen (Tab. 16), durchgeführt.

Hierbei konnte eine hochsignifikante Korrelation der Expression der Gene aus der oxidativen Phosphorylierung (91 % der signifikant regulierten Gene sind durch die HF erhöht exprimiert), des Proteasom- (92 %) des Ribosom- (100 %) Stoffwechselwegs mit der Diätintervention gefunden werden.

Die Änderungen der Genexpression für die **oxidative Phosphorylierung** könnten zu einer verstärkten Bildung von ROS führen und die β -Zellen maßgeblich schädigen, da die β -Zelle nur eine sehr geringe antioxidative Kapazität aufweist und daher sehr anfällig gegenüber oxidativem Stress ist [Robertson *et al.*, 2004]. Des Weiteren könnte es trotz der primär erhöhten Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung durch einen veränderten mitochondrialen Metabolismus zu einer Verknappung von ATP in der Inselzelle kommen, was wiederum Auswirkungen auf die Insulinfreisetzung haben könnte und die erhöhten Blutglucosewerte in der HF-Gruppe erklären würde [Lowell *et al.*, 2005]. Welchen Einfluss die erhöhte Expression der oxidativen Phosphorylierung auf den Redoxzustand der β -Zelle hat und welche Rolle dies beim β -Zelluntergang spielt, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden. Die Korrelation der Diätintervention mit der Aktivierung des **Proteasom**-Stoffwechselwegs könnte dadurch erklärt werden, dass es durch die erhöhte ROS-Bildung vermehrt zu Proteinmodifikationen, Fehlfaltungen /-sortierungen oder Proteinschädigungen kommt und die Langerhansschen Inselzellen versuchen die betroffenen Proteine auf diese Weise zu beseitigen. Des Weiteren fallen durch die Expansion und Umstrukturierung der Inselmasse Proteine an, die neu sortiert oder aber abgebaut werden müssen.

Die erhöhte **Ribosomen**-Aktivität passt in das Bild einer Kompensationsreaktion auf den β -Zelluntergang und die erhöhte Proliferation der Langerhansschen Inselzellen. Eine Zelle, die expandiert oder sich umstrukturiert, zeigt einen erhöhten Proteinumsatz. Vor allem die

erhöhte Insulinmenge muss durch eine gesteigerte Translation in der β -Zelle bewerkstelligt werden. Dies lässt darauf schließen, dass in den Langerhansschen Inseln der mit der diabetogenen Hochfett-Diät gefütterten Gruppe zu diesem Zeitpunkt eine verstärkte Kompensationsreaktion abläuft, um die durch die HF induzierte Insulinresistenz durch eine Überproduktion des Insulins auszugleichen.

4.2.7 Anreicherung inselspezifischer Transkripte

Um Aussagen über die gewebsspezifische Expression einzelner Gene und der Verteilung der Expression zwischen dem endokrinen und dem exokrinen Pankreas machen zu können, wurden *Real-Time-PCR* Experimente durchgeführt und die Anreicherung einzelner Transkripte in der Langerhansschen Insel über die Differenz der erhaltenen Ct-Werte bestimmt (Abb. 17).

Obwohl Insulin und Glucagon mit die stärksten Fluoreszenzintensitäten auf dem Microarray der beiden Diätgruppen aufwiesen, war die Anreicherung in Inseln nur marginal (Abb. 17). Dies ist wohl auf eine „Kontamination“ des Gesamtpankreas mit der extrem abundanten mRNA für Insulin und Glucagon zurückzuführen. Für den β -zellspezifischen Glucosetransporter GLUT2 wurde eine fast 50-fache Anreicherung gegenüber des Gesamtpankreas ermittelt (Abb. 16). Schließlich wurde eine deutliche Anreicherung in den Langerhansschen Inseln für *Foxo1*, *Txnip*, *Pcsk2*, *Cacna1d* und *Tmem27* ermittelt. Die mRNA für *Cck* war im Pankreas nicht detektierbar. Dies könnte auf eine extreme Anreicherung in Langerhansschen Inseln hinweisen. Für *Scd1* und *Mlxipl* konnte keine eindeutige Anreicherung in Inseln nachgewiesen werden.

Um die Anreicherung möglichst vieler Gene zu untersuchen, könnte in weiteren Experimenten mittels laserbasierter Mikropräparation exokrines Pankreas isoliert und davon zusätzlich zu den Microarrays der Langerhansschen Inseln, Microarrays angefertigt werden. Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass mit Hilfe der LCM-Methode systematisch inselzellspezifische Gene identifiziert werden können, die eine besondere Bedeutung bei der Pathogenese des T2DM haben können.

4.2.8 Expression und mögliche Funktion von *Mlxipl* in Langerhansschen Inseln

Das Transkript für *Mlxipl* (*ChREBP*) stellt eines der am stärksten herunter regulierten Gene nach Intervention mit der Hochfett-Diät dar (Tab. 15; Abb. 16). Um den Nachweis der *Mlxipl*-Expression in Inselzellen auf Proteinebene zu führen, wurden immunhistochemische Färbungen an Pankreasschnitten durchgeführt. Als Kontrolle für die Spezifität der Bindung

wurde ein *blocking peptide* verwendet. So konnte ein spezifisches Signal für ChREBP in den Langerhansschen Inseln, jedoch nicht im exokrinen Pankreas, detektiert werden. Somit ist es erstmalig gelungen, ChREBP in den Inselzellen spezifisch nachzuweisen. Die verwendete Methode erlaubt jedoch keine quantitativen Aussagen. Dennoch zeigt ein Vergleich der Expressionsstärke zwischen Leber und Inselzellen, dass die Expression von ChREBP in beiden Geweben auf vergleichbarem Niveau liegt (Daten nicht gezeigt). Die für die Leber und die kultivierten Min6-Zellen beschriebene glucoseinduzierte Kerntranslokation konnte hier mit immunhistochemischen Analysen jedoch nicht reproduziert werden [da Silva Xavier *et al.*, 2006].

In der Leber führt die Aktivierung von ChREBP zur Expression lipogener Enzyme, (z.B. *ME*, *Fas*, *Scd1*), welche die Umwandlung von Glucose in Fettsäuren katalysieren [Ishii *et al.*, 2004; Uyeda *et al.*, 2006]. Dabei führt in der Leber die Stimulierung mit Glucose zu einer erhöhten Aktivität von ChREBP, bedingt durch die Dephosphorylierung und Translokation in den Zellkern. Da die Expression von *Mlxipl* durch die kohlenhydrathaltige fettreiche HF Diät reduziert wird, sollten die bekannten Zielgene auch in Inselzellen untersucht werden. Eine erwartete Verminderung der Expression dieser Gene durch die kohlenhydrathaltige Hochfett-Diät als Folge der erniedrigten *Mlxipl* Expression konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 19 (A)). Um eine Kompensationsreaktion ausschließen zu können, wurde die Expression von *Srebp-1* (*sterol regulatory element binding transcription factor 1*) überprüft da *Srebp-1* ebenfalls die Expression dieser Gene reguliert [Shimano, 2001]. Es konnte jedoch keine erhöhte Expression von *Srebp-1* beobachtet werden, was entweder für ein inselspezifisches, vor *Mlxipl* vorgeschaltetes Gen, spricht oder wahrscheinlicher dafür, dass sich das Profil der Zielgene zwischen Leber und Langerhansschen Insel, aufgrund der unterschiedlichen metabolischen Aufgaben der Gewebe, unterscheidet. In der Leber der identischen Tiere konnte jedoch eine deutliche Expressionsantwort der Zielgene mittels *Real-Time-PCR* beobachtet werden (Abb. 19 (B)), obwohl *Mlxipl* selbst nur geringfügig in der Expression verändert ist. Dies spricht für die bereits beschriebene Regulation über Phosphorylierungen in der Leber.

β -Zellen, die den Hauptanteil an Inselzellen ausmachen, metabolisieren Glucose zu Pyruvat, um schließlich über die mitochondriale Oxidation von Acetyl-CoA maximale Mengen an ATP zu gewinnen. Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass das gewonnene Acetyl-CoA in die Fettsäuresynthese eingeht, wie dies ChREBP vermittelt in der Leber geschieht. Die robuste Expression von ChREBP deutet eher auf eine neuartige Funktion des Transkriptionsfaktors in Inselzellen hin, wie etwa als Glucosesensor. Um unbekannte *Mlxipl*-Zielgene in der Langerhansschen Insel zu identifizieren, wäre es z.B. möglich, *Mlxipl* in einer Inselmodellzelllinie mittels siRNA auszuschalten und zu untersuchen, welche Gene dadurch in ihrer Expression verändert sind. So könnten Aussagen über die Funktion des

Transkriptionsfaktors in der Inselzelle gemacht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Generierung einer inselspezifischen *knockout*-Maus. Die Phänotypisierung solcher Mäuse würde dann Rückschlüsse auf die Funktion von ChREBP in der Inselzelle erlauben. Die bisher bekannte *Mlx1pl knockout*-Maus hat allerdings einen sehr milden Phänotyp mit leicht erhöhten Blutlipidwerten [Iizuka *et al.*, 2004].

4.2.9 Expression und mögliche Funktion von *Cck* in Langerhansschen Inseln

Das Transkript für *Cck* stellt eines der am stärksten herauf regulierten Gene nach Intervention durch die HF dar (siehe Anhang A13/ A15; Tab. 15). Die differenzielle Expression von *Cck* konnte sowohl mittels Microarray (3'-Bereich) als auch durch *Real-Time-PCR* (5'-Bereich) bestimmt werden. Interessanterweise konnte *Cck*-mRNA nicht in der RNA des Gesamtpankreas nachgewiesen werden, obwohl die *Real-Time-PCR* Analyse der RNA von Inselzellen ein robustes Signal ergab (Abb. 16). Dies weist auf eine starke Anreicherung von *Cck* in Langerhansschen Inseln hin. Beim Versuch, *Cck* histologisch nachzuweisen, konnte auch durch Optimierung verschiedener Protokolle kein spezifisches Signal erzielt werden. Dies kann an den verwendeten Antikörpern liegen, da der verwendete Antikörper (Biotrend) von Schweiger *et al.* in Schweinen verwendet wurde und nur eine ausgewiesene Spezifität für Ratte, Schwein und Mensch, nicht aber Maus hat. Da in den histologischen Experimenten ein verstärktes Signal im Zellkern detektiert worden ist, *Cck* aber keine spezifische Kernlokalisationssequenz besitzt, muss die Spezifität des Signals in der Langerhansschen Insel aufgrund der oben aufgeführten Punkte infrage gestellt werden [Schweiger *et al.*, 2005]. Des Weiteren ist bekannt, dass die Fixierung mit Paraformaldehyd sehr kleine Peptide wie z.B. *Cck8* möglicherweise nicht erfasst und diese somit histologisch nicht nachgewiesen werden können. Hier wäre es evtl. möglich, durch andere Fixierungsmethoden oder durch Kryoschnitte an nativem Gewebe bessere Ergebnisse zu erzielen.

Lavine *et al.* konnten 2008 mittels Überexpression des *Cck*-Präproteins in Zellkultur zeigen, dass sich durch HPLC und anschließenden Radioimmunoassay CCK8, CCK12, CCK22 sowie weitere unspezifische CCK-Formen in Inselzellen von Maus und Mensch nachweisen lassen. Dabei konnte eine proliferationsfördernde Wirkung von *Cck* auf die β -Zelle beobachtet werden [Lavine *et al.*, 2008]. Diese proliferationsfördernde Wirkung könnte erklären, warum in den Microarray-Daten zwischen den beiden untersuchten Diäten ein so ausgeprägter Unterschied in der Expression beobachtet wurde (Tab. 15). Die sehr hohe Expression von *Cck* in der kohlenhydratfreien Hochfett-Diät Gruppe könnte auf eine Kompensationsreaktion der β -Zellen hindeuten, um einem einsetzenden Inselzelluntergang entgegenzuwirken. In Woche 8 beginnen die NZL-Männchen hyperglykämisch zu werden.

Dabei kann der einsetzende β -Zellverlust durch eine zu diesem frühen Zeitpunkt noch mögliche Steigerung der Proliferation ausgeglichen werden. Dies ist zu einem späteren Zeitpunkt (ab Woche 17) nicht mehr möglich. Es kommt daher zu einem massiven Verlust an β -Zellmasse (Inselzelluntergang, Hypoinsulinämie). Unklar ist, durch welche Zellen in der Langerhansschen Insel Cck synthetisiert wird. Dies müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Cck-produzierenden Zellen nicht um β -Zellen handelt. Ein noch nicht beschriebener Zelltyp könnte allerdings durch die Synthese von Cck Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der β -Zellen nehmen und somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung des β -Zelluntergangs spielen.

4.2.10 Korrelation der Microarray-Daten mit den humanen GWA

Durch die humanen genomweiten Assoziationsstudien (GWA) konnten in den letzten Monaten annähernd 20 Diabetes-Kandidatengene identifiziert werden, die zwar hochsignifikant mit T2DM assoziiert sind, aber jeweils nur sehr kleine Effekte auf das individuelle Erkrankungsrisiko zeigen [Staiger *et al.*, 2008, Doria *et al.*, 2008].

Zu den bekanntesten Diabetesgenen gehört der Transkriptionsfaktor *TCF7L2*, dessen Funktion bisher jedoch weitgehend unbekannt ist. Auffallend ist, dass die Mehrzahl der Diabetesgene aus den Untersuchungen spezifisch in β -Zellen exprimiert werden [Doria *et al.*, 2008].

Da durch die Diätintervention mit der HF in dem hier verwendeten Mausmodell ein Typ-2-Diabetes hervorgerufen werden kann, sollte versucht werden, die Gene mit differenzieller Expression mit den frei verfügbaren Daten aus den humanen genomweiten Assoziationsstudien (GWA) für Typ-2-Diabetes zu vergleichen. Dabei sollten potenzielle Kandidatengene, die eine Assoziation zum humanen T2DM haben und deren Expression durch die diabetogene HF entweder erhöht oder erniedrigt wurde, identifizieren werden, um neue interessante Diabetesmarker beschreiben und evtl. kausale Rückschlüsse über den Pathomechanismus von T2DM ziehen zu können.

Hierbei wurden die vom *Broad*-Institut und die vom *WTCCC* durchgeführten Studien miteinbezogen (insgesamt: 8453 Fälle; 10235 Kontrollen). Betrachtet wurden alle SNPs (873 humane SNPs, 436 *Hs* Ensembl Gene, 430 *Mm* Ensembl Gene), die in beiden Studien signifikant korreliert waren (Abb. 20, Tab. 17). Dass bei der Validierung der 24 Kandidatengene (Abb. 21), deren Expression in der Langerhansschen Insel der NZL-Mäuse durch die Diätintervention geändert war und die eine Assoziation zum Typ-2-Diabetes durch die GWA aufwiesen, nicht alle Expressionsänderungen mittels *Real-Time-PCR* bestätigt werden konnten, liegt vermutlich daran, dass es sich bei den hier

untersuchten Genen nicht um Gene mit großen Expressionsänderungen zwischen den untersuchten Bedingungen handelt. Dies machte eine Validierung mit handelsüblichen TaqMan-Sonden (vermehrt im 5'-Bereich) nur teilweise möglich. Besonders interessant ist, dass *Cacna1d* im Abgleich mit den GWA ebenfalls identifiziert worden ist, da es bereits als Diabetes-Kandidatengen in den Inselzellen auftrat und sich mittels *Real-Time-PCR* validieren ließ. Welche Rolle *Cacna1d* in der Diabetesentwicklung spielt, muss durch weitere Experimente geklärt werden.

Ergänzend muss bemerkt werden, dass die hier verwendete Signifikanzgrenze von $p = 0,05$ kein stringentes Kriterium darstellt und sich die Anzahl der Kandidatengene durch eine niedrige Signifikanzgrenze, z.B. einem p -Wert von 0,001 oder niedriger, verringert hätte. Die erhaltenen 24 Kandidatengene (Tab. 17) wären auch aufgrund der statistischen Häufigkeit rein rechnerisch erwartet worden. Jedoch mussten die untersuchten SNPs in beiden Studien signifikant assoziiert sein, was den hohen p -Wert von 0,05 relativiert. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass durch die Korrelation verschiedener Datensätze, Assoziations- und Expressionsanalysen, potenzielle, in der Langerhansschen Insel diätabhängig exprimierte Diabetes-Kandidatengene identifiziert werden konnten. Die Vielzahl der erfüllten Kriterien (Signifikanz in beiden GWA-Studien und differenzielle Expression) macht die erhaltenen Gene zu interessanten neuen Zielgenen die in weiteren Experimenten, insbesondere Validierung der Assoziation mit T2DM in humanen Kohorten, näher untersucht werden müssten.

Zusammenfassend kann von einer zentralen Rolle der oxidativen Phosphorylierung bei der Entstehung des Typ-2-Diabetes bzw. der Entwicklung einer Adipositas/ Insulinresistenz ausgegangen werden, da in beiden Microarray-Versuchen eine deutliche Änderung in der Expression der Gene der oxidativen Phosphorylierung im polygenen Mausmodell beobachtet werden konnte. Dabei scheint eine erniedrigte Expression von Genen der oxidativen Phosphorylierung im weißen Fettgewebe und eine erhöhte Expression dieser Gene in den Langerhansschen Inseln mit metabolischen Veränderungen assoziiert zu sein. Welchen Einfluss der dabei entstehende oxidative Stress bzw. der geänderte Redoxzustand der Zelle hat, muss jedoch in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Wichtig für die Entstehung der Insulinresistenz und Suszeptibilität für T2DM könnte auch die hier beschriebene Fettspeicherstörung im weißen Fettgewebe der NZO-Tiere sein. Eine erniedrigte Expression der Gene der Triglyceridsynthese im weißen Fettgewebe und eine verminderte oxidative Kapazität könnten die ektopische Fettansammlung bei der NZO-Maus erklären. Die Korrelation der humanen genomweiten Assoziationsstudien mit den generierten Microarraydaten der NZL-Mäuse ermöglichte die Identifizierung von neuartigen Diabetes-Kandidatengenen in der Langerhansschen Insel. Die Ergebnisse zu ChREBP und Cck deuten auf eine bisher unbekannt regulatorische Funktion beider Proteine in Inselzellen hin.

5 Anhang

A1. Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erhöht exprimierten Gene im WAT der NZO-Männchen in Woche 4

HF: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die HF-Gruppe; SD: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die SD-Gruppe; logRatio: Entspricht der Differenz der logarithmierten Scan-Intensitäten für HF und SD; p-Wert: (Student)-t-Test (nicht für *multiple testing* korrigiert)

Affymetrix-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	HF	SD	logRatio	p-Wert
1427222_a_at	<i>Svp2</i>	<i>seminal vesicle protein 2</i>	9,07	6,23	2,84	0,132
1420359_at	<i>Sva</i>	<i>seminal vesicle antigen</i>	8,67	6,16	2,52	0,113
1419347_x_at	<i>Svs5</i>	<i>seminal vesicle secretion 5</i>	8,45	6,36	2,09	0,165
1422427_a_at	<i>Svs2</i>	<i>seminal vesicle protein, secretion 2</i>	7,84	6,02	1,82	0,159
1422515_at	<i>Svs7</i>	<i>seminal vesicle protein, secretion 7</i>	7,78	6,12	1,65	0,169
1427351_s_at	<i>Igh-6</i>	<i>immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)</i>	11,4	9,85	1,51	0,081
1419149_at	<i>Serpine1</i>	<i>serine (or cysteine) peptidase inhibitor</i>	8,63	7,14	1,5	0,012
1423506_a_at	<i>Nnat</i>	<i>neuronatin</i>	12,9	11,5	1,39	0,011
1427329_a_at	<i>Igh-6</i>	<i>immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)</i>	10,6	9,21	1,38	0,116
1434202_a_at	<i>BC055107</i>	<i>cDNA sequence BC055107</i>	8,5	7,14	1,36	0,019
1426278_at	<i>Ifi27</i>	<i>interferon, alpha-inducible protein 27</i>	13	11,7	1,36	0,029
1455909_at	<i>9530002K18Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 9530002K18 gene</i>	7,11	5,81	1,3	0,186
1436825_a_at	<i>Gm191</i>	<i>gene model 191</i>	7,16	5,87	1,29	0,163
1425258_at	<i>Cst11</i>	<i>cystatin 11</i>	7,07	5,88	1,19	0,420
1416125_at	<i>Fkbp5</i>	<i>FK506 binding protein 5</i>	9,29	8,1	1,19	0,032
1448550_at	<i>Lbp</i>	<i>lipopolysaccharide binding protein</i>	9,25	8,06	1,19	0,046
1423294_at	<i>Mest</i>	<i>mesoderm specific transcript</i>	12,1	10,9	1,19	0,043
1418021_at	<i>C4</i>	<i>complement component 4 (within H-2S)</i>	10,7	9,49	1,18	0,030
1420698_at	<i>Gpx5</i>	<i>glutathione peroxidase 5</i>	7,83	6,66	1,17	0,454
1428942_at	<i>Mt2</i>	<i>metallothionein</i>	9,31	8,23	1,08	0,016

A2. Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erniedrigt exprimierten Gene im WAT der NZO-Männchen in Woche 4

HF: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die HF-Gruppe; SD: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die SD-Gruppe; logRatio: Entspricht der Differenz der logarithmierten Scan-Intensitäten für HF und SD; p-Wert: (Student)-t-Test (nicht für *multiple testing* korrigiert)

Affymetrix-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	HF	SD	logRatio	p-Wert
1423556_at	<i>Akr1b7</i>	<i>aldo-keto reductase family 1, member B7</i>	6,32	10,20	-3,89	0,020
1416325_at	<i>Crisp1</i>	<i>cysteine-rich secretory protein 1</i>	5,82	8,80	-2,98	0,032
1417404_at	<i>Elovl6</i>	<i>ELOVL family member 6, elongation of long</i>	9,59	12,00	-2,42	0,002
1417403_at	<i>Elovl6</i>	<i>0 day neonate eyeball cDNA, RIKEN full-length</i>	8,88	11,20	-2,37	0,004
1425326_at	<i>Acly</i>	<i>ATP citrate lyase</i>	10,40	12,30	-1,97	0,005
1427595_at	<i>Acaca</i>	<i>acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha</i>	7,11	8,86	-1,74	0,011
1422479_at	<i>Acss2</i>	<i>acetyl-Coenzyme A synthetase 2</i>	10,80	12,40	-1,57	0,003
1428323_at	<i>Gpd2</i>	<i>adult male aorta and vein cDNA, RIKEN full-length</i>	8,58	10,00	-1,43	0,007
1416632_at	<i>Mod1</i>	<i>malic enzyme, supernatant</i>	10,80	12,30	-1,43	0,001
1423436_at	<i>Gsta3</i>	<i>glutathione S-transferase, alpha 3</i>	8,70	10,10	-1,39	0,028
1430307_a_at	<i>Mod1</i>	<i>malic enzyme, supernatant</i>	11,40	12,80	-1,38	0,001
1427422_at	-----	<i>Mus musculus, clone IMAGE:5050186</i>	7,89	9,24	-1,35	0,035
1429254_at	<i>Aqp11</i>	<i>aquaporin 11</i>	7,54	8,86	-1,32	0,048
1436605_at	<i>Tkt</i>	<i>transketolase</i>	7,11	8,42	-1,31	0,019
1417434_at	<i>Gpd2</i>	<i>glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial</i>	9,60	10,90	-1,30	0,004
1422973_a_at	<i>Thrsp</i>	<i>thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus)</i>	12,40	13,70	-1,30	0,060
AFFX-PyruCarbMur/L09192_MA_at	<i>Pcx</i>	<i>pyruvate carboxylase</i>	8,65	9,90	-1,25	0,011
1424815_at	<i>Gys2</i>	<i>glycogen synthase 2</i>	7,16	8,34	-1,18	0,063
1426440_at	<i>Dhrs7</i>	<i>dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7</i>	10,90	12,00	-1,17	0,005
1436590_at	<i>Ppp1r3b</i>	<i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B</i>	7,42	8,59	-1,17	0,040

A3. Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erhöht exprimierten Gene im WAT der NZO-Männchen in Woche 8

HF: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die HF-Gruppe; SD: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die SD-Gruppe; logRatio: Entspricht der Differenz der logarithmierten Scan-Intensitäten für HF und SD; p-Wert: (Student)-t-Test (nicht für *multiple testing* korrigiert)

Affymetrix-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	HF	SD	logRatio	p-Wert
1449153_at	<i>Mmp12</i>	<i>matrix metalloproteinase 12</i>	10,4	7,31	3,13	0,042
1435314_at	<i>Tph2</i>	<i>tryptophan hydroxylase 2</i>	10,4	7,32	3,12	0,013
1449254_at	<i>Spp1</i>	<i>secreted phosphoprotein 1</i>	9,65	6,62	3,03	0,013
1448303_at	<i>Gpnmb</i>	<i>glycoprotein nmb</i>	10,3	7,44	2,84	0,004
1419762_at	<i>Ubd</i>	<i>ubiquitin D</i>	9,99	7,37	2,62	0,011
1450826_a_at	<i>Saa3</i>	<i>serum amyloid A 3</i>	10,3	7,84	2,45	0,001
1444176_at	<i>Atp6v0d2</i>	<i>ATPase, H+ transporting, V0 subunit D</i>	9,07	6,67	2,40	0,005
1449164_at	<i>Cd68</i>	<i>CD68 antigen</i>	11,1	9,09	2,00	0,035
1450355_a_at	<i>Capg</i>	<i>capping protein, gelsolin-like</i>	10,3	8,35	1,96	0,016
1448591_at	<i>Ctss</i>	<i>cathepsin S</i>	12,2	10,3	1,94	0,023
1420380_at	<i>Ccl2</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	9,61	7,69	1,93	0,029
1421792_s_at	<i>Trem2</i>	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>	9,09	7,18	1,90	0,007
1416871_at	<i>Adam8</i>	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain 8</i>	9,01	7,12	1,89	0,004
1419128_at	<i>Itgax</i>	<i>integrin alpha X</i>	8,96	7,13	1,83	0,019
1420394_s_at	<i>Gp49a</i>	<i>glycoprotein 49 A</i>	11,00	9,24	1,80	0,022
1415983_at	<i>Lcp1</i>	<i>lymphocyte cytosolic protein 1</i>	10,70	8,91	1,79	0,013
1450792_at	<i>Tyrbp</i>	<i>TYRO protein tyrosine kinase binding prot.</i>	11,60	9,83	1,78	0,009
1418497_at	<i>Fgf13</i>	<i>fibroblast growth factor 13</i>	9,88	8,15	1,73	0,091
1424754_at	<i>Ms4a7</i>	<i>membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member</i>	9,90	8,22	1,68	0,003
1460227_at	<i>Timp1</i>	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>	9,11	7,43	1,68	0,041

A4. Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erniedrigt exprimierten Gene im WAT der NZO-Männchen in Woche 8

HF: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die HF-Gruppe; SD: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die SD-Gruppe; logRatio: Entspricht der Differenz der logarithmierten Scan-Intensitäten für HF und SD; p-Wert: (Student)-t-Test (nicht für *multiple testing* korrigiert)

Affymetrix-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	HF	SD	logRatio	p-Wert
1423556_at	<i>Akr1b7</i>	<i>aldo-keto reductase family 1, member B7</i>	6,38	9,84	-3,46	0,219
1416325_at	<i>Crisp1</i>	<i>cysteine-rich secretory protein 1</i>	5,90	8,82	-2,91	0,238
1417404_at	<i>Elovl6</i>	<i>ELOVL family member 6, elongation of long</i>	8,47	10,80	-2,36	0,028
1456124_x_at	<i>Svs5</i>	<i>seminal vesicle secretion 5</i>	7,03	9,25	-2,22	0,376
1417403_at	<i>Elovl6</i>	<i>ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids</i>	7,76	9,92	-2,16	0,039
1423436_at	<i>Gsta3</i>	<i>glutathione S-transferase, alpha 3</i>	8,31	10,40	-2,08	0,006
1425326_at	<i>Acly</i>	<i>ATP citrate lyase</i>	9,22	11,20	-1,96	0,022
1422515_at	<i>Svs7</i>	<i>seminal vesicle protein, secretion 7</i>	6,42	8,33	-1,91	0,352
1417074_at	<i>Ceacam10</i>	<i>CEA-related cell adhesion molecule 10</i>	6,17	8,01	-1,84	0,348
1439379_x_at	<i>Prm1</i>	<i>protamine 1</i>	6,31	8,12	-1,81	0,180
1434185_at	<i>Acaca</i>	<i>acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha, mRNA</i>	9,56	11,30	-1,79	0,015
1417992_a_at	<i>Svs3</i>	<i>seminal vesicle secretion 3</i>	5,98	7,74	-1,76	0,399
1415994_at	<i>Cyp2e1</i>	<i>cytochrome P450, family 2, subfamily</i>	11,30	13,00	-1,70	0,015
1415965_at	<i>Scd1</i>	<i>stearoyl-Coenzyme A desaturase 1</i>	10,30	12,00	-1,65	0,002
1435999_at	<i>C630041L24 Rik</i>	<i>RIKEN cDNA C630041L24 gene</i>	6,41	8,04	-1,63	0,290
1427222_a_at	<i>Svp2</i>	<i>seminal vesicle protein 2</i>	7,04	8,67	-1,63	0,492
1422427_a_at	<i>Svs2</i>	<i>seminal vesicle protein, secretion 2</i>	6,53	8,15	-1,61	0,505
1417434_at	<i>Gpd2</i>	<i>adult male diencephalon cDNA, RIKEN full-length</i>	8,81	10,40	-1,60	0,013
1419504_at	<i>Mogat1</i>	<i>monoacylglycerol O-acyltransferase 1</i>	8,32	9,91	-1,59	0,005
1417956_at	<i>Cidea</i>	<i>cell death-inducing DNA fragmentation</i>	9,61	11,20	-1,57	0,002

A5. Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erhöht exprimierten Gene im WAT der NZO-Männchen in Woche 12

HF: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die HF-Gruppe; SD: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die SD-Gruppe; logRatio: Entspricht der Differenz der logarithmierten Scan-Intensitäten für HF und SD; p-Wert: (Student)-t-Test (nicht für *multiple testing* korrigiert)

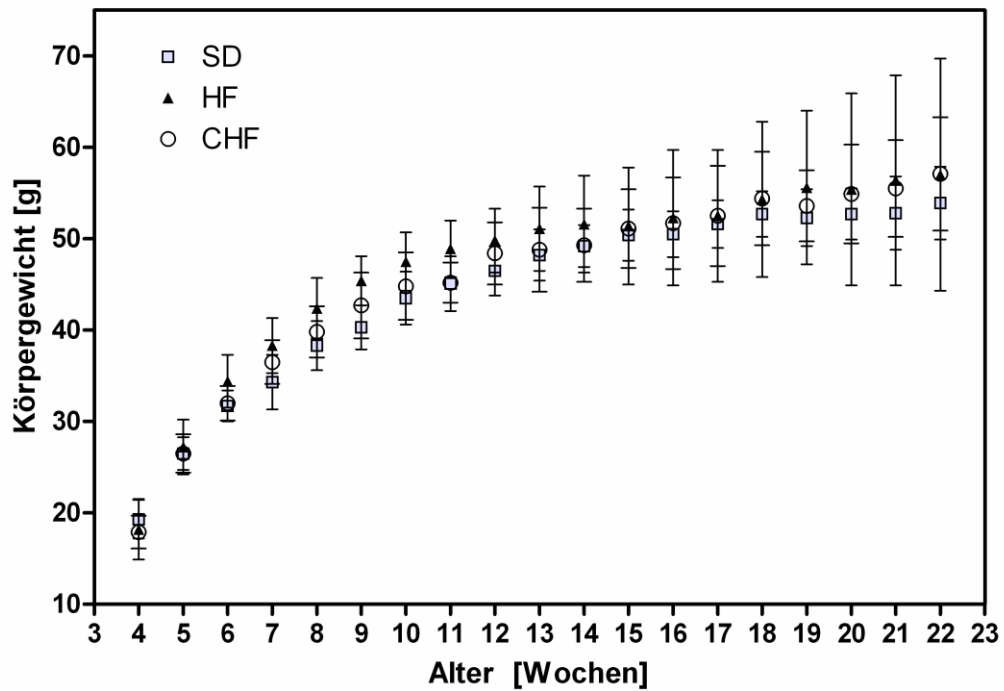
Affymetrix-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	HF	SD	logRatio	p-Wert
1419762_at	<i>Ubd</i>	<i>ubiquitin D</i>	11,60	8,46	3,10	0,007
1435314_at	<i>Tph2</i>	<i>tryptophan hydroxylase 2</i>	10,90	8,52	2,39	0,035
1449153_at	<i>Mmp12</i>	<i>matrix metalloproteinase 12</i>	11,00	8,98	2,06	0,024
1448303_at	<i>Gpnmb</i>	<i>glycoprotein (transmembrane) nmb</i>	10,60	8,55	2,05	0,022
1423008_at	<i>Art2a</i>	<i>ADP-ribosyltransferase 2a</i>	7,97	5,96	2,00	0,000
1420794_at	<i>Art2b</i>	<i>ADP-ribosyltransferase 2b</i>	8,16	6,26	1,91	0,007
1434798_at	<i>Atp6v0d2</i>	<i>ATPase, H⁺ transporting, V0 subunit D</i>	9,54	7,78	1,76	0,010
1420380_at	<i>Ccl2</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	10,30	8,54	1,75	0,014
1424754_at	<i>Ms4a7</i>	<i>membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7</i>	10,50	8,77	1,74	0,010
1421792_s_at	<i>Trem2</i>	<i>triggering receptor expressed on myeloid</i>	9,65	7,93	1,72	0,010
1451721_a_at	<i>H2-Ab1</i>	<i>histocompatibility 2, class II antigen A</i>	10,80	9,05	1,71	0,001
1450826_a_at	<i>Saa3</i>	<i>serum amyloid A 3</i>	10,10	8,45	1,68	0,028
1416871_at	<i>Adam8</i>	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain</i>	9,39	7,73	1,66	0,003
1449254_at	<i>Spp1</i>	<i>secreted phosphoprotein 1</i>	9,80	8,15	1,66	0,042
1419128_at	<i>Itgax</i>	<i>integrin alpha X</i>	9,63	8,02	1,61	0,007
1421098_at	<i>AI586015</i>	<i>expressed sequence AI586015</i>	9,06	7,47	1,59	0,005
1425528_at	<i>Prrx1</i>	<i>paired related homeobox 1</i>	10,20	8,62	1,59	0,005
1424927_at	<i>Glpr1</i>	<i>GLI pathogenesis-related 1 (glioma)</i>	9,35	7,78	1,58	0,006
1419394_s_at	<i>S100a8</i>	<i>S100 calcium binding protein A8</i>	11,00	9,44	1,58	0,026
1415983_at	<i>Lcp1</i>	<i>lymphocyte cytosolic protein 1</i>	11,30	9,68	1,57	0,017

A6. Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erniedrigt exprimierten Gene im WAT der NZO-Männchen in Woche 12

HF: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die HF-Gruppe; SD: mittleres Signal der logarithmierten Scan-Intensität (\log_2) für die SD-Gruppe; logRatio: Entspricht der Differenz der logarithmierten Scan-Intensitäten für HF und SD; p-Wert: (Student)-t-Test (nicht für *multiple testing* korrigiert)

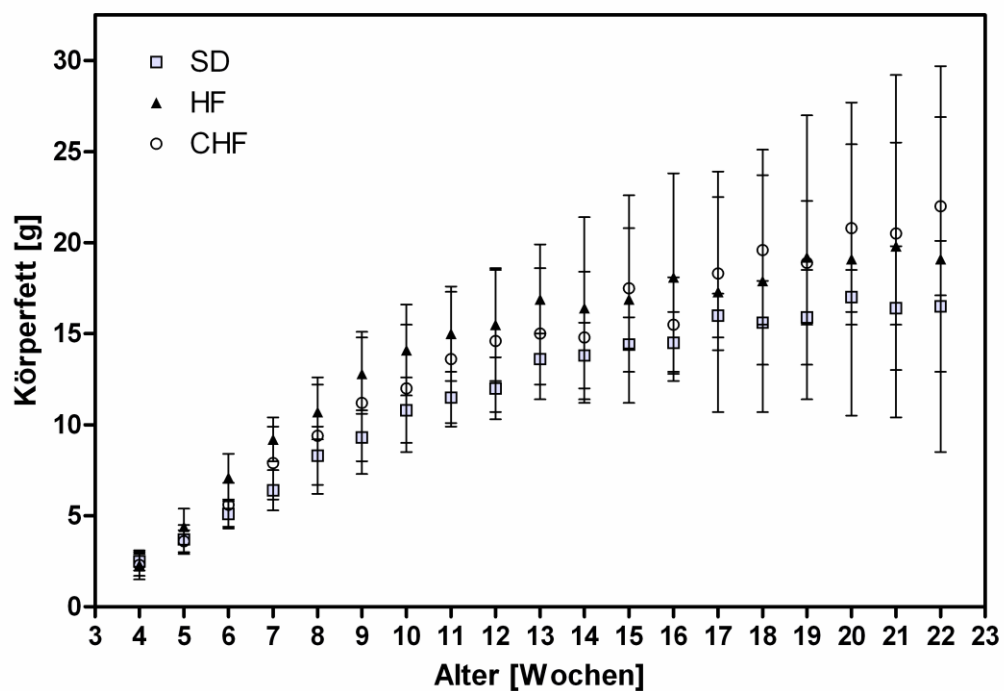
Affymetrix-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	HF	SD	logRatio	p-Wert
1415994_at	<i>Cyp2e1</i>	<i>cytochrome P450, family 2, subfamily e, p</i>	8,15	12,40	-4,22	0,000
1419346_a_at	<i>Svs5</i>	<i>seminal vesicle secretion 5</i>	6,19	10,30	-4,07	0,149
1427222_a_at	<i>Svp2</i>	<i>seminal vesicle protein 2</i>	6,23	9,86	-3,63	0,163
1417993_at	<i>Svs3</i>	<i>seminal vesicle secretion 3</i>	6,07	9,57	-3,49	0,158
1417074_at	<i>Ceacam10</i>	<i>CEA-related cell adhesion molecule 10</i>	6,00	9,46	-3,46	0,159
1422427_a_at	<i>Svs2</i>	<i>seminal vesicle protein, secretion 2</i>	6,11	9,58	-3,46	0,176
1420359_at	<i>Sva</i>	<i>seminal vesicle antigen</i>	6,02	9,48	-3,45	0,174
1422515_at	<i>Svs7</i>	<i>seminal vesicle protein, secretion 7</i>	6,12	9,54	-3,42	0,149
1436825_a_at	<i>Gm191</i>	<i>gene model 191</i>	5,87	8,92	-3,04	0,173
1415938_at	<i>Spink3</i>	<i>serine peptidase inhibitor, Kazal type 3</i>	6,10	9,07	-2,97	0,178
1423556_at	<i>Akr1b7</i>	<i>aldo-keto reductase family 1, member B7</i>	6,34	8,98	-2,64	0,165
1422973_a_at	<i>Thrsp</i>	<i>thyroid hormone responsive SPOT14 homolog (Rattus)</i>	10,10	12,60	-2,42	0,001
1455909_at	<i>9530002K18Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 9530002K18 gene</i>	5,87	8,19	-2,32	0,196
1417404_at	<i>Elovl6</i>	<i>ELOVL family member 6, elongation of long</i>	7,65	9,94	-2,29	0,006
1449320_at	<i>Pbsn</i>	<i>probasin</i>	5,90	8,15	-2,26	0,216
1429829_at	<i>9530003J23Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 9530003J23 gene</i>	5,91	8,11	-2,19	0,184
1424737_at	<i>Thrsp</i>	<i>thyroid hormone responsive SPOT14 homolog</i>	10,50	12,70	-2,10	0,005
1416325_at	<i>Crisp1</i>	<i>cysteine-rich secretory protein 1</i>	5,89	7,91	-2,02	0,200
1419504_at	<i>Mogat1</i>	<i>monoacylglycerol O-acyltransferase 1</i>	7,58	9,38	-1,80	0,001
1434185_at	<i>Acaca</i>	<i>acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha, mRNA</i>	8,90	10,70	-1,79	0,009

A7. Körpergewichtsentwicklung der NZL-Männchen



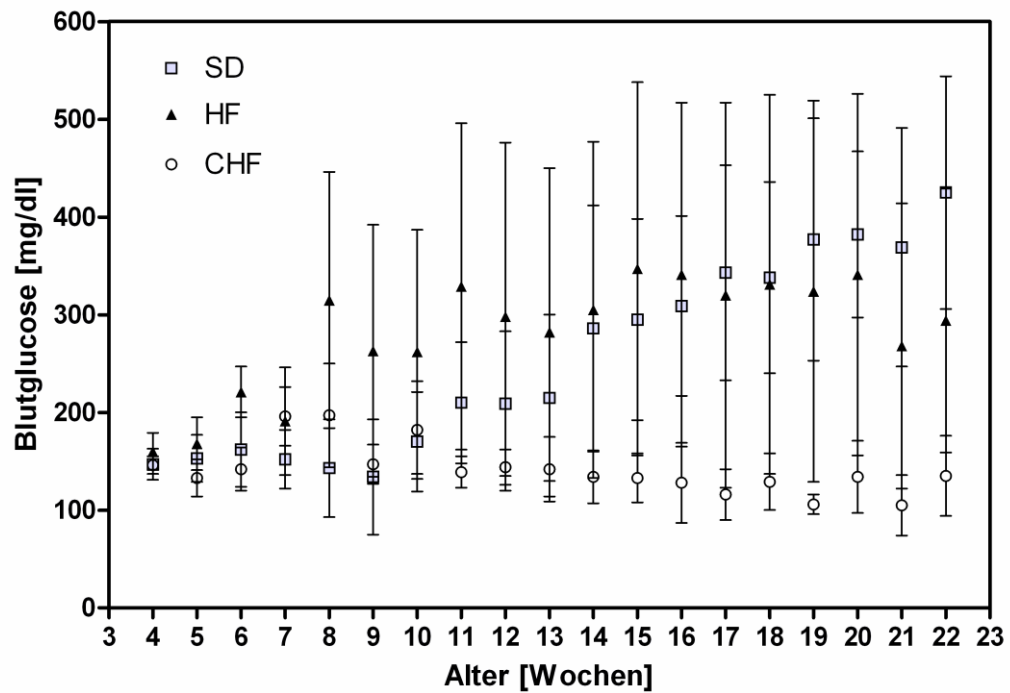
Dargestellt ist die mittlere Körpergewichtsentwicklung (\pm Standardabweichung) für die Dauer der Diätintervention bis zur 22. Woche. n = 14 -21 Tiere / Diätgruppe

A8. Körperfettentwicklung der NZL-Männchen



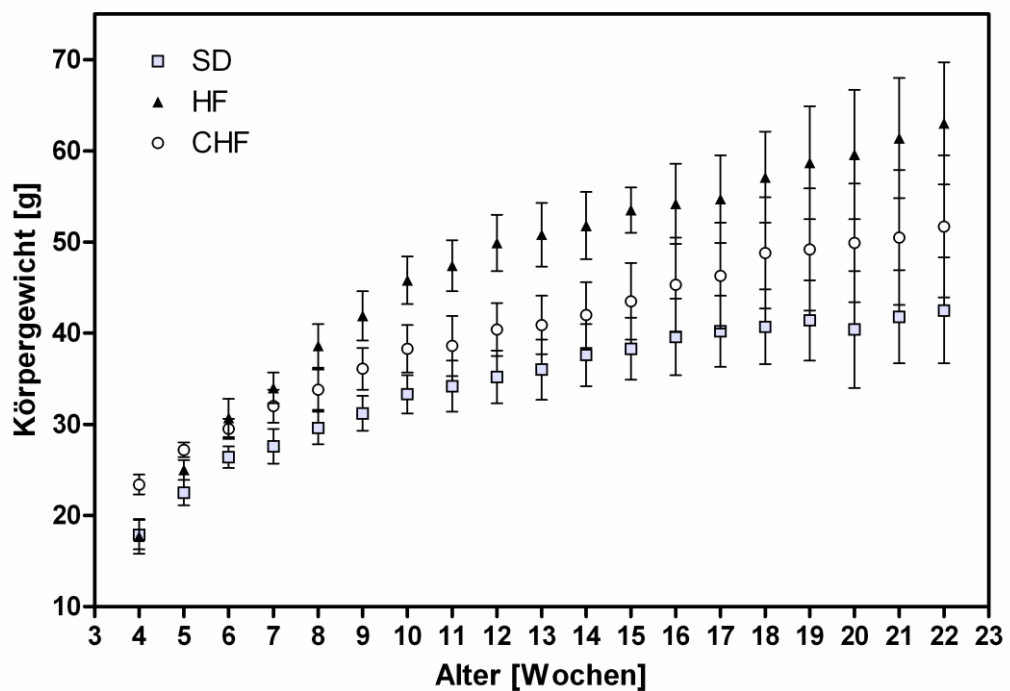
Dargestellt ist die mittlere Körperfettentwicklung (\pm Standardabweichung) für die Dauer der Diätintervention bis zur 22. Woche. n = 14 - 21 Tiere / Diätgruppe

A9. Blutglucoseverlauf der NZL-Männchen



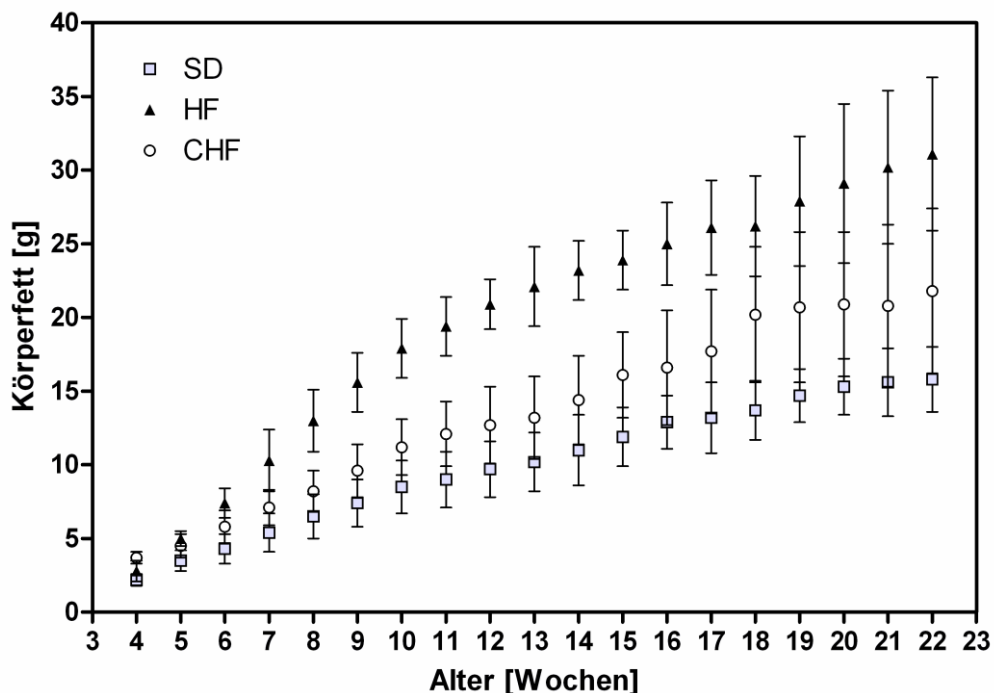
Dargestellt ist die Blutglucoseentwicklung (\pm Standardabweichung) für die Dauer der Diätintervention bis zur 22. Woche. n = 14 - 21 Tiere / Diätgruppe

A10. Körpergewichtsentwicklung der NZL-Weibchen



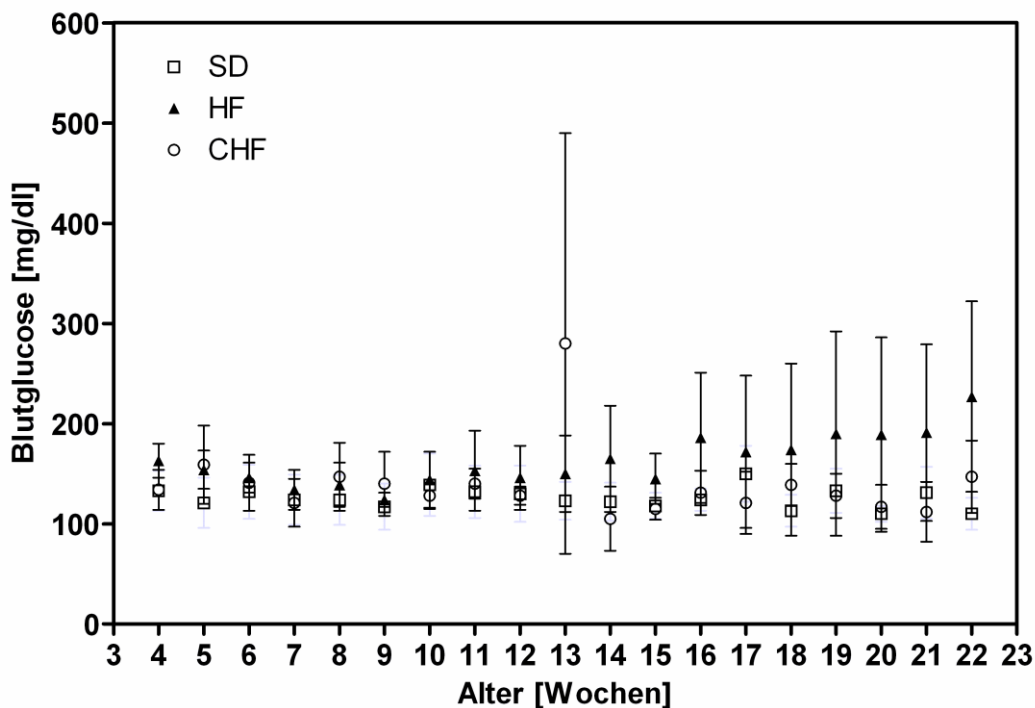
Dargestellt ist die mittlere Körpergewichtsentwicklung (\pm Standardabweichung) für die Dauer der Diätintervention bis zur 22. Woche. n = 14 - 21 Tiere / Diätgruppe

A11. Körperfettentwicklung der NZL-Weibchen



Dargestellt ist die mittlere Körperfettentwicklung (\pm Standardabweichung) für die Dauer der Diätintervention bis zur 22. Woche. n = 14 - 21 Tiere / Diätgruppe

A12. Blutglucoseverlauf der NZL-Weibchen



Dargestellt ist die Blutglucoseentwicklung (\pm Standardabweichung) für die Dauer der Diätintervention bis zur 22. Woche. n = 14 - 21 Tiere / Diätgruppe

A13. Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erhöht exprimierten Gene in den Langerhansschen Inseln der NZL-Männchen in Woche 6

linearen Änderungen: HF vs. CHF

Ensembl-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	lineare Änderung
ENSMUSG00000001622	<i>Csn3</i>	<i>casein kappa</i>	74,65
ENSMUSG000000056071	<i>S100a9</i>	<i>S100 calcium binding protein A9</i>	33,38
ENSMUSG000000037625	<i>Cldn11</i>	<i>claudin 11</i>	32,97
ENSMUSG000000038642	<i>Ctss</i>	<i>cathepsin S</i>	14,05
ENSMUSG000000036699	<i>Zcchc12</i>	<i>zinc finger, CCHC domain containing 12</i>	10,52
ENSMUSG000000056054	<i>S100a8</i>	<i>S100 calcium binding protein A8</i>	9,68
ENSMUSG000000031919	<i>Tmed6</i>	<i>transmembrane emp24 protein transport domain containing 6</i>	9,13
ENSMUSG000000041654	<i>Slc39a11</i>	<i>solute carrier family 39 member 11</i>	8,18
ENSMUSG000000030218	<i>Mgp</i>	<i>matrix Gla protein [</i>	7,77
ENSMUSG000000038418	<i>Egr1</i>	<i>early growth response 1</i>	7,64
ENSMUSG000000073530	<i>Pappa2</i>	<i>pappalysin 2</i>	7,42
ENSMUSG000000035783	<i>Acta2</i>	<i>actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>	7,38
ENSMUSG000000027400	<i>Pdyn</i>	<i>prodynorphin</i>	7,31
ENSMUSG000000044461	<i>Tmem46</i>	<i>transmembrane protein 46</i>	7,24
ENSMUSG000000042371	<i>Slc5a10</i>	<i>solute carrier family 5 member 10</i>	7,14
ENSMUSG000000002014	<i>Ssr4</i>	<i>signal sequence receptor, delta</i>	7,11
ENSMUSG000000035540	<i>Gc</i>	<i>group specific component</i>	6,97
ENSMUSG000000039405	<i>Prss23</i>	<i>protease, serine, 23</i>	6,86
ENSMUSG000000042622	<i>Maff</i>	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F</i>	6,76
ENSMUSG000000040412	<i>5330417C22Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 5330417C22 gene</i>	6,65
ENSMUSG000000039530	<i>Tusc3</i>	<i>tumor suppressor candidate 3</i>	6,31
ENSMUSG000000032532	<i>Cck</i>	<i>cholecystokinin</i>	6,16
ENSMUSG000000039109	<i>F13a1</i>	<i>coagulation factor XIII, A1 subunit</i>	6,08
ENSMUSG000000050335	<i>Lgals3</i>	<i>lectin, galactose binding, soluble 3</i>	5,96
ENSMUSG000000027011	<i>Ube2e3</i>	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3</i>	5,95
ENSMUSG000000058446	<i>Znrf2</i>	<i>zinc and ring finger 2</i>	5,95
ENSMUSG000000024084	<i>Qpct</i>	<i>glutaminyl-peptide cyclotransferase</i>	5,87
ENSMUSG000000026365	<i>Cfh</i>	<i>complement component factor h</i>	5,81
ENSMUSG000000068184	<i>Ndufa12l</i>	<i>Ndufa12-like</i>	5,74
ENSMUSG000000048970	<i>C1galt1c1</i>	<i>C1GALT1-specific chaperone 1</i>	5,65

A14. Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erniedrigt exprimierten Gene in den Langerhansschen Inseln der NZL-Männchen in Woche 6

linearen Änderungen: HF vs. CHF

Ensembl-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	lineare Änderung
ENSMUSG00000064070	<i>2810051F02Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 2810051F02 gene</i>	0,16
ENSMUSG00000032528	<i>Vipr1</i>	<i>vasoactive intestinal peptide receptor 1</i>	0,20
ENSMUSG00000063887	<i>Nlgn1</i>	<i>neuroligin 1</i>	0,21
ENSMUSG00000036391	<i>Sec24a</i>	<i>SEC24 related gene family, member A (</i>	0,22
ENSMUSG00000028514	<i>Usp24</i>	<i>ubiquitin specific peptidase 24</i>	0,22
ENSMUSG00000060771	<i>Tsga10</i>	<i>testis specific 10</i>	0,23
ENSMUSG00000074240	<i>Cib3</i>	<i>calcium and integrin binding family member 3</i>	0,23
ENSMUSG00000058470	<i>Hpvc2</i>	<i>human papillomavirus 18 E5 central sequence motif gene 2</i>	0,23
ENSMUSG00000040283	<i>Btnl9</i>	<i>butyrophilin-like 9</i>	0,24
ENSMUSG00000022618	<i>Chkb</i>	<i>choline kinase beta</i>	0,25
ENSMUSG00000033821	<i>EG328644</i>	<i>predicted gene, EG328644</i>	0,26
ENSMUSG00000042379	<i>Esm1</i>	<i>endothelial cell-specific molecule 1</i>	0,26
ENSMUSG00000025409	<i>Mbd6</i>	<i>methyl-CpG binding domain protein 6</i>	0,26
ENSMUSG00000022211	<i>BC036313</i>	<i>cDNA sequence BC036313</i>	0,27
ENSMUSG00000074629	<i>4930518I15Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 4930518I15 gene</i>	0,27
ENSMUSG00000046613	<i>BC052055</i>	<i>cDNA sequence BC052055</i>	0,27
ENSMUSG00000034384	<i>Barhl2</i>	<i>BarH-like 2 (Drosophila)</i>	0,28
ENSMUSG00000020155	<i>Kcnmb1</i>	<i>potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1</i>	0,29
ENSMUSG00000021514	<i>Zfp369</i>	<i>zinc finger protein 369</i>	0,30
ENSMUSG00000035569	<i>Ankrd11</i>	<i>ankyrin repeat domain 11</i>	0,30
ENSMUSG00000005373	<i>Mlxipl</i>	<i>MLX interacting protein-like</i>	0,30
ENSMUSG00000000686	<i>1300007F04Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 1300007F04 gene</i>	0,30
ENSMUSG00000035545	<i>Leng8</i>	<i>leukocyte receptor cluster (LRC) member 8</i>	0,31
ENSMUSG00000043991	<i>Pura</i>	<i>purine rich element binding protein A</i>	0,31
ENSMUSG00000047787	<i>Flrt1</i>	<i>fibronectin leucine rich transmembrane protein 3</i>	0,31
ENSMUSG00000019917	<i>10-Sep</i>	<i>septin 10</i>	0,32
ENSMUSG00000066072	<i>Cyp4a10</i>	<i>cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10</i>	0,32
ENSMUSG00000021738	<i>Atxn7</i>	<i>ataxin 7</i>	0,33
ENSMUSG00000038803	<i>2310016E02Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 2310016E02 gene</i>	0,33
ENSMUSG00000055639	<i>Dach1</i>	<i>dachshund 1 (Drosophila)</i>	0,33

A15. Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erhöht exprimierten Gene in den Langerhansschen Inseln der NZL-Männchen in Woche 8

linearen Änderungen: HF vs. CHF

Ensembl-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	lineare Änderung
ENSMUSG00000056071	<i>S100a9</i>	<i>S100 calcium binding protein A9</i>	68,50
ENSMUSG00000001622	<i>Csn3</i>	<i>casein kappa</i>	31,06
ENSMUSG00000056054	<i>S100a8</i>	<i>S100 calcium binding protein A8</i>	15,61
ENSMUSG00000071519	<i>Prss3 ; Tcrb-V20</i>	<i>T-cell receptor beta, variable V20</i>	15,49
ENSMUSG00000030218	<i>Mgp</i>	<i>matrix Gla protein</i>	12,96
ENSMUSG00000038642	<i>Ctss</i>	<i>cathepsin S</i>	12,54
ENSMUSG00000031919	<i>Tmed6</i>	<i>transmembrane emp24 protein transport domain containing 6</i>	12,49
ENSMUSG00000032532	<i>Cck</i>	<i>cholecystokinin</i>	11,83
ENSMUSG00000026365	<i>Cfh</i>	<i>complement component factor h</i>	11,09
ENSMUSG00000069516	<i>Lyzs</i>	<i>lysozyme</i>	8,56
ENSMUSG00000026822	<i>Lcn2</i>	<i>lipocalin 2</i>	8,54
ENSMUSG00000036699	<i>Zcchc12</i>	<i>zinc finger, CCHC domain containing 12</i>	8,43
ENSMUSG00000052428	<i>Tmco1</i>	<i>transmembrane and coiled-coil domains 1</i>	7,62
ENSMUSG00000037625	<i>Cldn11</i>	<i>claudin 11</i>	7,57
ENSMUSG00000019997	<i>Ctgf</i>	<i>connective tissue growth factor</i>	7,06
ENSMUSG00000038393	<i>Txnip</i>	<i>thioredoxin interacting protein</i>	6,88
ENSMUSG00000039405	<i>Prss23</i>	<i>protease, serine, 23</i>	6,76
ENSMUSG00000027750	<i>Postn</i>	<i>periostin, osteoblast specific factor</i>	6,75
ENSMUSG00000068184	<i>Ndufa12l</i>	<i>Ndufa12-like</i>	6,71
ENSMUSG00000038418	<i>Egr1</i>	<i>early growth response 1</i>	6,35
ENSMUSG00000027712	<i>Anxa5</i>	<i>annexin A5</i>	6,19
ENSMUSG00000041654	<i>Slc39a11</i>	<i>solute carrier family 39 member 11</i>	6,17
ENSMUSG00000006574	<i>Slc4a1</i>	<i>solute carrier family 4 member 1</i>	5,85
ENSMUSG00000048058	<i>Ldlrad3</i>	<i>low density lipoprotein receptor class A domain containing 3</i>	5,76
ENSMUSG00000016427	<i>Ndufa1</i>	<i>NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex, 1</i>	5,64
ENSMUSG00000029304	<i>Spp1</i>	<i>secreted phosphoprotein 1</i>	5,48
ENSMUSG00000002014	<i>Ssr4</i>	<i>signal sequence receptor, delta</i>	5,47
ENSMUSG00000026223	<i>Itm2c</i>	<i>integral membrane protein 2C</i>	5,40
ENSMUSG00000036781	<i>Rps27l</i>	<i>ribosomal protein S27-like</i>	5,34
ENSMUSG00000042371	<i>Slc5a10</i>	<i>solute carrier family 5 member 10</i>	5,33

A16. Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erniedrigt exprimierten Gene in den Langerhansschen Inseln der NZL-Männchen in Woche 8

linearen Änderungen: HF vs. CHF

Ensembl-ID	Gen-Symbol	Gen-Name	lineare Änderung
ENSMUSG00000058159	<i>T2</i>	<i>brachyury 2</i>	0,17
ENSMUSG00000048779	<i>P2ry6</i>	<i>pyrimidineric receptor P2Y, G-protein coupled, 6</i>	0,19
ENSMUSG00000047787	<i>Fln1</i>	<i>fibronectin leucine rich transmembrane protein 3</i>	0,22
ENSMUSG00000058470	<i>Hpvc2</i>	<i>human papillomavirus 18 E5 central sequence motif gene 2</i>	0,23
ENSMUSG00000023140	<i>Reg2</i>	<i>regenerating islet-derived 2</i>	0,23
ENSMUSG00000033821	<i>EG328644</i>	<i>predicted gene, EG328644</i>	0,24
ENSMUSG00000024186	<i>Rgs11</i>	<i>regulator of G-protein signaling 11</i>	0,24
ENSMUSG00000061126	<i>Cyp4f39</i>	<i>cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 39</i>	0,25
ENSMUSG00000060600	<i>Eno3</i>	<i>enolase 3, beta muscle</i>	0,26
ENSMUSG00000073210	<i>6720401G13Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 6720401G13 gene</i>	0,26
ENSMUSG00000005373	<i>Mlxipl</i>	<i>MLX interacting protein-like</i>	0,27
ENSMUSG00000030785	<i>Cox6a2</i>	<i>cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 2</i>	0,27
ENSMUSG00000058662	<i>Olf69</i>	<i>olfactory receptor 69</i>	0,28
ENSMUSG00000023912	<i>Slc25a27</i>	<i>solute carrier family 25, member 27</i>	0,28
ENSMUSG00000051550	<i>Zfp579</i>	<i>zinc finger protein 579</i>	0,29
ENSMUSG00000028357	<i>Kif12</i>	<i>kinesin family member 12</i>	0,30
ENSMUSG00000074629	<i>4930518I15Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 4930518I15 gene</i>	0,31
ENSMUSG00000060771	<i>Tsga10</i>	<i>testis specific 10</i>	0,32
ENSMUSG00000022211	<i>BC036313</i>	<i>cDNA sequence BC036313</i>	0,32
ENSMUSG00000053964	<i>Lgals4</i>	<i>lectin, galactose binding, soluble 4</i>	0,32
ENSMUSG00000022490	<i>Ppp1r1a</i>	<i>protein phosphatase 1, regulatory</i>	0,33
ENSMUSG00000044748	<i>Defb1</i>	<i>defensin beta 1</i>	0,33
ENSMUSG00000009246	<i>Trpm5</i>	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5</i>	0,33
ENSMUSG00000028514	<i>Usp24</i>	<i>ubiquitin specific peptidase 24</i>	0,33
ENSMUSG00000005640	<i>Insrr</i>	<i>insulin receptor-related receptor</i>	0,34
ENSMUSG00000055639	<i>Dach1</i>	<i>dachshund 1 (Drosophila)</i>	0,34
ENSMUSG00000059824	<i>Dbp</i>	<i>D site albumin promoter binding protein</i>	0,34
ENSMUSG00000074240	<i>Cib3</i>	<i>calcium and integrin binding family member 3</i>	0,34
ENSMUSG00000044676	<i>Zfp612</i>	<i>zinc finger protein 612</i>	0,35
ENSMUSG00000066072	<i>Cyp4a10</i>	<i>cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10</i>	0,35

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
B6	<i>C57 Black, C57BL/6</i>
bp	Basenpaare
BG	Blutglucose
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CHF	kohlenhydratfreie Hochfett-Diät
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	2-[2-(Bis(carboxymethyl)amino)ethyl-(carboxymethyl)amino]essigsäure
EGTA	Glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
GAPDH	Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase
Genrif	<i>Gene References Into Function</i>
GO	Gene Ontology
GSIS	Glucose stimulierte Insulinsekretion
GWA	genomweite Assoziationstudien
HDL-C	<i>high density lipoprotein cholesterol</i>
HF	Hochfett-Diät
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL6	Interleukin 6
<i>i.p.</i>	<i>intra-peretonal</i>
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KF	Körperfett
KG	Körpergewicht
KL	Körperlänge
Mb	Megabasen
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
ME	metabolisierbare Energie
MM	<i>mismatch</i>
<i>Mm</i>	<i>Mus musculus</i>
MRL	Max-Rubner-Laboratorium
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>

NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NZB	<i>New Zealand black</i>
NZO	<i>New Zealand obese</i>
NZL	<i>New Zealand-L</i>
Oxphos	oxidative Phosphorylierung
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
PM	<i>perfect match</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standarddiät
SDS	Natriumdodecylsulfat
SJL	<i>Swiss Jim Lambert</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T2DM	<i>Typ-2-Diabetes Mellitus</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRS	<i>Target Retrieval Solution</i>
U	<i>unit</i>
U/min	Umdrehungsfrequenz
v/v	Volumen/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
WHO	<i>World Health Organization</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Photolithographisches Verfahren zur Herstellung von Affymetrix GeneChips®	12
Abb. 2:	Probenvorbereitung für die Expressionsanalyse mittels Affymetrix GeneChips®	13
Abb. 3:	Versuchsdesign zu den Expressionsanalysen des weißen Fettgewebes der NZO-Maus auf verschiedenen Diäten	33
Abb. 4:	Gene der oxidativen Phosphorylierung und deren Änderung	38
Abb. 5:	Validierung der Oxphos-Expression mittels quantitativer <i>Real-Time-PCR</i>	39
Abb. 6:	Semiquantitative Bestimmung der Mitochondrienanzahl im weißen Fettgewebe	40
Abb. 7:	Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung des weißen Fettgewebes	41
Abb. 8:	Nachweis oxidativ veränderter Proteine im weißen Fettgewebe der NZO-Maus im Vergleich zu schlanken Mäusen der Kontrollstämme SJL und B6	42
Abb. 9:	Regulation der Immunstoffwechselwege im weißen Fettgewebe	43
Abb. 10:	Immun- und Makrophagenmarker im weißen Fettgewebe	44
Abb. 11:	Vergleich des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels der beiden Mausstämme NZO und SJL	46
Abb. 12:	<i>i.p.</i> Glucosetoleranztest der NZL-Männchen in Lebenswoche 8	51
Abb. 13:	Immunhistochemische Färbung des Pankreas	52
Abb. 14:	Versuchsdesign zu den Untersuchungen an den isolierten Langerhansschen Inseln und phänotypische Parameter der für die Arrays verwendeten NZL-Mäuse	53
Abb. 15:	Übersichtsdiagramm zur Eingrenzung der Kandidatengene	55
Abb. 16:	Validierung der Arrayergebnisse mittels <i>Real-Time-PCR</i>	57
Abb. 17:	Expressionsvergleich zwischen den Langerhansschen Inseln und dem Gesamtpankreas	58
Abb. 18:	Verteilung von ChREBP im Gesamtpankreas	60
Abb. 19:	Expressionsmuster der bekannten Zielgene von <i>Mlxipl</i>	61
Abb. 20:	Identifikation von diätregulierten Genen in der Inselzelle der NZL-Maus mit Assoziation zu den GWA (<i>Broad DGI T2D</i> und <i>WTCCC</i>)	64
Abb. 21:	<i>Real-Time-PCR</i> -Ergebnisse der aus dem Vergleich der genomweiten Assoziationsstudien erhaltenen Gene	66

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	TaqMan-Sonden für die <i>Real-Time-PCR</i>	16
Tab. 2:	Verwendete Oligonukleotid-Primer	17
Tab. 3:	Verwendete Reaktionskits	17
Tab. 4:	Zusammensetzung der verwendeten Diäten	18
Tab. 5:	Zeitschema zur Schnellfärbung von Kryoschnitten	27
Tab. 6:	Entwässerungsschema zur Gewebeaufarbeitung	30
Tab. 7:	Übersicht zur Entparaffinierung und Dehydrierung von Gewebeschnitten	30
Tab. 8:	Verwendete Primärantikörper	31
Tab. 9:	Verwendete Sekundärantikörper	31
Tab. 10:	Charakterisierung der NZO-Maus in den Lebenswochen 4, 8 und 12	34
Tab. 11:	Expression der am stärksten durch die Hochfett-Diät erhöht und erniedrigt exprimierten Gene im WAT der NZO-Männchen in Woche 8	36
Tab. 12:	Signifikant regulierte Stoffwechselwege im weißen Fettgewebe der NZO-Maus in Lebenswoche 8	37
Tab. 13:	Gemessene Plasmaparameter der NZO-Maus	45
Tab. 14:	Charakterisierung der NZL-Tiere auf verschiedenen Diäten	49
Tab. 15:	Zusammenfassung der durch die Diät regulierten Kandidatengene	56
Tab. 16:	Signifikant regulierte Stoffwechselwege für die Wochen 6 und 8	63
Tab. 17:	Gegenüberstellung der differenziell regulierten Gene aus den Langerhansschen Inseln mit den korrespondierenden Daten aus den genomweiten Assoziationsstudien	65

Literaturverzeichnis

- Ahn YB, Xu G, Marselli L, Toschi E, Sharma A, Bonner-Weir S, Sgroi DC, Weir GC: Changes in gene expression in beta cells after islet isolation and transplantation using laser-capture microdissection. *Diabetologia* 50:334-342, 2007
- Akpinar P, Kuwajima S, Krutzfeldt J, Stoffel M: Tmem27: a cleaved and shed plasma membrane protein that stimulates pancreatic beta cell proliferation. *Cell Metab* 2:385-397, 2005
- Al-Hasani H, Joost HG: Nutrition-/diet-induced changes in gene expression in white adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:589-603, 2005
- Al-Hasani H, Tschop MH, Cushman SW: Two birds with one stone: novel glucokinase activator stimulates glucose-induced pancreatic insulin secretion and augments hepatic glucose metabolism. *Mol Interv* 3:367-370, 2003
- Altshuler D, Daly MJ, Lander ES: Genetic mapping in human disease. *Science* 322:881-888, 2008
- Attie AD, Kendziora CM: PGC-1alpha at the crossroads of type 2 diabetes. *Nat Genet* 34:244-245, 2003
- Bays HE, Gonzalez-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR: Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6:343-368, 2008
- Beinfeld MC, Blum A, Vishnuvardhan D, Fanous S, Marchand JE: Cholecystokinin levels in prohormone convertase 2 knock-out mouse brain regions reveal a complex phenotype of region-specific alterations. *J Biol Chem* 280:38410-38415, 2005
- Berghöfer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN: Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health* 8:200, 2008
- Bessesen DH: Update on obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2027-2034, 2008
- Bielschowsky M, Bielschowsky f: A NEW STRAIN OF MICE WITH HEREDITARY OBESITY. *Proc Univ Otago Med School* 31:29-31, 1953
- Bielschowsky M, Goodall CM: Origin of inbred NZ mouse strains. *Cancer Res* 30:834-836, 1970
- Bishop AE, Polak JM: *Textbook of Diabetes*. Oxford, Blackwell, 1997
- Bloch K, Shichman E, Vorobeychik M, Bloch D, Vardi P: Catalase expression in pancreatic alpha cells of diabetic and non-diabetic mice. *Histochem Cell Biol* 127:227-232, 2007
- Blüher M: The inflammatory process of adipose tissue. *Pediatr Endocrinol Rev* 6:24-31, 2008
- Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsoe R, Dela F: Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50:790-796, 2007
- Bouwens L, Rooman I: Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev* 85:1255-1270, 2005
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110, 2003

- Chadt A, Leicht K, Deshmukh A, Jiang LQ, Scherneck S, Bernhardt U, Dreja T, Vogel H, Schmolz K, Kluge R, Zierath JR, Hultschig C, Hoeben RC, Schurmann A, Joost HG, Al-Hasani H: Tbc1d1 mutation in lean mouse strain confers leanness and protects from diet-induced obesity. *Nat Genet* 40:1354-1359, 2008
- Chandalia M, Abate N: Metabolic complications of obesity: inflated or inflamed? *J Diabetes Complications* 21:128-136, 2007
- Chandra R, Liddle RA: Cholecystokinin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14:63-67, 2007
- Chen J, Saxena G, Mungrue IN, Lusis AJ, Shalev A: Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes* 57:938-944, 2008
- Chen X, Cushman SW, Pannell LK, Hess S: Quantitative proteomic analysis of the secretory proteins from rat adipose cells using a 2D liquid chromatography-MS/MS approach. *J Proteome Res* 4:570-577, 2005
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299, 1979
- Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987
- Choo HJ, Kim JH, Kwon OB, Lee CS, Mun JY, Han SS, Yoon YS, Yoon G, Choi KM, Ko YG: Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia* 49:784-791, 2006
- Cook KS, Min HY, Johnson D, Chaplinsky RJ, Flier JS, Hunt CR, Spiegelman BM: Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 237:402-405, 1987
- Corbett JA: Thioredoxin-interacting protein is killing my beta-cells! *Diabetes* 57:797-798, 2008
- Crofford OB, Davis CK, Jr.: Growth Characteristics, Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity of New Zealand Obese Mice. *Metabolism* 14:271-280, 1965
- da Silva Xavier G, Rutter GA, Diraison F, Andreolas C, Leclerc I: ChREBP binding to fatty acid synthase and L-type pyruvate kinase genes is stimulated by glucose in pancreatic beta-cells. *J Lipid Res* 47:2482-2491, 2006
- Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG: The affymetrix GeneChip platform: an overview. *Methods Enzymol* 410:3-28, 2006
- Das SK, Elbein SC: The Genetic Basis of Type 2 Diabetes. *Cellscience* 2:100-131, 2006
- de Koning EJ, Bonner-Weir S, Rabelink TJ: Preservation of beta-cell function by targeting beta-cell mass. *Trends Pharmacol Sci* 29:218-227, 2008
- Despres JP, Lemieux I: Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444:881-887, 2006
- Doria A, Patti ME, Kahn CR: The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab* 8:186-200, 2008
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA: Laser capture microdissection. *Science* 274:998-1001, 1996
- Espina V, Heiby M, Pierobon M, Liotta LA: Laser capture microdissection technology. *Expert Rev Mol Diagn* 7:647-657, 2007
- Fantus: Endotext.com, 2004

- Fukui K, Yang Q, Cao Y, Takahashi N, Hatakeyama H, Wang H, Wada J, Zhang Y, Marselli L, Nammo T, Yoneda K, Onishi M, Higashiyama S, Matsuzawa Y, Gonzalez FJ, Weir GC, Kasai H, Shimomura I, Miyagawa J, Wollheim CB, Yamagata K: The HNF-1 target collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation. *Cell Metab* 2:373-384, 2005
- Garosi P, De Filippo C, van Erk M, Rocca-Serra P, Sansone SA, Elliott R: Defining best practice for microarray analyses in nutrigenomic studies. *Br J Nutr* 93:425-432, 2005
- Gawlik V, Schmidt S, Scheepers A, Wennemuth G, Augustin R, Aumuller G, Moser M, Al-Hasani H, Kluge R, Joost HG, Schurmann A: Targeted disruption of Slc2a8 (GLUT8) reduces motility and mitochondrial potential of spermatozoa. *Mol Membr Biol* 25:224-235, 2008
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J: Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80, 2004
- Giesen K, Plum L, Kluge R, Ortlepp J, Joost HG: Diet-dependent obesity and hypercholesterolemia in the New Zealand obese mouse: identification of a quantitative trait locus for elevated serum cholesterol on the distal mouse chromosome 5. *Biochem Biophys Res Commun* 304:812-817, 2003
- Giovannucci E: Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *Am J Clin Nutr* 86:s836-842, 2007
- Goossens GH: The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav* 94:206-218, 2008
- Guichard C, Moreau R, Pessayre D, Epperson TK, Krause KH: NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? *Biochem Soc Trans* 36:920-929, 2008
- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP: Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:367-377, 2008
- Hanefeld M, Schaper F, Ceriello A: [History and definition(s) of metabolic syndrome]. *Internist (Berl)* 48:117-125, 2007
- Herwig R, Aanstad P, Clark M, Lehrach H: Statistical evaluation of differential expression on cDNA nylon arrays with replicated experiments. *Nucleic Acids Res* 29:E117, 2001
- Herwig R, Lehrach H: Expression profiling of drug response--from genes to pathways. *Dialogues Clin Neurosci* 8:283-293, 2006
- Hoebeek J, Speleman F, Vandesompele J: Real-time quantitative PCR as an alternative to Southern blot or fluorescence in situ hybridization for detection of gene copy number changes. *Methods Mol Biol* 353:205-226, 2007
- Hohmeier HE, Newgard CB: Cell lines derived from pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol* 228:121-128, 2004
- Hotamisligil GS, Spiegelman BM: Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43:1271-1278, 1994
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES: Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440:944-948, 2006
- Hui TY, Sheth SS, Diffley JM, Potter DW, Lusic AJ, Attie AD, Davis RA: Mice lacking thioredoxin-interacting protein provide evidence linking cellular redox state to appropriate response to nutritional signals. *J Biol Chem* 279:24387-24393, 2004

- Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K: Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7281-7286, 2004
- Iizuka K, Horikawa Y: ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr J* 55:617-624, 2008
- Ishii S, Iizuka K, Miller BC, Uyeda K: Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15597-15602, 2004
- Joost HG: Pathogenesis, Risk Assessment and Prevention of Type 2 Diabetes mellitus. *Obesity Facts* 1:128-137, 2008
- Jörns A, Tiedge M, Ziv E, Shafrir E, Lenzen S: Gradual loss of pancreatic beta-cell insulin, glucokinase and GLUT2 glucose transporter immunoreactivities during the time course of nutritionally induced type-2 diabetes in *Psammomys obesus* (sand rat). *Virchows Arch* 440:63-69, 2002
- Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA: Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:547-566, 2005
- Junger E, Herberg L, Jeruschke K, Leiter EH: The diabetes-prone NZO/HI strain. II. Pancreatic immunopathology. *Lab Invest* 82:843-853, 2002
- Juergens HS, Neschen S, Ortmann S, Scherneck S, Schmolz K, Schuler G, Schmidt S, Bluher M, Klaus S, Perez-Tilve D, Tschop MH, Schurmann A, Joost HG: Development of diabetes in obese, insulin-resistant mice: essential role of dietary carbohydrate in beta cell destruction. *Diabetologia* 50:1481-1489, 2007
- Juergens HS, Schurmann A, Kluge R, Ortmann S, Klaus S, Joost HG, Tschop MH: Hyperphagia, lower body temperature, and reduced running wheel activity precede development of morbid obesity in New Zealand obese mice. *Physiol Genomics* 25:234-241, 2006
- Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski BE, Uyeda K: Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5107-5112, 2003
- Kageyama H, Kita T, Horie S, Takenoya F, Funahashi H, Kato S, Hirayama M, Young Lee E, Sakurai J, Inoue S, Shioda S: Immunohistochemical analysis of cholecystokinin A receptor distribution in the rat pancreas. *Regul Pept* 126:137-143, 2005
- Kaneto H, Kawamori D, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Yamasaki Y: Oxidative stress and pancreatic beta-cell dysfunction. *Am J Ther* 12:529-533, 2005
- Kasuga M: Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J Clin Invest* 116:1756-1760, 2006
- Kerner W: Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie* 2007: 2 Suppl2:147-149, 2007
- Kim JA, Wei Y, Sowers JR: Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res* 102:401-414, 2008
- Klaus S: Adipose Tissue. Georgetown Texas, USA, LANDES Bioscience, 2001
- Kluth O: Untersuchungen zum Pathomechanismus des β -Zelluntergangs der Langerhans-Inseln in einem polygenen Mausmodell für das metabolische Syndrom, der New Zealand obese (NZO)-Maus. Diplomarbeit, 2008

- Kluth O, Mirhrashemi F, Scherneck S, Schürmann A, Joost H, Neschen S: Untersuchungen zum Pathomechanismus des β -Zelluntergangs der NZO-Maus. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2008 3: S1-S126:S52, 2008
- Kuntz E, Pinget M, Damge P: Cholecystokinin octapeptide: a potential growth factor for pancreatic beta cells in diabetic rats. *Jop* 5:464-475, 2004
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970
- Lavine JA, Raess PW, Davis DB, Rabaglia ME, Presley BK, Keller MP, Beinfeld MC, Kopin AS, Newgard CB, Attie AD: Overexpression of pre-pro-cholecystokinin stimulates β -cell proliferation in mouse and human islets with retention of islet function. *Mol Endocrinol*, 2008
- Lazar MA: How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307:373-375, 2005
- Leak TS, Keene KL, Langefeld CD, Gallagher CJ, Mychaleckyj JC, Freedman BI, Bowden DW, Rich SS, Sale MM: Association of the proprotein convertase subtilisin/kexin-type 2 (PCSK2) gene with type 2 diabetes in an African American population. *Mol Genet Metab* 92:145-150, 2007
- Lee NH, Saeed AI: Microarrays: an overview. *Methods Mol Biol* 353:265-300, 2007
- Linde S, Welinder BS, Nielsen JH: Analysis of proinsulin and its conversion products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 614:185-204, 1993
- Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25:402-408, 2001
- Lowell BB, Shulman GI: Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307:384-387, 2005
- Lusis AJ, Attie AD, Reue K: Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. *Nat Rev Genet* 9:819-830, 2008
- MacDougald OA, Burant CF: The rapidly expanding family of adipokines. *Cell Metab* 6:159-161, 2007
- Marselli L, Thorne J, Ahn YB, Omer A, SgROI DC, Libermann T, Otu HH, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC: Gene expression of purified beta-cell tissue obtained from human pancreas with laser capture microdissection. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1046-1053, 2008
- Martin S: Behandlung des Diabetes mellitus Typ 1. *Diabetologie* 2007: 2 Suppl2:171-172, 2007
- Martinez SC, Cras-Meneur C, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA: Glucose regulates Foxo1 through insulin receptor signaling in the pancreatic islet beta-cell. *Diabetes* 55:1581-1591, 2006
- McClain KL, Cai YH, Hicks J, Peterson LE, Yan XT, Che S, Ginsberg SD: Expression profiling using human tissues in combination with RNA amplification and microarray analysis: assessment of Langerhans cell histiocytosis. *Amino Acids* 28:279-290, 2005
- McInerney MF, Najjar SM, Brickley D, Lutzke M, Abou-Rjaily GA, Reifsnyder P, Haskell BD, Flurkey K, Zhang YJ, Pietropaolo SL, Pietropaolo M, Byers JP, Leiter EH: Anti-insulin receptor autoantibodies are not required for type 2 diabetes pathogenesis in NZL/Lt mice, a New Zealand obese (NZO)-derived mouse strain. *Exp Diabetes Res* 5:177-185, 2004
- Minn AH, Hafele C, Shalev A: Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 146:2397-2405, 2005

- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC: PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-273, 2003
- Müller H-J, Röder T: *Der Experimentator Microarrays*. München, Spektrum Akademischer VerlagElsevier GmbH, 2004
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273, 1986
- Muoio DM, Newgard CB: Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:193-205, 2008
- Murray GI: An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochem* 109:171-176, 2007
- Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD: The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11371-11376, 2000
- Namkung Y, Skrypnik N, Jeong MJ, Lee T, Lee MS, Kim HL, Chin H, Suh PG, Kim SS, Shin HS: Requirement for the L-type Ca(2+) channel alpha(1D) subunit in postnatal pancreatic beta cell generation. *J Clin Invest* 108:1015-1022, 2001
- Nohl H, Kozlov AV, Gille L, Staniek K: Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochem Soc Trans* 31:1308-1311, 2003
- Okuda S, Yamada T, Hamajima M, Itoh M, Katayama T, Bork P, Goto S, Kanehisa M: KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways. *Nucleic Acids Res* 36:W423-426, 2008
- O'Rahilly S, Barroso I, Wareham NJ: Genetic factors in type 2 diabetes: the end of the beginning? *Science* 307:370-373, 2005
- Ortlepp JR, Kluge R, Giesen K, Plum L, Radke P, Hanrath P, Joost HG: A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse. *Eur J Clin Invest* 30:195-202, 2000
- Page GP, Zakharkin SO, Kim K, Mehta T, Chen L, Zhang K: Microarray analysis. *Methods Mol Biol* 404:409-430, 2007
- Panten U, Rustenbeck I: Fuel-induced amplification of insulin secretion in mouse pancreatic islets exposed to a high sulfonylurea concentration: role of the NADPH/NADP(+) ratio. *Diabetologia* 51:101-109, 2008
- Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI: Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300:1140-1142, 2003
- Pirinen E, Kuulasmaa T, Pietila M, Heikkinen S, Tusa M, Itkonen P, Boman S, Skommer J, Virkamaki A, Hohtola E, Kettunen M, Fatrai S, Kansanen E, Koota S, Niiranen K, Parkkinen J, Levonen AL, Yla-Herttuala S, Hiltunen JK, Alhonen L, Smith U, Janne J, Laakso M: Enhanced polyamine catabolism alters homeostatic control of white adipose tissue mass, energy expenditure, and glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 27:4953-4967, 2007

- Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J: Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* 102:89-97, 2000
- Plum L, Giesen K, Kluge R, Junger E, Linnartz K, Schurmann A, Becker W, Joost HG: Characterisation of the mouse diabetes susceptibility locus Nidd/SJL: islet cell destruction, interaction with the obesity QTL Nob1, and effect of dietary fat. *Diabetologia* 45:823-830, 2002
- Poitout V, Robertson RP: Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143:339-342, 2002
- Poitout V, Robertson RP: Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29:351-366, 2008
- Pomplun D, Voigt A, Schulz TJ, Thierbach R, Pfeiffer AF, Ristow M: Reduced expression of mitochondrial frataxin in mice exacerbates diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6377-6381, 2007
- Postic C, Dentin R, Denechaud PD, Girard J: ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 27:179-192, 2007
- Powelka AM, Seth A, Virbasius JV, Kiskinis E, Nicoloro SM, Guilherme A, Tang X, Straubhaar J, Cherniack AD, Parker MG, Czech MP: Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. *J Clin Invest* 116:125-136, 2006
- Prentki M, Nolan CJ: Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116:1802-1812, 2006
- Rasche A, Al-Hasani H, Herwig R: Meta-analysis approach identifies candidate genes and associated molecular networks for type-2 diabetes mellitus. *BMC Genomics* 9:310, 2008
- Reitman ML, Gavrilova O: A-ZIP/F-1 mice lacking white fat: a model for understanding lipotrophic diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 4:S11-14, 2000
- Rhodes CJ: Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307:380-384, 2005
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V: Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1:S119-124, 2004
- Rogers S, Cambrosio A: Making a new technology work: the standardization and regulation of microarrays. *Yale J Biol Med* 80:165-178, 2007
- Rong JX, Qiu Y, Hansen MK, Zhu L, Zhang V, Xie M, Okamoto Y, Mattie MD, Higashiyama H, Asano S, Strum JC, Ryan TE: Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes* 56:1751-1760, 2007
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* 24:476-480, 1992
- Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA, Wasson J, Debenham SL, Daly A, Lango H, Frayling TM, Neumann RJ, Sherva R, Blech I, Pharoah PD, Palmer CN, Kimber C, Tavendale R, Morris AD, McCarthy MI, Walker M, Hitman G, Glaser B, Permutt MA, Hattersley AT, Wareham NJ, Barroso I: Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 39:951-953, 2007
- Sanghera DK, Ortega L, Han S, Singh J, Ralhan SK, Wander GS, Mehra NK, Mulvihill JJ, Ferrell RE, Nath SK, Kamboh MI: Impact of nine common type 2 diabetes risk

polymorphisms in Asian Indian Sikhs: PPARG2 (Pro12Ala), IGF2BP2, TCF7L2 and FTO variants confer a significant risk. *BMC Med Genet* 9:59, 2008

Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Bostrom K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Rastam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjogren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke D, Purcell S: Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316:1331-1336, 2007

Schenk S, Saberi M, Olefsky JM: Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118:2992-3002, 2008

Scherer PE: Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55:1537-1545, 2006

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746-26749, 1995

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T: The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3, 2006

Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M: Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 6:280-293, 2007

Schulze MB, Hoffmann K, Boeing H, Linseisen J, Rohrmann S, Mohlig M, Pfeiffer AF, Spranger J, Thamer C, Haring HU, Fritsche A, Joost HG: An accurate risk score based on anthropometric, dietary, and lifestyle factors to predict the development of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30:510-515, 2007

Schweiger M, Steffl M, Amselgruber WM: Determination of target cells for cholecystokinin in the porcine pancreas. *Ann Anat* 187:209-214, 2005

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M: A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316:1341-1345, 2007

Semple RK, Crowley VC, Sewter CP, Laudes M, Christodoulides C, Considine RV, Vidal-Puig A, O'Rahilly S: Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1 α is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:176-179, 2004

Shimano H: Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res* 40:439-452, 2001

Shimizu K, Kato Y, Shiratori K, Ding Y, Song Y, Furlanetto R, Chang TM, Watanabe S, Hayashi N, Kobayashi M, Chey WY: Evidence for the existence of CCK-producing cells in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 139:389-396, 1998

- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P: A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445:881-885, 2007
- Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR: A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 54:1926-1933, 2005
- Staiger H, Machicao F, Kantartzis K, Schafer SA, Kirchhoff K, Guthoff M, Silbernagel G, Stefan N, Fritsche A, Haring HU: Novel meta-analysis-derived type 2 diabetes risk loci do not determine prediabetic phenotypes. *PLoS ONE* 3:e3019, 2008
- Steinhoff C, Vingron M: Normalization and quantification of differential expression in gene expression microarrays. *Brief Bioinform* 7:166-177, 2006
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW: Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365:1333-1346, 2005
- Sun G: Application of DNA microarrays in the study of human obesity and type 2 diabetes. *Omics* 11:25-40, 2007
- Tilg H, Moschen AR: Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6:772-783, 2006
- Todd R, Lingen MW, Kuo WP: Gene expression profiling using laser capture microdissection. *Expert Rev Mol Diagn* 2:497-507, 2002
- Uyeda K, Repa JJ: Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 4:107-110, 2006
- van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ, Hu FB: Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care* 25:417-424, 2002
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034, 2002
- Vázquez M, Silvestre JS, Prous JR: Experimental approaches to study PPAR gamma agonists as antidiabetic drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 24:515-523, 2002
- Veroni MC, Proietto J, Larkins RG: Evolution of insulin resistance in New Zealand obese mice. *Diabetes* 40:1480-1487, 1991
- Wang C, Powell MJ, Popov VM, Pestell RG: Acetylation in nuclear receptor signaling and the role of sirtuins. *Mol Endocrinol* 22:539-545, 2008
- Wang H, Wollheim CB: ChREBP rather than USF2 regulates glucose stimulation of endogenous L-pyruvate kinase expression in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 277:32746-32752, 2002
- Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A: Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1:S154-159, 2001
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808, 2003
- Wellen KE, Hotamisligil GS: Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1785-1788, 2003

- Wiltgen M, Tilz GP: DNA microarray analysis: principles and clinical impact. *Hematology* 12:271-287, 2007
- Wu Z, Irizarry R, Gentleman R, Murillo F, Spencer F: A Model Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. Johns Hopkins University, Dept of Biostatistics Working Papers 2004 (1), 2004
- Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB: Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356-362, 2005
- Yang X, Smith U: Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? *Diabetologia* 50:1127-1139, 2007
- Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, de Bakker PI, Abecasis GR, Almgren P, Andersen G, Ardlie K, Bostrom KB, Bergman RN, Bonnycastle LL, Borch-Johnsen K, Burtt NP, Chen H, Chines PS, Daly MJ, Deodhar P, Ding CJ, Doney AS, Duren WL, Elliott KS, Erdos MR, Frayling TM, Freathy RM, Gianniny L, Grallert H, Grarup N, Groves CJ, Guiducci C, Hansen T, Herder C, Hitman GA, Hughes TE, Isomaa B, Jackson AU, Jorgensen T, Kong A, Kubalanza K, Kuruvilla FG, Kuusisto J, Langenberg C, Lango H, Lauritzen T, Li Y, Lindgren CM, Lyssenko V, Marvelle AF, Meisinger C, Midthjell K, Mohlke KL, Morken MA, Morris AD, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Palmer CN, Payne F, Perry JR, Pettersen E, Platou C, Prokopenko I, Qi L, Qin L, Rayner NW, Rees M, Roix JJ, Sandbaek A, Shields B, Sjogren M, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Swift AJ, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Timpson NJ, Tuomi T, Tuomilehto J, Walker M, Watanabe RM, Weedon MN, Willer CJ, Illig T, Hveem K, Hu FB, Laakso M, Stefansson K, Pedersen O, Wareham NJ, Barroso I, Hattersley AT, Collins FS, Groop L, McCarthy MI, Boehnke M, Altshuler D: Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet* 40:638-645, 2008
- Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS, McCarthy MI, Hattersley AT: Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316:1336-1341, 2007
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432, 1994
- Zündorf I: Vom Rinder-, Schweine-, Pferde-, Insulin zum Humaninsulin: Die biotechnische und gentechnische Insulin-Herstellung. *Pharmazie in unserer Zeit* 1:27-32, 2001

Publikationen

Originalarbeiten

Dreja T., Jovanovic Z., Rasche A., Kluge R., Herwig R., Joost H.G., Yeo G., Al-Hasani H.
Diet-induced gene expression of isolated pancreatic islets from a polygenic mouse model for the metabolic syndrome (submitted)

Chadt A., Leicht K., Deshmukh A., Jiang LQ., Scherneck S., Bernhardt U., Dreja T., Vogel H., Schmolz K., Kluge R., Zierath J.R., Hultschig C., Hoeben R.C., Schürmann A., Joost H.G., Al-Hasani H. (2008) *Tbc1d1 mutation in lean mouse strain confers leanness and protects from diet-induced obesity*. Nat Genet. 11, 1354-9

Als Abstract publizierte Kongressvorträge

Dreja T., Joost H.G., Al-Hasani H.: *Investigation of diet-induced obesity and diabetes using a mouse model for the metabolic syndrome*. Proc. Germ. Nutr. Soc. Vol. 10 (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. 2007, Halle)

Dreja T., Jovanovic Z., Rasche A., Kluge R., Herwig R., Joost H.G., Yeo G., Al-Hasani H.: *Diet-induced gene expression of isolated pancreatic islets from a polygenic mouse model for the metabolic syndrome*. Proc. Germ. Nutr. Soc. Vol. 12 (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. 2008, Bonn)

Dreja T., Jovanovic Z., Rasche A., Kluge R., Herwig R., Joost H.G., Yeo G., Al-Hasani H.: *Diet-induced gene expression of isolated pancreatic islets from a polygenic mouse model for the metabolic syndrome*. Diabetologie und Stoffwechsel 2008; 3: S1-S126 (Deutsche Diabetes-Gesellschaft 2008, München)

Als Abstract publizierte Postervorträge

T. Dreja, R. Kluge, F. Kleinjung, H.-G. Joost, H. Al-Hasani: Expressionsuntersuchungen zur diätinduzierten Adipositas im weißen Fettgewebe der NZO-Maus, einem Modell für das humane Metabolische Syndrom. AdipositasSpektrum Kongressausgabe 2008 4. Jahrgang (Deutsche Adipositas-Gesellschaft 2008, Freiburg)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke in der Abteilung Pharmakologie angefertigt.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Allen bedanken, die mich in dieser Zeit am Institut unterstützt haben.

Ich danke Prof. Dr. Dr. H.G. Joost für die Bereitstellung des vielseitigen und interessanten Themas sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen im Labor.

Mein Dank geht an PD Dr. H. Al-Hasani der mir mit seinem Vertrauen viel Freiheit in der Planung und Durchführung meines Projektes entgegenbrachte.

Ich möchte mich beim ganzen MRL-Team, besonders aber bei Dr. R. Kluge für die Hilfestellung bei den tierexperimentellen Arbeiten bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei unseren Kooperationspartnern:

Besonders bei Z. Jovanovic für die mir entgegengebrachte Hilfe in Cambridge bei der dort durchgeführten LCM-Arbeit.

Bei Dr. F. Kleinjung für die Vorverarbeitung der Microarray-Daten

sowie bei A. Rasche für die Vorverarbeitung und die Hilfe bei der Auswertung der LCM-Array-Daten.

Weiterhin danke ich allen Kollegen der Pharmakologie für die fachliche Unterstützung und die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Für die wertvollen Anregungen möchte ich mich bei F. Mirhashemi, D. Kaiser, H. Vogel und S. Scherneck bedanken sowie bei C. Schmidt, M. Jaehnert und M. Block von der TFH Wildau, die mich in ihren am DIfE durchgeführten Praktika bei der Auswertung der Microarrays vielfältig unterstützt haben.

Ebenso möchte ich mich bei K. Leicht, U. Bernhardt, D. Hesse, N. Schulz sowie V. Gawlik für all die aufbauenden Worte und „Kleinigkeiten“ bedanken; mein besonderer Dank geht hier an A. Chadt.

Bei G. Hauter sowie B. Ratter möchte ich mich für alle die aufbauenden und ehrlichen Worte zur rechten Zeit bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihre fortwährende Unterstützung ohne die all dies nicht möglich gewesen wäre sowie M. Stöckl, der mir immer tatkräftig zur Seite stand. Ohne Eure Unterstützung wäre diese Arbeit so nie entstanden.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.
Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht

Tanja Dreja

Potsdam-Rehbrücke