

Positionelle Klonierung von *Tbc1d1* als Kandidatengen für Adipositas

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

vorgelegt von

Katja Leicht

aus Potsdam

Potsdam-Rehbrücke, Dezember 2008

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2009/3461/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-34610](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-34610)
[<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-34610>]

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 Adipositas - Definition und Epidemiologie 1

1.2 Ursachen und Folgen der Adipositas 2

1.2.1 Exogene und genetische Faktoren für die Ausprägung der Adipositas 4

1.2.1.1 Monogene Adipositas bei Mausmodellen 5

1.2.1.2 Monogene Adipositas bei Menschen 6

1.2.1.3 Genomweite Analysen 6

1.2.2 Tiermodelle zur Untersuchung der Adipositas 7

1.2.2.1 Die Maus als Modellsystem 7

1.2.2.2 Polygene Mausmodelle 8

1.2.3 Identifizierung von Suszeptibilitätsloci für komplexe Merkmale 8

1.2.3.1 Kopplungsanalysen zur Identifikation von Adipositas-QTL 8

1.2.3.2 Möglichkeiten zur Eingrenzung von QTL 9

1.3 Der Adipositas-QTL *Nob1* 11

1.3.1 Die Mausstämme NZO und SJL 11

1.3.2 Identifizierung des Adipositas-QTL *Nob1* 12

1.3.3 Genomische Lokalisation und stammspezifische Herkunft des *Nob1* 14

1.4 Zielsetzung der Arbeit 15

2 MATERIAL UND METHODEN 16

2.1 Material 16

2.1.1 Versuchstiere 16

2.1.2 Bakterienstämme 16

2.1.3 Plasmid- und Expressionsvektoren 17

2.1.4 Enzyme, Standards und Reaktionskits 17

2.1.5 Nährmedien, Puffer, Lösungen 18

2.1.5.1 Bakterienkulturmedien 18

2.1.5.2 Puffer, Lösungen 18

2.1.6	Sonstige Materialien.....	18
2.1.7	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	18
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Tierexperimentelle Methoden.....	21
2.2.1.1	Haltungsbedingungen	21
2.2.1.2	Phänotypische Charakterisierung	21
2.2.1.3	Tötung der Tiere und Gewebepräparation	22
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.2.1	Isolation von genomischer DNA aus Mausschwänzen	23
2.2.2.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Bakterien.....	23
2.2.2.3	Isolation von Gesamt-RNA aus Mausgeweben	23
2.2.2.4	Herstellung einer Erststrang-cDNA aus Gesamt-RNA.....	24
2.2.2.5	Primerdesign	24
2.2.2.6	Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.2.2.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	27
2.2.2.7.1	Agarosegel	27
2.2.2.7.2	Denaturierendes Agarosegel.....	27
2.2.2.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	28
2.2.2.9	Sequenzierung von DNA.....	28
2.2.2.9.1	Sequenzierungs-PCR.....	29
2.2.2.9.2	DNA-Fällung nach der S-PCR.....	29
2.2.2.9.3	Auswertung der Sequenzierung	30
2.2.2.10	Klonierung von DNA-Fragmenten	30
2.2.2.10.1	Herstellung eines Plasmid-T-Vektors	30
2.2.2.10.2	Ligation von DNA-Fragmenten in einen Plasmid-T-Vektor.....	30
2.2.2.10.3	Ligation mit dem TOPO TA Cloning Kit.....	30
2.2.2.11	Kultivierung von <i>E.coli</i> -Zellen (DH5 α).....	31
2.2.2.11.1	Herstellung chemisch kompetenter DH5 α -Zellen.....	31
2.2.2.12	Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente DH5 α -Zellen.....	31
2.2.2.13	<i>Blue-White</i> -Selektion.....	32
2.2.2.14	Macroarray-Methode.....	33

2.2.2.14.1	Gene auf dem Array	33
2.2.2.14.2	Aufbringen der DNA auf eine Nylonmembran (<i>Spotting</i>).....	34
2.2.2.14.3	Prozessieren der Membranen	35
2.2.2.14.4	Herstellung einer radioaktiv markierten cDNA aus Gesamt-RNA	35
2.2.2.14.5	Radioaktive Markierung des PCR-Produktes Ara179 (<i>Guide dot</i>) mit α [³³ P]-dCTP	38
2.2.2.14.6	Hybridisierung der Macroarrays	39
2.2.2.15	Microarray-Methode	40
2.2.2.16	Analyse der Genexpression mittels quantitativer Real Time-PCR (qRT-PCR)	41
3	ERGEBNISSE	43
3.1	Zucht und phänotypische Charakterisierung der Versuchstiere.....	43
3.2	Auswahl der Transkripte des <i>Nob1</i> für die Herstellung des Macroarray	44
3.2.1	Auswahl von weiteren Kandidatengenen außerhalb des QTL <i>Nob1</i>	45
3.2.2	Auswahl von Kontrollsonden.....	47
3.3	Expressionsanalysen	47
3.3.1	Design und Herstellung der Sonden.....	48
3.3.2	Präparative PCR	48
3.3.3	Herstellung der Filter	51
3.3.4	cDNA-Synthese und Hybridisierung der Macroarrays	51
3.3.5	Auswertung der Macroarrays.....	54
3.3.6	Hybridisierung der Microarrays	54
3.3.7	Ergebnisse der Array-Analysen	57
3.4	Sequenzierung der Kandidatengene.....	58
3.4.1	Deletion in Exon 18 des Gens <i>Tbc1d1</i> bei SJL-Mäusen ist stammspezifisch.....	60
3.4.2	Sequenzierung weiterer Kandidatengene im <i>Peak</i>-Bereich des <i>Nob1</i>	62
3.5	mRNA-Expressionsanalysen des Gens <i>Tbc1d1</i>.....	65
3.5.1	Untersuchung auf differentielle Expression zwischen SJL- und NZO-Mäusen.....	65

3.5.2	Isoformen von <i>Tbc1d1</i>	66
3.5.3	mRNA-Expression von <i>Tbc1d4</i>	68
3.5.4	Verteilung von <i>Tbc1d1</i> in verschiedenen Muskelfasern im Skelettmuskel des Mausstamms C57BL/6J	68
3.5.5	Untersuchung auf differentielle Expression im Skelettmuskel der Mausstämmen NZO, C57BL/6J und C57BL/6J ^{ob/ob}	69
3.6	Untersuchung weiterer Kandidatengene	71
4	DISKUSSION	73
4.1	Auswahl des Mausmodells für die Expressionsanalysen	73
4.2	Expressionsanalysen mit Hilfe von Macroarrays und Microarrays	74
4.2.1	Differentiell exprimierte Gene	74
4.3	Sequenzierung der Kandidatengene	75
4.3.1	Deletion im <i>Tbc1d1</i> -Gen ist SJL-spezifisch	76
4.4	<i>Tbc1d1</i> ^{SJL} – kausale Genvariante für QTL <i>Nob1</i>	77
4.4.1	Haplotypenanalyse	77
4.4.2	Sequenzierung von anderen Genen in der <i>Peak</i> -Region des <i>Nob1</i>	79
4.4.3	Verringerte Expression von <i>Tbc1d1</i> bei SJL-Mäusen	81
4.4.4	<i>Tbc1d1</i> -Expressionsprofil und –Isoformen bei NZO-Mäusen ...	81
4.4.5	<i>Tbc1d1</i> -Expression ist nicht gewichtsabhängig	82
4.4.6	Mögliche Funktion von <i>Tbc1d1</i>	83
4.5	Weitere Kandidatengene	85
4.5.1	<i>Abhydrolase domain containing 1 (Abhd1)</i>	86
4.5.2	<i>Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein (Alox5ap)</i>	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	88
6	LITERATURVERZEICHNIS	89
7	ANHANG	107

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1.1: Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms.
- Abb. 1.2: Phänotypischer Vergleich der Inzucht-Mausstämme *Swiss Jim Lambert* (SJL) und *New Zealand obese* (NZO).
- Abb. 1.3: Darstellung der LOD-score-Kurven für den Adipositas-QTL *Nob1*.
- Abb. 1.4: Interaktion des Adipositas-QTL *Nob1* mit dem Diabetes-QTL *Nidd/SJL* und Einfluss der Diät auf die Diabetesprävalenz.
- Abb. 2.1: Zeitlicher Versuchsablauf des Tierexperiments.
- Abb. 2.2: Schematischer Aufbau einer Blot-Apparatur zum Transfer einer gelelektrophoretisch aufgetrennten cDNA auf eine Nylonmembran.
- Abb. 3.1: Darstellung der *evidence viewer* von zwei ausgewählten Transkriptionsmodellen innerhalb des *Nob1*.
- Abb. 3.2: Flussschema des Designs genspezifischer *Primer* für PCR-Produkte am Beispiel des Gens *Ttbk1*.
- Abb. 3.3: Strategie zur Amplifikation von DNA-Sonden für die Herstellung von Macroarrays.
- Abb. 3.4: Denaturierendes Agarosegel zur Bestimmung der Länge von revers transkribierten cDNAs.
- Abb. 3.5: Exemplarische Darstellung gescannter Macroarrays.
- Abb. 3.6: Ausgewählte *Scatter-Plots* der exprimierten *Nob1*-Gene bei weiblichen NZO- und SJL-Mäusen.
- Abb. 3.7: Validierung der differentiell exprimierten Gene auf Chromosom 5 von SJL- und NZO-Mäusen.
- Abb. 3.8: Sequenzausschnitt des Gens *Tbc1d1* mit Hilfe der *Software SeqScape*.
- Abb. 3.9: Charakterisierung der Deletion von sieben Basenpaaren im Gen *Tbc1d1* bei SJL-Mäusen.
- Abb. 3.10: Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen von Maus-Inzuchtstämmen.
- Abb. 3.11: *Nob1.24*-Fragment und *Peak-Region* des *Nob1*.
- Abb. 3.12: Darstellung der relativen Expression des Gens *Tbc1d1* in verschiedenen Geweben von NZO- und SJL-Mäusen.
- Abb. 3.13: Darstellung der *Tbc1d1*-Isoformverteilung in verschiedenen Geweben von NZO-Mäusen.
- Abb. 3.14: Expression von *Tbc1d4* in unterschiedlichen Geweben von NZO- und SJL-Mäusen.

Abb. 3.15: Darstellung der *Tbc1d1*-Expression in zwei unterschiedlichen Muskelfasertypen des Skelettmuskels bei C57BL/6J-Mäusen.

Abb. 3.16: Vergleich der *Tbc1d1*-mRNA-Expression im *M. gastrocnemius* zwischen verschiedenen Mausstämmen.

Abb. 3.17: Korrelation der Körpergewichte mit der *Tbc1d1*-Expression im Skelettmuskel von NZO-Mäusen.

Abb. 3.18: Plot der Expression von *Tbc1d1* im Skelettmuskel von C57BL/6J-Tieren im Zeitverlauf.

Abb. 3.19: Expressionsunterschiede des Gens *Abhd1* in verschiedenen Geweben von SJL- und NZO-Mäusen.

Abb. 3.20: Expressionsunterschiede des Gens *Alox5ap* in verschiedenen Geweben von SJL- und NZO-Mäusen.

Abb. 4.1: Positionelle Klonierung von *Tbc1d1* im Adipositas-QTL *Nob1*.

TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1.1: WHO–Schema zur Klassifikation von Übergewicht und Adipositas.
- Tab. 1.2: Einige monogene Adipositasformen in Mausmodellen.
- Tab. 3.1: Phänotypische Charakterisierung der Versuchstiere für die Arrayexperimente.
- Tab. 3.2: Kandidatengene aus einem genomweiten RNAi-*Screening* nach Genen, die den Fettgehalt beim Fadenwurm *C. elegans* beeinflussen.
- Tab. 3.3: Ausgewählte Kontrollsonden für die Macroarrays.
- Tab. 3.4: Nutzung unterschiedlicher *Templates* zur Herstellung der DNA-Sonden für die Macroarrays.
- Tab. 3.5: Überblick über die hybridisierten Macroarrays.
- Tab. 3.6: Vergleich der nicht betrachteten *Nob1*-Transkripte mit den durchgeführten Macro- bzw. Microarrays.
- Tab. 3.7: Differentiell exprimierte Gene zwischen NZO- und SJL-Mäusen auf Chromosom 5.
- Tab. 3.8: Sequenzanalyse der codierenden Bereiche der Gene im *Peak*-Bereich des *Nob1* bei den Mausstämmen SJL und NZB.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AICAR	<i>aminoimidazole carboxamide ribonucleotide</i>
Amp	Ampicillin
AMPK	Adenosin Monophosphat aktivierte Proteinkinase
B6	<i>C57 Black, C57BL/6</i>
BAT	<i>Brown Adipose Tissue</i> , braunes Fettgewebe
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BW	<i>Body Weight</i> , Körpergewicht
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Chr.	Chromosom
cM	centiMorgan
<i>cpm</i>	<i>counts per minute</i>
<i>db</i>	<i>diabetic</i>
ddH ₂ O	<i>aqua purificata</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
F1	erste Filialgeneration
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
CTP	Cytosintriphosphat
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
HFD	Hochfett-Diät
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LOD	<i>Logarithm of the Odds</i>
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl

NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NON	<i>Non-obese Non-Diabetic</i>
NZB	<i>New Zealand black</i>
NZO	<i>New Zealand obese</i>
<i>ob</i>	<i>obese</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
qRT-PCR	quantitative <i>RealTime</i> -PCR
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SD	Standard Diät
SDS	Natriumdodecylsulfat
SJL	<i>Swiss Jim Lambert</i>
SM	<i>Small Mouse</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
S-PCR	Sequenzierungs-PCR
T2DM	<i>Typ-2-Diabetes mellitus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
WAT	<i>White Adipose Tissue</i> , weißes Fettgewebe
WHO	<i>World Health Organisation</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
α	<i>alpha</i>
β	<i>beta</i>
Δ	<i>delta</i>
®	eingetragenes Warenzeichen
♀	weiblich
♂	männlich

Purin- und Pyrimidinbasen

A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin

Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure	D
Cystein	C
Glutaminsäure	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

1 EINLEITUNG

1.1 Adipositas - Definition und Epidemiologie

Adipositas stellt weltweit ein immer größer werdendes Gesundheitsproblem dar. Unter Adipositas versteht man die Vermehrung des Körpergewichtes mit überproportionaler Zunahme des Körperfettanteils. Dabei ist das Fettverteilungsmuster für das Gesundheitsrisiko von besonderer Bedeutung. Untersuchungen an adipösen Patienten haben ergeben, dass insbesondere eine viszerale Fettakkumulation zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko für das Metabolische Syndrom führt (Cheung *et al.*, 2007; Fox *et al.*, 2007).

Zur Klassifikation der Adipositas gibt es zwei wichtige Modelle. Die *World Health Organisation* (WHO) definiert Adipositas über den sogenannten *Body Mass Index* (BMI), der sich aus dem Verhältnis von Körpergewicht (kg) und der Körperlänge zum Quadrat (m²) errechnet (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: WHO–Schema zur Klassifikation von Übergewicht und Adipositas.

<u>BMI</u>	<u>WHO Klassifikation</u>
< 18,5	Untergewicht
18,5 – 24,9	Normalgewicht
25,0 – 29,9	Übergewicht
30,0 – 34,9	Adipositas Grad 1
35,0 – 39,9	Adipositas Grad 2
> 40	extreme Adipositas

Die Beurteilung des Adipositasgrades aufgrund des BMI geht jedoch nicht auf geschlechts- und altersspezifische Unterschiede ein. Bei der Betrachtung des BMI sollte beachtet werden, dass Frauen einen höheren Körperfettanteil aufweisen als Männer und dass bei Menschen, die älter als 60-65 Jahre sind, der Körperfettanteil zunimmt (Syme *et al.*, 2008; Garaulet *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 1994). Auch wird für Südasiaten, Chinesen und Aborigines eine andere Adipositas-Klassifikation gefordert, da der BMI bei diesen Menschen generell geringer als bei Menschen in Industrieländern ist (Mascie-Taylor *et al.*, 2007; Razak *et al.*, 2007). Ein weiterer Nachteil des BMI ist, dass die Verteilung des Körperfettes nicht betrachtet wird.

Die Körperfettverteilung wird durch den Taillen-Hüft-Quotient (*waist hip ratio*, WHR) berücksichtigt (Garnett *et al.*, 2008). Dieses anthropometrische Maß wird bei Frauen ab einem Wert von $\geq 0,85$ und bei Männern von $\geq 1,0$ mit einem erhöhten Risiko für das Metabolische Syndrom assoziiert (WHO, 2003). Zudem gilt ein Taillenumfang von ≥ 88 cm (Frauen) bzw. von ≥ 102 cm (Männer) ebenfalls als ein mit Adipositas assoziiertes Krankheitsrisiko (Han *et al.*, 1997).

Die Prävalenz der Adipositas nimmt stetig zu und betrifft weltweit ungefähr eine halbe Milliarde Menschen (Rössner, 2002). In den USA stieg die Prävalenz in den letzten 25 Jahren um 40 %, so dass ungefähr zwei Drittel der amerikanischen Bevölkerung als übergewichtig betrachtet werden (Ogden *et al.*, 2006; Bonow und Eckel, 2003). Bedenklich ist, dass schon bei Kindern und Jugendlichen knapp 14 % der 2 bis 5-jährigen und etwa 18 % der 6 bis 19-jährigen als adipös einzustufen sind (Ogden *et al.*, 2006). Auch in Deutschland steigt die Zahl der an Adipositas erkrankten Menschen rapide an. So stieg die Prävalenz der moderaten Adipositas von 1985 bis 2002 bei Männern von 16,2 % auf 22,5 % und bei Frauen von 16,2 % auf 23,5 % (Helmert und Strube, 2004). Als übergewichtig gelten sogar etwa 50 % der deutschen Männer und 70 % der deutschen Frauen (Bergmann und Mensink, 2005). Auch unter Kindern (5 bis 6-jährige) und Jugendlichen (13 bis 15-jährige) beträgt die Adipositasprävalenz bereits 7 % bzw. 8 % (Wabitsch *et al.*, 2002).

1.2 Ursachen und Folgen der Adipositas

Die wichtigsten Ursachen der Adipositas sind vermehrte Nahrungsaufnahme und erhöhte Nahrungsfettanteile bei gleichzeitigem Bewegungsmangel. Die nicht durch Bewegung verbrauchte Nahrungsenergie wird in Form von Fetteinlagerungen vor allem im Fettgewebe gespeichert.

Fettgewebe ist nicht nur ein Speichergewebe für den Körper, sondern auch ein endokrines Organ, das sogenannte Adipokine sezerniert – Hormone, die für die Energiehomöostase eine wichtige Rolle spielen (Kershaw und Flier, 2004; Klaus, 2004). Dazu zählen u.a. Leptin und Adiponectin. Leptin nimmt in der hypothalamischen Regulation von Hunger und Sättigung eine zentrale Rolle ein, indem es zum einen die Bildung der appetitanregenden Neuropeptide *Agouti-related protein* (ARP) und *Neuropeptide Y* (NPY) unterdrückt und zum anderen die Bildung der appetitzügelnden Neuropeptide Proopiomelanocortin (POMC) und *Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript* (CART) fördert (Ahima *et al.*, 1996). Adiponectin, das u.a. eine verstärkte β -Oxidation von Fettsäuren in Muskelgewebe bewirkt, wird bei adipösem Phänotyp vermindert sezerniert (Hu *et al.*, 1996). Ein weiteres, allerdings kontrovers diskutiertes Adipokin ist Resistin. Es wird mit der Entstehung von Insulinresistenz bei Mäusen in Verbindung gebracht, jedoch ist seine Funktion beim Menschen unklar (Rajala *et al.*, 2004; Silha *et al.*, 2003, Heilbronn *et al.*, 2004).

Eine Folge von Adipositas ist Insulinresistenz, die ihrerseits einen Risikofaktor für Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM) darstellt. Als Insulinresistenz wird die verringerte Reaktion von insulinresponsiven Zellen auf endogenes oder exogen zugeführtes Insulin bezeichnet. Daraus resultiert u.a. eine gehemmte Glucoseaufnahme in die Zelle. Die molekularen Ursachen für Insulinresistenz sind bisher ungeklärt. Mögliche Mechanismen sind z.B. eine gesteigerte Immunantwort und die lipid-induzierte Insulinresistenz (Lipotoxizität). Vermehrte Fetteinlagerung führt auch zu einer größeren Anzahl von Makrophagen im Fettgewebe. Diese Phagozyten, die Bestandteil des Immunsystems sind, sezernieren inflammatorische Marker wie IL-6 oder TNF- α , die sich negativ auf die Insulinresistenz in peripheren Geweben auswirken (Hotamisligil, 2003; Weisberg *et al.*, 2003; Marette *et al.*, 2002). Eine lipid-induzierte Insulinresistenz ist bei Menschen und Tieren gut etabliert (Boden, 2001). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind nicht ganz klar, es wird z.B. eine Aktivierung des zentralen inflammatorischen NF κ B-Weges diskutiert (Itani *et al.*, 2002). Vermehrte intramyozelluläre Fettakkumulation gilt ebenfalls als eine Ursache für die Insulinresistenz bei Tieren (Russel *et al.*, 1998; Kraegen *et al.*, 1991) und Menschen (Pan *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 1996). Die verstärkte Fetteinlagerung im Skelettmuskel ebenso wie erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren (*free fatty acids*, FFA) im Plasma führen zu einer gesteigerten β -Oxidation. Erhöhte Plasmaspiegel an FFA werden mit einer Entkopplung der Atmungskette, somit verringerter ATP-Synthese und einer daraus folgenden mitochondrialen Dysfunktion in Verbindung gebracht (Brehm *et al.*, 2006). Diese Dysfunktion in Muskelzellen bewirkt eine Störung des PI3-Kinase-Signalweges von Insulin, die eine Insulinresistenz nach sich zieht (Befroy *et al.*, 2007; Mogensen *et al.*, 2007; Dresner *et al.*, 1999). Insulinresistenz führt zu einer endokrinen Pankreasinsuffizienz bis zu einem manifesten Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM) (Kahn, 1998), zu erhöhtem kardiovaskulärem Risiko (Christoffersen *et al.*, 2003) und letztendlich zum Krankheitsbild des Metabolischen Syndroms.

Für das Metabolische Syndrom, auch *Syndrom X* (Reaven, 1988) oder *tödliches Quartett* (Kaplan, 1989) genannt, gibt es keine einheitliche Definition. Es fasst die Stoffwechselkrankheiten Adipositas, T2DM, Bluthochdruck sowie Fettstoffwechselstörungen zusammen (Kesaniemi *et al.*, 1992) und gilt heute als der entscheidende Risikofaktor für koronare Herzkrankheiten. Insulinresistenz wird von der WHO als pathogenetischer Faktor in der Definition des Metabolischen Syndroms betont (WHO, 2000). Die am häufigsten verwendete Definition des Metabolischen Syndroms ist die des *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III). Danach spricht man vom Metabolischen Syndrom, wenn folgende Parameter vorhanden sind (NCEP ATP III, 2001):

- Abdominale Adipositas (Taillenumfang bei Männern > 102 cm, bei Frauen > 88 cm)
- Bluthochdruck (> 130/ 85 mmHg)
- Erhöhter Nüchtern-Blutglucosespiegel (> 110 mg/dL)
- Erhöhte Triglycerid-Werte (> 150 mg/dL)
- Erniedrigtes HDL-Cholesterin (Männer < 40 mg/dL, Frauen < 50 mg/dL)

Eine weitere anerkannte Definition stammt von der *International Diabetes Federation* (IDF). Sie definiert das Übergewicht als entscheidenden Risikofaktor (IDF, 2005). Dabei wird besonderes Augenmerk auf das abdominale Fett gelegt, welches eng mit der Ausbildung des Syndroms korreliert (Bergman *et al.*, 2006).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind die pathologischen und pathobiochemischen Beziehungen zwischen Adipositas, Insulinresistenz und den anderen Teilsymptomen des Metabolischen Syndroms (Hypertonie, Dyslipoproteinämie) nicht vollständig geklärt. Durch epidemiologische Studien und andere Untersuchungen konnten jedoch Beziehungen zwischen einzelnen Teilsymptomen nachgewiesen werden (Joost *et al.*, 2000).

Die Prävalenz des Metabolischen Syndroms beträgt in Deutschland 19,8 % (Männer 22,7 %, Frauen 18,0 %; Kriterien des NECP ATP III; Moebus *et al.*, 2007).

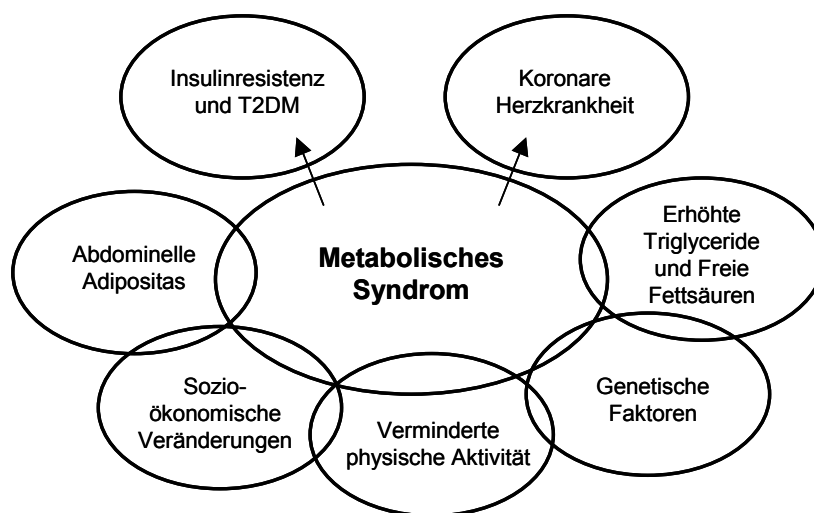


Abb. 1.1: Pathophysiologie des Metabolischen Syndroms. Modifiziert nach Muddajah und Solanki, 2006

1.2.1 Exogene und genetische Faktoren für die Ausprägung der Adipositas

Das Körpergewicht wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Bei adipösen Menschen werden vielfach veränderte Ernährungsgewohnheiten wie z.B. größere Portionen und ein hoher Energiegehalt von Mahlzeiten, unregelmäßiges Essverhalten und ein häufiger Verzehr von *Fast Food* bzw. *Soft Drinks* festgestellt (Stein und Colditz, 2004; Ma *et al.*, 2003). Hinzu kommt oftmals eine verminderte körperliche Aktivität, so dass die aufgenommene Energie nicht verwertet, sondern in Form von Fetteinlagerungen gespeichert wird (Nielsen, 2003; Kopelman, 2000).

Neben den exogenen Faktoren wird eine genetische Prädisposition der Adipositas angenommen (Bouchard, 1995) und in Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien bestätigt.

So besteht bei eineiigen Zwillingen eine positive Korrelation des BMI, unabhängig davon, ob sie gemeinsam oder getrennt aufwachsen. Auch bei Adoptivkindern zeigt sich eine Abhängigkeit des BMI von dem der leiblichen Eltern – trotz des anderen Umfeldes, in dem sie aufgewachsen sind (WHO, 2000; Comuzzie und Allison, 1998; Allison *et al.*, 1996; Stunkard *et al.*, 1990; Stunkard *et al.*, 1986). Der genetische Einfluss auf den BMI wird auf 50-90 % geschätzt (Maes *et al.*, 1997). Zurzeit werden mehr als 100 Kandidatengene diskutiert, deren Einfluss aber wahrscheinlich erst in Kombination mit den genannten exogenen Faktoren zum Tragen kommt (Hamann, 2002).

1.2.1.1 Monogene Adipositas bei Mausmodellen

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der komplexen Regulation des Körpergewichtes stellen Mausmodelle mit Einzelgenmutationen dar.

Die wahrscheinlich am besten untersuchten Mutationen im Zusammenhang mit Adipositas sind die Mutationen im Gen für das Hormon Leptin (*Lep*) und in dessen Rezeptor (*Lepr*). Diese Mutationen bedingen bei Mäusen (B6.V-*Lep*^{ob/ob} bzw. B6.Cg-*m Lepr*^{db/db}) eine frühe und in ihrem Verlauf extreme Adipositas, Hyperphagie sowie Insulinresistenz (Halaas *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994). Die Mutation im Leptinrezeptorgen führt auf einem C57BLKS/J-Hintergrund zu einem manifesten T2DM, zum Verlust der Inselzellen und einem frühzeitigen Tod der Mäuse (Chen *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Tartaglia *et al.*, 1995). Die sogenannte *fat*-Mutation, eine Punktmutation im *Cpe*-Gen (CPE = Carboxypeptidase E) resultiert in einer spät einsetzenden Adipositas und Hyperproinsulinämie. CPE wird u.a. in Pankreas und Gehirn exprimiert und beeinflusst die posttranslationale Kontrolle vieler Prohormone und Neuropeptide wie Proinsulin und POMC (Cool und Loh, 1998; Cool *et al.*, 1997; Naggert *et al.*, 1995; Coleman und Eicher, 1990). Die bei Mäusen bisher einzige bekannte dominante Mutation, die zur Adipositas führt, ist die yellow-Mutation im Agouti-Gen (*A^y*). Das resultierende Agouti-Protein ist für die Wildtyp-Fellfarbe bei Mäusen verantwortlich. Es agiert als Antagonist zu α -MSH an Melanocortin-Rezeptoren. Durch die Mutation wird das Agouti-Protein ektopisch u.a. im Hypothalamus exprimiert. Die betroffenen Mäuse weisen Adipositas, Hyperphagie und Hyperinsulinämie auf (Ollmann *et al.*, 1998; Klebig *et al.*, 1995; Yen *et al.*, 1994). Eine Übersicht einiger monogener Adipositasformen bei Mäusen ist in Tab. 1.2 zu sehen.

Neben Mausmodellen mit Mutationen stellen genetisch veränderte Mäuse einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung der genetischen Ursachen der Adipositas dar. Beispiele sind die *knockout*-Mausmodelle für den *Melanin concentrating hormone receptor* (MCHR1) und den *Melanocortin 4 receptor* (MC4R), die beide einen adipösen Phänotyp aufweisen (Chen *et al.*, 2002; Huzar *et al.*, 1997). Jana Buchmann *et al.* zeigten, dass das Ausschalten des Cholesterin-Transporters *ATP-binding cassette, subfamily G, member 1* (*Abcg1*) zu verringertem Körpergewicht sowie Körperfettanteil führte und dass bei den *knockout*-Tieren

keine Hochfettdiät-induzierte verminderte Glucose-Toleranz und Fettleber auftrat (Buchmann *et al.*, 2007).

Tab. 1.2: Einige monogene Adipositasformen in Mausmodellen.

Mutation	Chr.	Symbol	Erbgang	Referenz
<i>Agouti yellow (A^y)</i>	2	<i>A^y</i>	dominant	Yen <i>et al.</i> , 1994
<i>Diabetes (db)</i>	4	<i>Lepr</i>	rezessiv	Chen <i>et al.</i> , 1996
<i>Obese (ob)</i>	6	<i>Lep</i>	rezessiv	Zhang <i>et al.</i> , 1994
<i>Tubby (tub)</i>	7	<i>Tub</i>	rezessiv	Coleman & Eicher, 1990
<i>Fat (fat)</i>	8	<i>Cpe</i>	rezessiv	Coleman & Eicher, 1990
<i>Fatty liver dystrophy (fld)</i>	12	<i>Lpin</i>	rezessiv	Verheijen <i>et al.</i> , 2003

1.2.1.2 Monogene Adipositas bei Menschen

Beim Menschen treten ebenfalls autosomal rezessive Formen der Adipositas auf. Beispiele dafür sind Mutationen in den Genen für Leptin (LEP; Strobel *et al.*, 1998; Montague *et al.*, 1997), Leptinrezeptor (LEPR; Clement *et al.*, 1998), POMC (Krude *et al.*, 1998), Prohormon-Convertase 1 (PCSK1; Jackson *et al.*, 1997) und MC4R (Farooqi *et al.*, 2003). Diese Mutationen treten sehr selten auf, so dass durch sie nur ein geringer Anteil der humanen Adipositas erklärt werden kann. Unter den genannten Fällen zeigt die MC4R-Mutation die höchste Prävalenz. So wird diese Mutation bei 1,7 % der adipösen Europäer gefunden (Stutzmann *et al.*, 2008). Trotz ihrer Seltenheit weisen diese Mutationen auf die zentrale Rolle dieser Proteine für die Energiehomöostase des Menschen hin (Tsigos *et al.*, 2002).

1.2.1.3 Genomweite Analysen

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung von Kandidatengenen für Adipositas sind genomweite Analysen (*genome wide analysis*, GWA). Hierfür werden genetische Marker verwendet, die über das gesamte Genom verteilt sind. Solche Marker können Mikrosatellitenmarker oder *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) sein. Deren Allelhäufigkeit wird mit dem untersuchten Merkmal assoziiert. Genomweite Analysen werden vorrangig bei der Suche nach Kandidatengenen für polygene Krankheiten wie z.B. Adipositas und T2DM angewandt. In letzter Zeit wurden mit Hilfe dieser Methode mehrere Kandidatengene identifiziert: *Fat mass and obesity associated* (FTO; Dina *et al.*, 2007); Frayling *et al.*, 2007), *Glucose-6-phosphatase catalytic subunit 2* (G6PC2; Chen *et al.*, 2008)

und *ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP member 11)* (ABCB11; Chen *et al.*, 2008), sowie *Catenin, beta like 1* (CTNBL1; Liu *et al.*, 2008). Verschiedene SNPs im FTO -Gen werden mit erhöhtem BMI, Insulinsensitivität und gesteigertem Grundumsatz in Verbindung gebracht, allerdings sind die Funktionen der SNPs ungeklärt (Do *et al.*, 2008; Scuteri *et al.*, 2007). Aktuell wird eine Rolle des Gens in der Regulation der Lipolyse und im Verteilungsmuster der Fettdepots diskutiert (Zabena *et al.*, 2008), ebenso wie die Eigenschaft der DNA-Demethylierung (Jia *et al.*, 2008) oder der Einfluss von FTO auf den Appetit (Wardle *et al.*, 2008). Loos *et al.* (2008) fassen in ihrer Metaanalyse mehrere GWA zusammen. Den stärksten Effekt hatte ein Polymorphismus im FTO-Gen, der homozygot einen Gewichtsunterschied von ca. 4 kg bewirkt. Viele andere bekannte SNPs haben eine viel geringere Effektstärke. Die Autoren assoziieren auch einen SNP mit Adipositas, der 188 kbp proximal des MC4R-Gens lokalisiert ist. Eine funktionelle Verbindung ist allerdings aufgrund der relativ großen Entfernung des beschriebenen SNP zum MC4R-Gen fragwürdig.

1.2.2 Tiermodelle zur Untersuchung der Adipositas

Zur Charakterisierung der genetischen Ursachen sowie der molekularen und pathobiochemischen Mechanismen der humanen Adipositas bedient man sich geeigneter Tiermodelle, die vergleichbare Symptome zum menschlichen Krankheitsbild aufweisen (Brockmann und Bevova, 2002). Dazu eignen sich besonders Nager (Gonzalez-Navarro *et al.*, 2007; Oswal und Yeo, 2007), aber auch einige Säugetierspezies wie Hunde (Tsunoda *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2003) und Katzen (Henson und O'Brien, 2006; Hoenig, 2006). Dabei ist es wichtig, dass Adipositas durch verstärkte Aufnahme von Fetten und Kohlenhydraten mit der Nahrung oder durch genetische Faktoren hervorgerufen werden kann. Auch ein erhöhter Blutzuckerspiegel sowie Triglyceridwerte sollten durch eine entsprechende Diät induzierbar sein.

1.2.2.1 Die Maus als Modellsystem

Mäuse sind für die Untersuchung der vielfältigen Ursachen der Adipositas besonders gut geeignet. Die Vorteile liegen in der einfachen Haltung, der raschen Verfügbarkeit hoher Tierzahlen und den konstant gehaltenen exogenen Faktoren in der Versuchstierhaltung. Zudem sind mehrere hundert Inzuchtstämme verfügbar, deren Phänotyp gut definiert ist.

Zur Aufklärung von bestimmten Pathomechanismen gibt es zum einen die Möglichkeit der Generierung von Nullmutanten (=knockout) für definierte Gene, und zum anderen der Erzeugung transgener (=knockin) Mäuse, die die mRNA eines Genes verstärkt exprimieren (Kappel *et al.*, 1994; Iannaccone und Scarpelli, 1993). Eine Validierung der Befunde aus Untersuchungen an Mausmodellen in humanen Studien wird durch die hohe Homologie zwischen den Genomen von Maus und Mensch erleichtert.

1.2.2.2 Polygene Mausmodelle

Geeignete Mausstämme, die Merkmale von Adipositas und T2DM aufweisen, sind z.B. *New Zealand obese*- (NZO-), *Tsumura Suzuki obese diabetic*- (TSOD-) und KK-Mäuse. Sie weisen ein erhöhtes Körpergewicht auf, das durch vermehrte Fetteinlagerungen bedingt ist, haben erhöhte Blutzuckerspiegel sowie Triglyceridwerte im Plasma und zeigen eine Hypertonie (Kim *et al.*, 2001; Hirayama *et al.*, 1999; Veroni *et al.*, 1991; Walkley *et al.*, 1978; Herberg und Coleman, 1977; Bielschowsky und Bielschowsky, 1953;). Weitere Inzuchtstämme, die einen adipösen Phänotyp entwickeln, sind DBA/2J-, AKR/J- und DU6-Mausstämme (Brockmann und Benova, 2002). Auch neue Mauslinien, die aus Züchtungen hervorgehen, tragen Merkmale von komplexen Krankheitsbildern wie z.B. die rekombinant kongene Linie NONcNZO10/LtJ, die aus einer Kreuzung von NZO-Mäusen mit - *Nonobese Nondiabetic* (NON) -Mäusen hervorging und die eine späte Adipositas und Insulinresistenz entwickeln (Cho *et al.*, 2007).

1.2.3 Identifizierung von Suszeptibilitätsloci für komplexe Merkmale

Komplexe Erkrankungen wie Adipositas und T2DM sind gekennzeichnet durch einen polygenen Ursprung und den Einfluss mehrerer Umweltfaktoren (Donaldson, 2004). Die genetischen Ursachen komplexer Merkmale (*Complex Traits*) werden durch die Kartierung von Regionen im Genom, die an der quantitativen Ausprägung eines Merkmals beteiligt sind, identifiziert (*Quantitative Trait Loci*, QTL). Dazu wird das gesamte Genom mit genetischen Markern untersucht und anschließend der jeweilige Markergenotyp mit der Ausprägung eines bestimmten Merkmals in Verbindung gebracht. Diese Korrelation wird durch den *Logarithm of the Odds* (LOD)-Score ausgedrückt. Dabei unterscheiden sich die Signifikanzgrenzen nach dem jeweils verwendeten Kartierungsmodell (Lander und Kruglyak, 1995). Bei Mäusen sind derzeit 279 QTL für Körpergewicht und Körperfett bekannt (Wuschke *et al.*, 2007). Je nach der Dichte der Gene finden sich innerhalb eines solchen detektierten QTL (10-30 cM) zwischen 20 und 200 Gene (Abiola, 2003).

1.2.3.1 Kopplungsanalysen zur Identifikation von Adipositas-QTL

In den letzten Jahren wurden in verschiedenen Arbeitsgruppen durch Kreuzungsmodelle und Kopplungsanalysen verschiedene Suszeptibilitätsloci für Adipositas im Genom der NZO-Maus identifiziert (Taylor *et al.*, 2001; Reifsnnyder *et al.*, 2000). Dafür wurden jeweils zwei Maus-Inzuchtstämme ausgewählt, die sich in dem zu untersuchenden Merkmal (*Trait*) unterscheiden – für die Untersuchung der Adipositas sind geeignete *Traits* Körpergewicht und Fettgewebsanteil. Durch Verpaarung und Weiterzüchtung (F2-Generation oder Rückkreuzungen) wurde eine chromosomale Rekombination erreicht (Brockmann und Benova, 2003). Nach Bestimmung von Körpergewicht und –zusammensetzung sowie der Genotypisierung der Nachkommen mit polymorphen genetischen Markern wurde eine

Kopplungsanalyse durchgeführt. Dazu wurden spezielle Computerprogramme wie Mapmaker/QTL genutzt (Hillebrandt *et al.*, 2001; Lander *et al.*, 1987). Die Validierung einer solchen signifikanten Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp kann z.B. durch einen unabhängigen Kreuzungsansatz erfolgen.

Die große Anzahl bekannter Adipositas-QTL aus verschiedenen Kreuzungsexperimenten kann mit Hilfe einer Metaanalyse zusammengefasst werden. Wuschke *et al.* untersuchten mit dieser Methode alle bisher für Mäuse beschriebenen Adipositas-QTL (Wuschke *et al.*, 2007). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass im gesamten Mausgenom 49 Bereiche mit signifikanter Assoziation zu Körpergewicht und Adipositas vorhanden sind. Dabei gibt es prominentere Regionen auf den 1, 2, 7, 11, 15 und 17, auf denen 58 QTL (von gesamt 279 QTL für Körpergewicht und Körperfett) lokalisiert sind.

1.2.3.2 Möglichkeiten zur Eingrenzung von QTL

Da QTL meist eine große Anzahl von Kandidatengenen beinhalten, kann nicht ohne weiteres auf die für das Merkmal verantwortliche Genvariante geschlossen werden. Zur Eingrenzung von QTL können verschiedene Strategien verfolgt werden.

- Sequenzierung

Durch Sequenzierung von DNA-Abschnitten ist es möglich, Unterschiede in der Basenabfolge zwischen verschiedenen Mausstämmen zu identifizieren. Sequenziert werden können komplette Abschnitte des Chromosoms, gesamte Gene (Exons, Introns, putativer Promotorbereich), gesamte cDNAs (untranslatierte und translatierte exonische Bereiche) und nur codierende Genabschnitte. Zur Identifizierung funktionsverändernder Unterschiede in der Basenfolge in Genen wird die Sequenzierung von codierenden Genabschnitten und putativer Promotorbereiche angewandt. Die Auswahl der Kandidatengene erfolgt aufgrund A) der Annotation in Bezug auf das untersuchte Merkmal oder B) ihrer chromosomalen Lokalisation innerhalb der QTL-Region mit den höchsten LOD-Werten (kritische Region des QTL).

- Analyse der Genexpression

Eine weitere Möglichkeit ist die Untersuchung von Expressionsunterschieden von Genen innerhalb des QTL-Bereichs beider Kreuzungspopulationen. Hierfür eignen sich die Array-Techniken, da sie die Untersuchung vieler Gene gleichzeitig erlauben. Dabei geht man davon aus, dass die Menge an mRNA proportional zum resultierenden Protein ist. So können Gene identifiziert werden, die in bestimmten Geweben oder unter verschiedenen Diätbedingungen stärker bzw. schwächer exprimiert werden (Skena *et al.*, 1995). Array-Experimente können mit Macroarrays oder Microarrays durchgeführt werden, wobei der Unterschied in der Länge der Sonden und in der Anzahl der untersuchten Gene liegt. Für

Macroarrays werden meist PCR-Produkte (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) mit einer Länge von 300-500 bp verwendet; bei Microarrays finden spezifische Oligonukleotide von ca. 50 bp Einsatz. Ihre erste breitere Anwendung fanden Macroarrays in der Arbeit mit Zelllinien und einfachen Modellsystemen (DeRisi *et al.*, 1996; Schena *et al.*, 1995), später unter anderem in der Hirnforschung (Luo *et al.*, 1999). Ein großer Vorteil der Macroarrays gegenüber den Microarrays ist die flexible Zusammensetzung der untersuchten Sonden, während die Zusammensetzung der Gene auf Microarrays nicht variabel ist. So können mit Macroarrays Gene ausgeschlossen werden, die für den Gegenstand der Studie irrelevant sind oder auch neue Genmodelle eingeschlossen werden, die in den bestehenden Microarrays noch nicht enthalten sind. Der Vorteil der Microarrays besteht dagegen in der sehr großen Anzahl der Gene, die gleichzeitig untersucht werden können. Momentan sind mehr als 22 000 proteincodierende Mausgene bekannt (<http://www.ensembl.org>). Der Nachteil der Macroarrays ist der immense Aufwand der Sondenherstellung. Diese müssen genspezifisch sein und in ausreichender Menge per PCR amplifiziert werden. Da kommerziell erhältliche Microarrays in letzter Zeit günstiger in der Anschaffung werden und auch die Qualität der Oligonucleotid-Sonden besser wird, finden Macroarrays kaum noch Verwendung. Gene, die mit Hilfe von Array-Analysen als differentiell exprimiert identifiziert wurden, können anschließend sequenziert werden (Abiola *et al.*, 2003).

- Rekombinant kongene Linien

Eine weitere Strategie zur Eingrenzung von QTL ist die Züchtung rekombinant kongener Mauslinien. Dabei werden durch Rückkreuzung Subfragmente des QTL auf einen anderen Stamm übertragen. Dadurch kann der kritische QTL-Bereich auf eine Größe von wenigen cM reduziert werden (Fehr *et al.*, 2002). Gene innerhalb eines solchen kleineren QTL-Fragments können einzeln auf Expressionsunterschiede oder Unterschiede in der Basenabfolge der Gene untersucht werden (Abiola *et al.*, 2003).

- Haplotypenanalyse

Haplotypenanalysen gehen von einer gemeinsamen Vererbung von genomischen Blöcken aus, ohne dass eine Rekombination innerhalb dieser Blöcke stattfindet. Dabei werden polymorphe Bereiche mit einer länger zurückliegenden Rekombination assoziiert, nicht-polymorphe Abschnitte jedoch mit einer nahen Verwandtschaft (Paigen *et al.*, 2008; Reuveni *et al.*, 2007; Petkov *et al.*, 2004 und 2005). Haplotypen werden mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern und SNPs bestimmt. Durch die Anwendung von so erstellten Haplotypenkarten kann ein QTL auf polymorphe Bereiche zwischen den Kreuzungspopulationen weiter eingegrenzt werden (Moritani *et al.*, 2006). Auch Kandidatengene wurden in aktuellen Studien mit Hilfe einer Haplotypenanalyse identifiziert (Dokmanovic-Chouinard *et al.*, 2008; Pletcher *et al.*, 2004).

1.3 Der Adipositas-QTL *Nob1*

1.3.1 Die Mausstämme NZO und SJL

Der *New Zealand obese*-Mausstamm (NZO) ist für die Untersuchung der genetischen Ursachen des Metabolischen Syndroms sehr gut geeignet (Abb. 1.2). Der Ursprung dieses Inzuchtstammes liegt in einer Kolonie zufallsverpaarter Mäuse, die 1930 von London ins neuseeländische Otago kamen. Dort erfolgte ab 1948 eine Selektion nach der Fellfarbe. Auf den heute manifesten adipösen Phänotyp wurde ab der zehnten Inzuchtgeneration selektiert, der bei einzelnen Tieren auftrat (Bielschowsky und Bielschowsky, 1953). Die Kombination aus Hyperphagie, reduziertem Energieumsatz und verringerter motorischer Aktivität führt zur Entstehung der Adipositas bei NZO-Mäusen (Jürgens *et al.*, 2006). Daneben zeigen sich Begleiterkrankungen wie Hypertonie und Hypercholesterinämie (Ortlepp *et al.*, 2000) sowie eine starke Insulinresistenz und Hyperglykämie, die allerdings in ihrer Ausprägung je nach Geschlecht und Substamm stark variiert (Leiter und Reifsnnyder, 2004). So entwickeln die männlichen Tiere zwar eine Hyperglykämie und Hypoinsulinämie, die Weibchen dagegen weisen normale Blutzuckerspiegel und erhöhte Insulinkonzentrationen im Plasma auf (Kluge *et al.*, 2000).

Der *New Zealand Black*- (NZB-) Stamm, der dem NZO-Stamm am nächsten verwandt ist, entwickelt eine moderate Adipositas (ca. 11 % im Vergleich zu ca. 40 % Körperfettanteil bei NZO-Mäusen, Jürgens *et al.*, 2006), eine starke Hypercholesterinämie sowie eine leichte Hypertonie (Ortlepp *et al.*, 2000). Sowohl NZO-Tiere (Igel *et al.*, 1997) als auch NZB-Mäuse weisen mehrere Mutationen im Leptinrezeptor-Gen auf, so dass diesen Mutationen keine funktionelle Bedeutung bei der Ausprägung der extremen Adipositas beim NZO-Stamm zukommen kann. Eine weitere Mutation, die beide Stämme tragen, ist eine Punktmutation im Gen, das für das Phosphatidyl-Transport-Protein (*Pctp*) kodiert. Ein Aminosäureaustausch (Arg120His) führt zu einem inaktiven Protein. Dies erklärt möglicherweise den gestörten Phosphatidylcholin-Metabolismus bei NZO-Mäusen (Pan *et al.*, 2006a, Pan *et al.*, 2006b).

Der *Swiss Jim Lambert* (SJL)-Mausstamm stammt von drei Subpopulationen aus dem *Swiss Webster*-Auszuchtstamm ab, die zwischen 1938 und 1943 in die *Jackson Laboratories* (USA) gebracht wurden. Jim Lambert begann die Inzucht der Tiere im Jahr 1955. SJL-Mäuse sind im Gegensatz zu NZO-Mäusen resistent gegenüber einer Diät-induzierten Gewichtszunahme (Abb. 1.2) (Festing, 1997), weisen einen geringen Körperfettanteil auf (West *et al.*, 1992), entwickeln keine Arteriosklerose (Paigen, 1995; Nishina *et al.*, 1993) und haben niedrige Plasma-Cholesterinspiegel (Weibust, 1973).

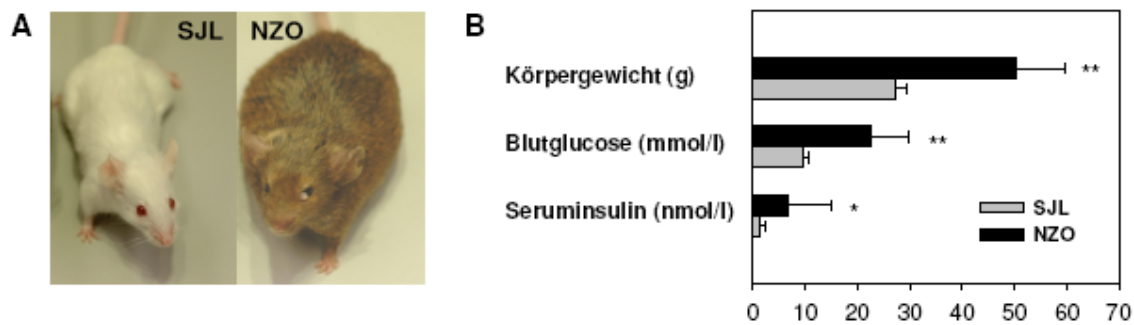


Abb. 1.2: Phänotypischer Vergleich der Inzucht-Mausstämme *Swiss Jim Lambert* (SJL) und *New Zealand obese* (NZO). (A) Der deutliche Unterschied im Körpergewicht der adulten Tiere ist hauptsächlich auf eine erhöhte Fettmasse bei NZO-Mäusen zurückzuführen. (B) NZO-Mäuse weisen im Vergleich zu SJL-Mäusen ein höheres Körpergewicht, sowie erhöhte Blutglucosespiegel und Seruminsulinkonzentrationen auf. Diese Merkmale spiegeln das humane Metabolische Syndrom wieder (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; modifiziert nach Ortlepp *et al.*, 2000).

1.3.2 Identifizierung des Adipositas-QTL *Nob1*

Zur Aufklärung der genetischen Ursachen der polygenen Erkrankungen der NZO-Maus wurden verschiedene Kreuzungsansätze durchgeführt und mögliche Kandidatengene untersucht.

Aus der kombinierten Analyse zweier Rückkreuzungen mit den Inzuchtstämmen NZO und SJL ergab sich ein LOD-score (BMI) von ca. 8 beim genetischen Marker D5Mit302 (61,8 Mbp, NCBI Build 37.1; Giesen, Dissertation 2004). Dieser als *Nob1* (*New Zealand obese 1*) bezeichnete Suszeptibilitätslocus für Hochfett-Diät-induziertes Körpergewicht auf Chromosom 5 umfasst ca. 45 Mbp (LOD > 3,3; Abb. 1.3).

In ihrer Arbeit charakterisierte Kirsten Giesen die Phänotypen der Parentaltiere, der F1- und Rückkreuzungstiere aus verschiedenen Kreuzungsansätzen. Ein Vergleich der Körpergewichte von F1-Tieren (SJL-Weibchen x NZO-Männchen, SZO) mit den Parentaltieren zeigte zwar, dass die Gewichte der F1-Generation zwischen denen der NZO- und SJL-Parentaltiere lagen, jedoch näher an den SJL-Mäusen. Schon hier spekulierte Kirsten Giesen auf dominante suppressive Genvarianten, die zu einem geringeren Körpergewicht führen und vom SJL-Genom stammten. Allerdings wurde dieser Spekulation nicht weiter nachgegangen, sondern ein oder mehrere NZO-Allele angenommen, die zu einem Anstieg des Körpergewichts führten.

NZO-*Nob1*-Allelträger (homozygot und heterozygot) wiesen signifikant höhere Körpergewichte, eine stärkere Gewichtszunahme, erhöhte BMI und Körperfettanteile im Vergleich zu homozygoten SJL-Allelträgern auf. Zudem waren die Plasma-Insulinwerte

doppelt so hoch wie bei den homozygoten SJL -Allelträgern. Die Plasmawerte für Triglyceride und Cholesterin zeigten keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Kluge *et al.*, 2000; Giesen, 2004).

Ein wesentliches Merkmal des *Nob1* war dessen Kopplung mit einer Hochfett-Diät (HFD) während bei Fütterung einer Standard-Diät (SD) keine genotypbedingten Gewichtsunterschiede zu sehen waren (Giesen, 2004). Diese Beobachtung macht *Nob1* zu einem sehr interessanten Adipositas-QTL, da dieser Suszeptibilitätslocus zu einer diätabhängigen Gewichtszunahme führt. Diese Diätabhängigkeit scheint sich auf den Fettanteil zu beziehen, weil die verwendete HFD neben einem erhöhten Fettanteil (HFD: 16 %; SD: 5 %) einen ähnlich hohen Anteil an Kohlenhydrat-Anteil wie die verwendete Standard-Diät enthält (HFD: 46,8 %; SD: 48 %). Diese Zusammensetzung entspricht ungefähr der „Cafeteria-Diät“ (Darimont *et al.*, 2006), die in Industrieländern zu einem so rasanten Anstieg in der Adipositas-Prävalenz führt (Larson *et al.*, 1995). Der Hochfett-Diät-spezifische *Nob1*-Effekt lässt auf eine Diät-induzierte Veränderung im Stoffwechsel schließen, die mit einer oder mehreren Genvarianten innerhalb des *Nob1* assoziiert sind. Da eine Diät mit einem hohen Fettanteil zu Adipositas, Insulinresistenz und im Weiteren zum Metabolischen Syndrom führen kann, sind für eine weitere Untersuchung von Genen und deren Expression besonders die Gewebe interessant, die eine wichtige Rolle in der Entstehung der Adipositas spielen – dazu zählen Fettgewebe, Skelettmuskel, Leber und Hypothalamus.

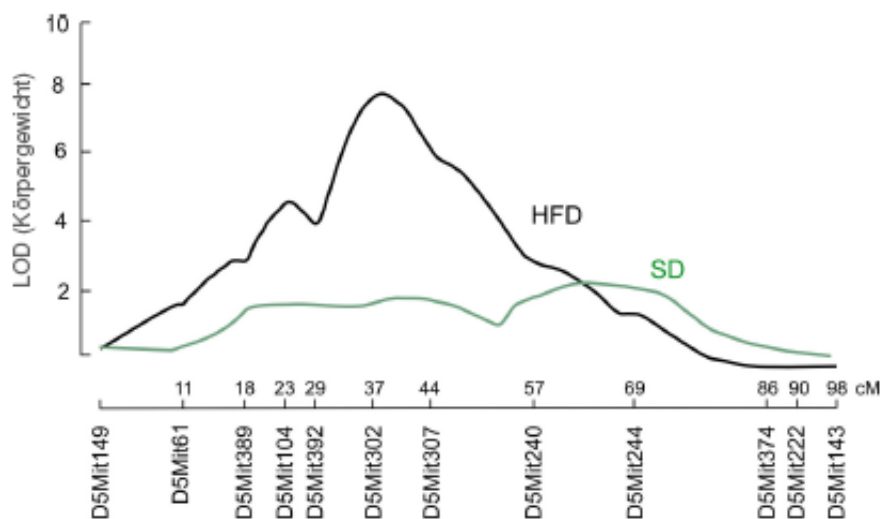


Abb. 1.3: Darstellung der LOD-score-Kurven für den Adipositas-QTL *Nob1*. Diese Kurven wurden auf der Grundlage von zwei unabhängigen Rückkreuzungsmodellen der Mausstämmen NZO und SJL erstellt. Dazu wurden 22 Wochen alte Tiere aus der NZOxF1-Generation phänotypisch charakterisiert und genotypisiert (n=206). Der jeweilige Genotyp wurde mit dem Körpergewicht der Tiere korreliert. Die Auswertung erfolgte mit der *MapMaker*-Software. Der maximale LOD-score wurde beim genetischen Marker D5Mit302 erreicht. (modifiziert nach Kluge *et al.*, 2000 und Giesen, 2004). Es ist deutlich sichtbar, dass *Nob1* nur unter HFD-Bedingungen auftritt, während die Fütterung einer SD keine signifikante Korrelation des *Nob1*-Genotyps mit dem Merkmal Körpergewicht zeigt.

Im gleichen Rückkreuzungsmodell von NZO- und SJL-Mäusen wurde auf dem distalen Chromosom 4 ein QTL für Diabetes identifiziert (*Nidd/SJL*), der auf einer Genvariante im SJL-Genom beruht. Allerdings ist für die Ausprägung des diabetischen Phänotyps ein erhöhtes Körpergewicht im frühen Lebensalter (8 Wochen) nötig (Plum *et al.*, 2002). Unter dem Einfluss einer fettreichen Diät interagieren *Nidd/SJL* und *Nob1* miteinander in Bezug auf die Höhe der Diabetesprävalenz. Sind beide Risiko-Allele (*Nidd/SJL* und *Nob1/NZO*) vorhanden, erkrankten die Tiere zu einem früheren Zeitpunkt und die Diabetesprävalenz liegt deutlich höher als bei den Tieren, die jeweils nur ein Risiko-Allel tragen (Plum *et al.*, 2002; Abb. 1.4).

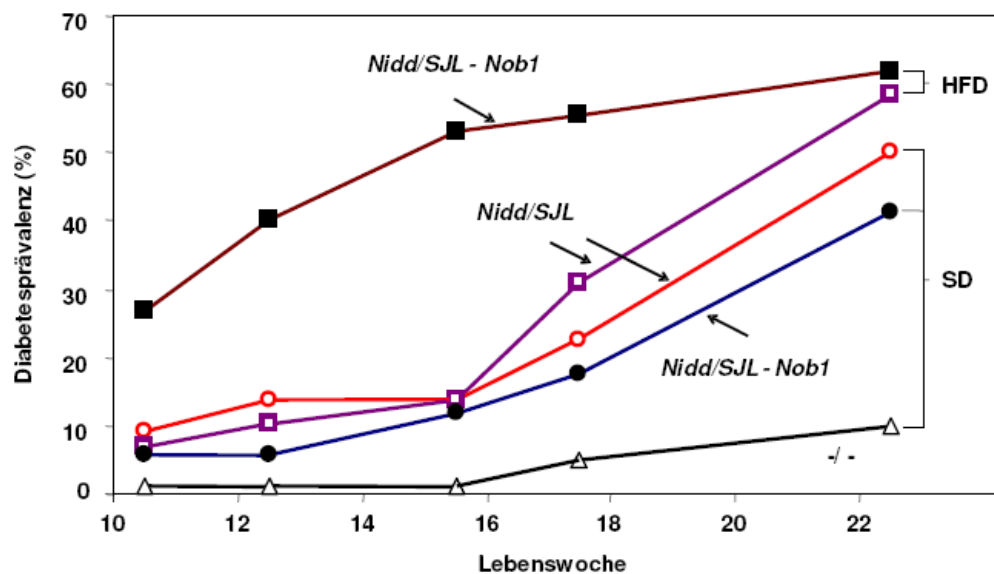


Abb. 1.4: Interaktion des Adipositas-QTL *Nob1* mit dem Diabetes-QTL *Nidd/SJL* und Einfluss der Diät auf die Diabetesprävalenz. Tiere, denen eine Standard-Diät (SD) verabreicht wurde und die weder das *Nob1/NZO*- noch das *Nidd/SJL*-Allel trugen (-/-), zeigten eine geringe Diabetesprävalenz. Die Prävalenz stieg bei Tieren, die nur das *Nidd/SJL*-Allel trugen, jedoch war kaum ein Unterschied zwischen SD und Hochfett-Diät (HFD) zu beobachten. Auch wenn Tiere beide Risiko-Allele (*Nidd/SJL-Nob1*) trugen, erhöhte sich die Diabetesprävalenz unter SD-Bedingungen nicht. Nur wenn eine HFD verabreicht wurde und beide Risiko-Allele vorhanden waren (*Nidd/SJL-Nob1*), stieg die Prävalenz für Diabetes schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt an (modifiziert nach Plum *et al.*, 2004).

1.3.3 Genomische Lokalisation und stammspezifische Herkunft des *Nob1*

Der QTL *Nob1* ist auf Chromosom 5 zwischen den Mikrosatellitenmarkern D5Mit389 und D5Mit259 lokalisiert. Dieser Bereich entsprach dem Konfidenzintervall der LOD-score-Kurve, für den der berechnete LOD-score-Wert größer als 3,3 war und somit eine signifikante Korrelation zwischen Körpergewicht und auftretendem Genotyp vorlag. Diesem Bereich von ca. 27 cM, der einem Chromosomenabschnitt von ungefähr 50 Mbp entspricht, wurden etwa 500 Genmodelle zugeordnet (NCBI-Gendatenbank, *Build 36.1*, 2006).

Zur Identifikation der Herkunft des körperrgewichtsbeeinflussenden Allels von *Nob1* wurden weitere Kreuzungen etabliert. In Kreuzungen des NZO-Stammes mit dem nahe verwandten NZB-Stamm (Katja Schmolz, Dissertation in Vorbereitung) und mit dem C57BL/6J-Stamm (Heike Vogel, Diplomarbeit 2005) konnte die Kopplung des *Nob1*-Genotyp mit dem Körpergewicht jedoch nicht verifiziert werden. In der Literatur sind weitere Adipositas-QTL auf dem proximalen Chromosom 5 beschrieben. So identifizierten z.B. Taylor und Mitarbeiter in einem Kreuzungsmodell der *Small Mouse* (SM) mit dem NZO-Stamm zwei Adipositas-QTL auf dem proximalen Chr. 5: einer bei D5Mit180 (*Obq11*) und ein zweiter bei D5Mit233 (*Obq12*, 24 Mbp bzw. 53 Mbp; NCBI Build 37.1; Taylor *et al.*, 2001). Überlappend mit *Obq11* wurde beim Marker D5Mit227 (19,1 Mbp; NCBI Build 37.1) ein dritter Adipositas-QTL in diesem Bereich identifiziert, der bei einer Kreuzung von C57BL/6J- und DBA/2J-Mäusen auftrat (Keightley *et al.*, 1998). Diese QTL weisen auf weitere Genvarianten hin, die das Körpergewicht von Mäusen beeinflussen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Kandidatengene für Adipositas im Bereich des *Nob1* zu identifizieren. Dazu sollten folgende Analysen durchgeführt werden:

(1) Untersuchung auf Expressionsunterschiede zwischen den Mausstämmen NZO und SJL

Um eine Genvariante aus den ca. 500 Genmodellen des *Nob1* zu identifizieren, die für den Effekt auf das Körpergewicht verantwortlich ist, und ausgewählte Kandidatengene auf ihre Expression zu untersuchen, sollten Macroarray- und Microarray-Experimente mit cDNAs von verschiedenen stoffwechselrelevanten Geweben der Parental-Mausstämme NZO und SJL durchgeführt werden. Die Verifizierung der Ergebnisse aus den Array-Versuchen sollte mit Hilfe der quantitativen *Real-Time*-PCR-Technik erfolgen.

(2) Sequenzierung von Kandidatengenen

Die verantwortliche(n) Genvariante(n) für den *Nob1* sollte(n) durch den Sequenzvergleich der codierenden Genabschnitte zwischen NZO und SJL identifiziert werden.

(3) Weitere Expressionsanalysen

Die identifizierte(n) Genvariante(n) sollte(n) durch die Untersuchung der mRNA-Expression in weiteren Geweben auf ihre mögliche Funktion im Stoffwechsel untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Mausinzuchtstämme verwendet:

- für die Macro- und Microarray-Experimente:

NZO/HIBom (Taconic, M+B, Ry, Dänemark)

SJL/NBom (Taconic, M+B, Ry, Dänemark)

- für quantitative *Real-Time*-PCR-Versuche:

C57BL/6JCrI (Charles River Laboratories, Sulzfeld)

B6.V-Lepob/J (Charles River Laboratories, Sulzfeld)

- für Sequenzierungen:

AKR/J (Universität Marburg, AG Heldmaier/Klingenspor, eigene Zuchtkolonie)

FVB/N (Charles River Laboratories, Sulzfeld)

NON/LtJ (Jackson Labor über Fa. Charles River Laboratories, Sulzfeld)

NZB/OlaHsd (Fa. Harlan, Borchten)

SM/JCrI (Jackson Labor über Fa. Charles River Laboratories, Sulzfeld)

SWR/J (Universität Marburg, AG Heldmaier/Klingenspor, eigene Zuchtkolonie)

Alle 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 Bakterienstämme

Zur Vervielfachung von Plasmid-DNA wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

DH5 α Hanahan *et al.*, 1983

TOP 10 F' Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.1.3 Plasmid- und Expressionsvektoren

Folgende Plasmid- und Expressionsvektoren wurden in dieser Arbeit benutzt:

Plasmidvektoren

pBlueskript®II-KS	Stratagene, La Jolla, USA
pCR2.1-TOPO	Invitrogen, Carlsbad, USA

Expressionsvektoren

pGEX.3X	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
---------	--------------------------------------

2.1.4 Enzyme, Standards und Reaktionskits

Die verwendeten Enzyme sowie Molekulargewichts- und Längenstandards wurden von den Firmen *New England Biolabs* (Schwalbach), *Boehringer* (Mannheim), *Roche Diagnostics GmbH* (Mannheim), *MBI Fermentas GmbH* (St. Leon-Roth) und *BioRad* (München) bezogen. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Produkte und Reaktionskits nach Herstellerangaben eingesetzt.

Folgende Reaktionskits wurden verwendet:

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma, Deisenhofen
InViSorb™ Genomic DNA Kit II	InViTek GmbH, Berlin
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Midi-/Maxipräparationskit	Qiagen, Hilden
Rapid Ligation Kit	Promega, Madison, USA
TNT® T7 Quick Coupled Translation System	Promega, Mannheim
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim
First Strand cDNA Synthesis-Kit™	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
TaqMan® Universal PCR Master Mix:	
No AmpErase® UNG	Applied Biosystems, Foster City, USA
TOPO™ TA Cloning® Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.5 Nährmedien, Puffer, Lösungen

Alle verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden mit destilliertem, entionisiertem Wasser (ddH₂O) hergestellt und falls nicht anders angegeben durch Autoklavieren (20 min/ 121 °C/ 1 bar) oder Filtration (0,45 µm) sterilisiert. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte bei Bedarf vor dem Autoklavieren mit 10 % HCl oder 10 % NaOH.

2.1.5.1 Bakterienkulturmedien

LB-Medium	1 % Pepton; 1 % NaCl; 0,5 % Hefeextrakt
LB-Agar	1 % Pepton; 1 % NaCl; 0,5 % Hefeextrakt; 1,5 % Agar

2.1.5.2 Puffer, Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ ml in ddH ₂ O
Kanamycin-Stammlösung	30 mg/ ml in ddH ₂ O
SOC-Medium	0,5 % Hefeextrakt; 2,0 % Trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 2 % Glucose
TAE (1x)	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA; pH 8,0

2.1.6 Sonstige Materialien

Acrylamid/Bis 19:1 (Bio-Rad, München)

APS (Merck, Darmstadt)

TEMED (Bio-Rad)

EDTA (Merck)

Ficoll 400 (Sigma)

Xylencyanol FF (Merck)

Bromphenolblau (Merck)

Tris-HCl (ICN *Biomedicals*, OH, USA)

Borsäure (Merck)

2.1.7 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Primer* wurden von den Firmen MWG Biotech (Darmstadt Ebersberg), Invitrogen (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Sie waren HPLC-gereinigt, lyophilisiert und wurden nach entsprechender Verdünnung für die PCR-Reaktion oder für die Sequenzierung von DNA eingesetzt.

Eine Übersicht der verwendeten *Primer* für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente für den Macroarray-Versuch ist im Anhang unter der Tabelle A1 zu finden. Die Übersicht der *Primer*, die für die Sequenzierung von Genen benutzt wurden, befindet sich im Anhang in Tabelle A4.

Primer für die quantitative Real-Time PCR (SybrGreen®)

<u>Genname</u>	<u>Primersequenz forward (5'→3')</u>	<u>Primersequenz reverse (5'→3')</u>
<i>2310045A20Rik</i>	CTCCCAGGGATTTTTCAACC	GCCGAAGATGAAGGTAAAGC
<i>Pgm1</i>	TGTCGCACCTGAAACTCTGC	AGAAGGGGACTACTGTCAACC
<i>Cpeb2</i>	CACCACCGAAATTCACCTCG	TCGATCCTGGTCTATTCTGG
<i>Gabra4</i>	CTCACCATAAGTGCGGAGTG	GATACAGTCTGCCCAATGAGG
<i>Pcdh7</i>	GCATTATGGCTTGACACAGG	TGTCATAATGCCAGCAACC
<i>Mrfap1</i>	ATGCTGATCCAGATCAAGACG	GAATCCATTGGCTGGAAACC
<i>Mpv17</i>	CAAACCTGAAGCGGGACTACC	CACGGTGCATCAGTACAAGG
<i>Ucn</i>	TGGGCAGACACTCCGATAAC	TCCGCTAACAGCAAGAGGAG
<i>Letm1</i>	CAGGGGAGAGTGTCATCAGC	GTGGCCACAATTTTCAGCTACC
<i>Qdpr</i>	TGGCAGGGAAGAACAGTGG	ACCACCTGGATTAGGCTTCC
<i>Igfbp7</i>	AGCAACGGCATCACCTACC	GCTGAACTCCAGAGTGATCC
<i>Rhoh</i>	AGAACCCACCGACTGTCTCC	GAGAAACAGTGACCGCTTGG
<i>Spp1</i>	TGCACCCAGATCCTATAGCC	ACAGAATCCTCGCTCTCTGC
<i>Alox5ap</i>	AGATGCGTACCCCACTTTCC	CGAAGGACATGAGGAACAGG
<i>Aacs</i>	CAGGATCAACCCCAAACAG	AGGTCAGGCTGGAAAGTGTG
<i>Mll5</i>	ATTTGATCGACGGGAGTTGC	AAGCTAGCCTGGTTTTCTGC
<i>Ppp1cb</i>	GATTTGTGCGAGCTCATCAGG	TTCGGTGGATTAGCTGTTCCG
<i>Insig1</i>	TGATAGCCACCATCTTCTCC	GAGGGCTGCTAAAGTCAAGG
<i>Abhd1</i>	TTCAATCAGCCACTCACTGC	GCATTGAGGCAGAGAACAGG
<i>Spink2</i>	CTCCTGGTCACAGACTTTGC	GTCCTCCCTGATTTTCATGC

Primer zur Klonierung der Vollängen- *Tbc1d1*-cDNA:

Fwd: 5'-TGCGTCGACGAAGCAGAGACTGTGGAGTGG-3'

Rev: 5'-ATCGTATACAACAACCAGGACTGGAAAGG-3'

Tbc1d1-Sonde und *Primer* für die *TaqMan-RealTime-PCR* (2 x markiert: 5' 6-FAM; 3' TAMRA):

1) alle Isoformen

Fwd: 5'-AGTGGCCACTCCACAGAAG-3'

Rev: 5'-TCCTGTACTGGGCCAAATG-3'

Sonde: 5'-ACTCCCCGAGCAGATATGAAGATTATTCCGAGCTG-3'

2) lange Isoform

Fwd: 5'-ATGTGGACCATCTTCCTGG-3'

Rev: 5'- GCTCTCCACTGGAATTGTG-3'

Sonde: 5'TTCAGCTCCGCCTCCACCTCGTCTTAA-3'

Zusätzlich wurden je eine *TaqMan*-Sonde der Firma ABI für die Gene *Tbc1d1* und *Tbc1d4* verwendet.

Primer zur Identifikation der 7 bp-Deletion des Gens *Tbc1d1* in Exon 18:

Fwd: 5'-GAGCAGGTCAGCTGTCACTTT-3'

Rev: 5'-TGAGACCTTGGCAGTATCCA-3'

Primer zur PCR-Amplifikation von Genen in Plasmiden:

M13 forward 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

M13 reverse 5'-GGAAACAGCTATGACCAT-3'

T3 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'

T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

pME forward 5'-CTTCTGCTCTAAAAGCTGCG-3'

pME reverse 5'-CGACCTGCAGCTCGAGCACA-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1.1 Haltungsbedingungen

Die verwendeten Tiere wurden nach den Richtlinien zur Tierhaltung und des Tierschutzes gehalten.

Die Mäuse wurden in Makrolon Käfigen (Typ III, Fa. EBECO, Castrop-Rauxel, Deutschland) auf entstaubter Weichholzfaser (Fa. Rettenmaier & Söhne, Ellwangen, Deutschland) bei einer konstanten Temperatur von 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 +/- 5 % gehalten. Der 12-stündige Hell-Dunkel-Zyklus begann morgens um 6 Uhr.

Den Zuchttieren stand eine Standard-Diät (SD) zur Haltung von Nagern (1314; Fa. Altromin, Lage) mit 5 % Fett (Sojaöl), 48 % Kohlenhydraten und 22,5 % Eiweiß sowie keimfreies und entkalktes Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Das Standardfutter war cholesterinfrei und hatte einen Energiegehalt von 12,5 kJ/g.

Die Versuchstiere wurden drei Wochen nach der Geburt abgesetzt. Danach erhielten sie entweder eine SD zur Haltung von Nagern (1314; Fa. Altromin, Lage, siehe oben) oder ein Hoch-Fett-Diät (HFD) zur Haltung von Nagern (Typ C1057; Fa. Altromin, Lage) mit 16 % Fett (Sojaöl), 46,8 % Kohlenhydraten und 17,1 % Eiweiß (ME: 17,2 kJ/g, 4,1 kcal/g). Futter und Wasser standen den Tieren jederzeit *ad libitum* zur Verfügung.

Die Tiere wurden nach Geschlecht getrennt und als Geschwistergruppen in Käfigen zu 2-6 Tieren gehalten.

2.2.1.2 Phänotypische Charakterisierung

Zur Erhebung phänotypischer Daten und zur Gewinnung von unterschiedlichen Geweben der Inzuchtstämme NZO und SJL wurde ein Tierexperiment über 12 Wochen durchgeführt. Drei Wochen nach der Geburt wurden die Jungtiere abgesetzt und entweder auf einer SD oder auf einer HFD gehalten. Nach 4, 8 bzw. 12 Wochen wurden 6-8 Tiere pro Gruppe getötet und verschiedene Gewebe für die Array-Experimente entnommen (Abb. 2.1)

Die phänotypische Charakterisierung begann in der 4. Lebenswoche. Dazu wurde wöchentlich das Körpergewicht mit Hilfe einer elektronischen Waage ($\pm 0,1$ g) (Fa. Satorius, Göttingen) und die Körperzusammensetzung (Körperfett, Muskelmasse und freier Wassergehalt) mittels NMR-Methode (*nuklear magnetic resonance*,

Kernresonanzspektroskopie; Bruker-Minispec-NMR-Analyser mq10, Fa. Bruker Optics) am nicht narkotisierten Tier (Mystkowski, 2000) bestimmt. Das Prinzip der Kernresonanzspektroskopie beruht auf dem spezifischen Verhalten von Atomkernen in einem Magnetfeld. So nehmen Protonen in Wasserstoffatomen durch das Anlegen eines externen Magnetfeldes gerade so viel Energie auf, um in einen energiereicheren Zustand überzugehen. Diese Kernresonanzenergie ist abhängig von den Bindungsverhältnissen der Protonen, die in Fett- und Muskelgewebe unterschiedlich sind. Die Energieaufnahme wird in einem Kernresonanzspektrum aufgezeichnet.

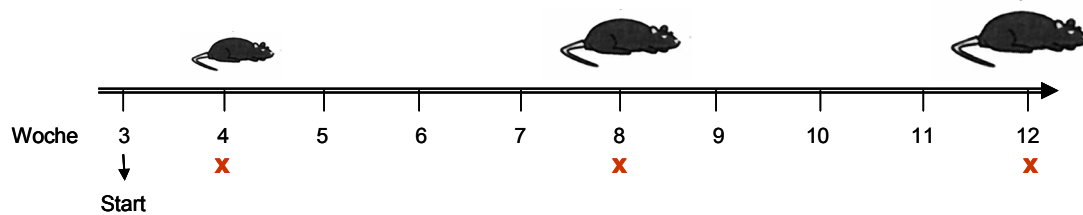


Abb. 2.1: Zeitlicher Versuchsablauf des Tierexperiments. Nach Absetzen der Tiere in Woche drei wurden die Mäuse auf den unterschiedlichen Diäten gehalten (SD bzw. HFD) und in Lebenswoche 4, 8 bzw. 12 zur Gewebeentnahme getötet (x).

2.2.1.3 Tötung der Tiere und Gewebepräparation

Im Alter von 4, 8 bzw. 12 Wochen wurde den Tieren unter Äthernästhesie durch eine Herzpunktion mit EDTA-Monovetten (4,5 ml; Fa. Sarstedt, Nümbrecht) Blut entnommen. Das EDTA-Blut wurde 10 min bei $4000 \times g$ und $4^\circ C$ zentrifugiert, das Plasma abgenommen und bei $-80^\circ C$ gelagert. Folgende Organe wurden präpariert, in Folie eingepackt und bis zur Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt: weißes Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT), braunes Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT), Leber, Skelettmuskel (SM), Herz, Pankreas, Niere, Dünndarm, Dickdarm und Hypothalamus. Die Langzeitaufbewahrung der Gewebeproben erfolgte bei $-80^\circ C$.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolation von genomischer DNA aus Mausschwänzen

Aus Schwanzspitzen von Mäusen wurde genomische DNA mit Hilfe des *InViSorb™ Genomic DNA Kit II* (InViTek GmbH, Berlin) isoliert. Diese Methode der DNA-Isolation beruht auf einem Salzpräzipitationsverfahren. Der Ablauf des Protokolls wurde beibehalten, allerdings wurden die Mengen an Puffern wie folgt geändert:

Lysepuffer G	200 µl
Proteinase K (20 mg/ml)	10 µl
Bindungspuffer	460 µl
Waschpuffer	3 x 700 µl
Elutionspuffer D	210 µl

Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde photometrisch bestimmt und mit ddH₂O auf 10 ng/µl eingestellt.

2.2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation der üNK gewonnen, in TE-Puffer resuspendiert und mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen (0,1 M NaOH; 0,5 % SDS; in TE-Puffer). Die DNA wurde anschließend in saurem Milieu (3 M NaOAc) mit Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde in TE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

In einigen Fällen (für den Einsatz in Sequenzier-Reaktionen oder zur *in vitro* -Translation) wurde die Plasmid-DNA aus den Zellen mit dem *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich, Steinheim) gemäß den Herstellerangaben isoliert.

TE-Puffer: 10 mM Tris; 1 mM EDTA ; pH 8,0

2.2.2.3 Isolation von Gesamt-RNA aus Mausgeweben

Der Gewebeaufschluss erfolgte unter Zugabe von Qiazol (Qiagen, Hilden) mittels eines *TissueLysers* (Qiagen, Hilden). Zur Isolation der Gesamt-RNA diente eine Phenol-Chlorophorm-Extraktion mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden), das nach Angaben des Herstellers verwendet wurde. Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurden je 1-2 µg RNA auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen. Waren die charakteristischen 18S- und

28S-Banden im Gel deutlich zu sehen, wurde die RNA weiterverarbeitet. RNA-Proben, bei denen das nicht der Fall war, wurden verworfen. Die RNA wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.2.4 Herstellung einer Erststrang-cDNA aus Gesamt-RNA

Für weitere Analysen der Genexpression mittels *Real-Time*-PCR oder als Matrize für eine PCR wurde die mRNA (*messenger RNA*) in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Dieser Vorgang erfolgte durch das Enzym *Reverse Transkriptase* (RT). Reverse Transkriptasen verwenden RNA als Matrize und synthetisieren an das 3'-Ende eines *Primers* die komplementäre DNA (cDNA). Für jede Reaktion wurden $2\text{ }\mu\text{g}$ Gesamt-RNA eingesetzt.

Die entstandene cDNA wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Protokoll einer Erststrang-cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Komponente	Finale Konzentration
Gesamt-RNA	$2\text{ }\mu\text{g}$
Hexa-Nukleotid- <i>Primer</i>	200 ng
dNTPs	$500\text{ }\mu\text{M}$ (gesamt)

→ 5 min $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ zum Anlagern der Primer, 2 min auf Eis

Komponente	Finale Konzentration
5 x Puffer	1 x
DTT	4 mM
<i>SuperScriptTM III Reverse Transcriptase</i>	200 units

→ 5 min $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 60 min $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren, 15 min $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Denaturierung des Enzyms

2.2.2.5 Primerdesign

Für das Design genspezifischer *Primer*-Paare (Produktlänge 300-500 bp) wurde die gesamte Sequenz der mRNA des Gens mittels der BLAST *Software* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gegen die NCBI-Datenbank für bekannte mRNAs und ESTs (*Expressed Sequence Tags*) abgeglichen. Es wurden nur solche Bereiche der mRNA in Betracht gezogen, die keine Sequenzhomologien zu anderen bekannten Genen oder zu anderen Isoformen desselben Gens aufwiesen. Waren solche Bereiche nicht vorhanden, konnte dieses Gen nicht in das Experiment einbezogen werden. Gab es mehrere dieser spezifischen Bereiche, wurde der Bereich bevorzugt, der am nächsten am 3'-Ende der mRNA lag. Die Analyse der Exonstruktur der Gene wurde mit der BLAT *Search Software* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) durchgeführt. Für das Primerdesign wurden Exone genutzt, die länger als 300 bp waren. War keines der Exone eines Gens länger als 300 bp,

wurde die cDNA-Sequenz des Gens für das Primerdesign verwendet. Die Primerpaare wurden mit der *Primer3-Software* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) erstellt. Die Sequenz des gesamten PCR-Produktes wurde noch mal mittels *BLAST-Software* auf Sequenzhomologien zu anderen Genen überprüft.

Für einige der Gene und für 217 zufällig gewählte Kontrollgene wurden cDNA-Klone aus der RZPD-cDNA-Bibliothek „Mouse Unigene Set RZPD 2“ (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin) bestellt. Diese Gene wurden mit Sequenzier-*Primern* der jeweiligen Plasmide amplifiziert, die die Gene enthielten (siehe Anhang Tabelle A2).

2.2.2.6 Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine molekularbiologische Methode, um größere Mengen kleiner DNA-Fragmente herzustellen (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986). Dabei wird der von zwei *Primern* flankierte DNA-Abschnitt (Matrize, engl. *Template*) mittels des Enzyms DNA-Polymerase in mehreren Temperaturzyklen vervielfältigt (Denaturierung, Primerhybridisierung, Elongation).

Standardprotokoll für die erste PCR (10 µl Reaktionsvolumen):

Komponente	Finale Konzentration
<i>Template</i> genomische DNA/ cDNA	20 ng/ 25 ng
<i>Primer</i> 5'→3'	500 nM
<i>Primer</i> 3'→5'	500 nM
10 x Puffer	1 x
dNTPs	250 µM pro dNTP
<i>JumpStart REDAccuTaq DNA Polymerase</i>	0,5 U

Temperaturprogramm für den Thermocycler:

Initiale Denaturierung	96 °C	2 min
Zyklus 1-30:		
Denaturierung	94 °C	30 sek
Primerhybridisierung	55-60 °C	30 sek
Elongation	68 °C	60 sek
Finale Elongation	68 °C	10 min
Halten	4 °C	

Die Menge von mindestens 6 µg PCR-Produkt wurde in einer zweistufigen PCR-Reaktion amplifiziert. Dazu erfolgte eine Reamplifizierungs-PCR. Von der ersten PCR wurde 1 µl auf

ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen, um die Qualität der PCR zu überprüfen (siehe 2.2.2.7.1.). War nur eine distinkte und starke Bande der erwarteten Größe zu sehen, wurden je nach Bandenstärke 0,5-1 µl dieser ersten PCR ohne Reinigung der PCR als Ausgangsprodukt für die zweite PCR verwendet (Reamplifizierung). Waren in der ersten PCR mehr als eine distinkte Bande zu sehen, wurde die gesamte restliche erste PCR auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen, die Bande mit der richtigen Größe unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systems* (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben aufgereinigt (20 µl Elutionsvolumen). Dieses gereinigte Produkt diente daraufhin als Matrize für die Reamplifizierungs-PCR.

Zeigte ein PCR-Produkt eine sehr schwache einzelne Bande, wurde die restliche Reaktion ebenfalls mit dem *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Mannheim) aufgereinigt ohne sie jedoch vorher über ein Agarosegel aufzutrennen, um die Ausbeute des PCR-Produkt zu erhöhen. Das gereinigte Produkt wurde dann in einen T-Vektor ligiert und in chemisch kompetente *E.coli*-Zellen transformiert (siehe 2.2.2.10.). Als *Template* für die Reamplifizierungs-PCR wurde dann die DNA eines positiven Klons dieser Transformation genutzt. Mit dieser Klonierungsstrategie wurde die Effizienz der Reamplifikation erheblich gesteigert.

Standardprotokoll für die Reamplifizierungs-PCR (4-6 x 50 µl Reaktionsvolumen):

Komponente	Finale Konzentration
<i>Template</i> erste PCR	0,5-1 µl
<i>Primer</i> 5'→3'	400 nM
<i>Primer</i> 3'→5'	400 nM
5 x Puffer	1 x
dNTPs	250 µM pro dNTP
<i>GoTaq DNA Polymerase</i>	2 U

Temperaturprogramm für den Thermocycler:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
Zyklus 1-25:		
Denaturierung	95 °C	30 sek
Primerhybridisierung	57-62 °C	30 sek
Elongation	72 °C	60 sek
Finale Elongation	72 °C	10 min
Halten	4 °C	

Von den Reamplifizierungen wurden zur Qualitätsprüfung je 1 µl auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Die restlichen 200-300 µl PCR-Produkt wurden mittels des *PCR-Purification Kits* gereinigt (Elutionsvolumen 100 µl ddH₂O). Je 0,5 µl des Eluats wurden wiederum auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des *MassRulers* (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) die Konzentration der DNA-Lösung mit der *ImageQuant Software* densitometrisch bestimmt.

Die DNA-Lösungen wurden mit Hilfe einer Vakuum-Zentrifuge (Speed Vac® Plus SC 210A, Savant, Kehl/Rhein) lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

2.2.2.7.1 Agarosegel

Um PCR-Produkte oder andere DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurden sie in einem Agarosegel elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Kleinere DNA-Fragmente bewegen sich schneller durch die Gelmatrix als größere Fragmente. Dabei bedient man sich der Eigenschaft der negativen Ladung der DNA, die beim Anlegen einer elektrischen Spannung zum positiven Pol wandert. Die Anfärbung der DNA erfolgte mit Ethidiumbromid, einem unter UV-Licht fluoreszierenden Farbstoff (Endkonzentration 0,5 µg/ml Gellösung). Als Größenstandards wurden die 100 bp- oder 1 kb-DNA-Leiter benutzt (MBI Fermentas, St. Leon-Roth).

2.2.2.7.2 Denaturierendes Agarosegel

Die Auftrennung einer mit $\alpha[^{33}\text{P}]$ -dCTP markierten cDNA erfolgte mit Hilfe eines denaturierenden Agarosegels. Hierfür wurden 0,5 g Agarose in 50 ml Millipore-Wasser durch Erhitzen gelöst. Die Lösung wurde auf 60 °C abkühlen lassen. Dann wurden 500 µl NaOH (5 M) und 100 µl EDTA (0,5 M) zugegeben und das Gel gegossen.

- Elektrophorese - Puffer : 50 ml

NaOH 5 M	500 µl
EDTA 0,5 M	100 µl
ddH ₂ O	ad 50 ml

- Proben-Ladepuffer: 10 ml Stocklösung 6 x

NaOH 5 M	600 µl
EDTA 0,5 M	120 µl
Ficoll	1,8 g
Bromophenolblau	0,1 %
ddH ₂ O	ad 10 ml

- Probenvorbereitung:
 - Probenvolumen auf 8 µl mit ddH₂O auffüllen
 - je 2 µl EDTA (50 mM) zugeben, bei 95 °C für 5 min denaturieren und auf Eis stellen
 - je 2 µl Proben-Ladepuffer zugeben

Die Proben (ca. 200 000 cpm) und der ebenso vorbereitete Größenmarker (300 000 cpm) wurden nun auf das Gel geladen und die DNA elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.2.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente, die in einem Agarosegel aufgetrennt wurden bzw. die sich in einem PCR-Reaktionsgemisch befanden, wurden mit dem Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.2.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA (als PCR-Produkt oder als Insert in einem Vektor) erfolgte mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.*, bei der nur ein Primer in die PCR (S-PCR, Sequenzier-PCR) eingesetzt wird. Im Reaktionsgemisch befinden sich 3',5'-Didesoxynukleotide, die unterschiedliche Fluophore tragen und von der Polymerase in den neuen DNA-Strang eingebaut werden. Die fehlende 3'-Hydroxylgruppe der Didesoxynukleotide verhindert die Verlängerung des Stranges und so kommt es zum Abbruch der Synthese. Dieser Abbruch geschieht zufällig an einer Stelle des DNA-Stranges. Die so entstandene markierte DNA wird in einer Kapillarelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und die unterschiedlichen Fluophore mit einem Laser im ABI PRISM[®] 3100- bzw. 3130-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) detektiert.

2.2.2.9.1 Sequenzierungs-PCR

Für die S-PCR wurde das *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* verwendet (Foster City, CA, USA). Ein Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 10 µl.

Standardprotokoll für eine S-PCR

Komponente	Finale Konzentration
<i>Template</i> PCR-Produkt/ Plasmid-DNA	10-20 ng/ 200-500 ng
<i>Primer</i>	40 nM
<i>Terminator Ready Reaction Mix</i>	2 µl
5 x Puffer	1 x

Temperaturprogramm für den Thermocycler:

Initiale Denaturierung	96 °C	15 sek
Zyklus 1-20:		
Denaturierung	95 °C	10 sek
Primerhybridisierung	50 °C	5 sek
Elongation	60 °C	4 min
Halten	4 °C	

2.2.2.9.2 DNA-Fällung nach der S-PCR

Die entstandenen Kettenabbruchfragmente der S-PCR wurden mit Ethanol präzipitiert, um sie von Salzen und überschüssigen markierten Nukleotiden zu reinigen. Das DNA-Pellet wurde in Formamid aufgenommen.

Protokoll einer Ethanol-Fällung nach S-PCR (alle Schritte bei Raumtemperatur)

- Überführen der Reaktion (10 µl) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß
- Zugabe von 3 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2), 62,5 µl Ethanol abs. und 14,5 µl HPLC-Wasser
- 15-20 min inkubieren
- 20 min bei 13000 Upm zentrifugieren, Überstand vorsichtig abnehmen
- Zugabe von 150 µl Ethanol (70 Vol %) zum Waschen, 5 min bei 13000 Upm zentrifugieren, Überstand vorsichtig abnehmen, Pellet 5 min trocknen lassen
- Pellet in 20 µl Formamid (Hi-Di-Formamide) aufnehmen, vortexen

2.2.2.9.3 Auswertung der Sequenzierung

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe einer systemeigenen Software aufgezeichnet. Die weitere Auswertung der Chromatogramme erfolgte entweder durch die Software Chromas oder die Software *Sequencing Analysis* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Abgleiche der Sequenzen fanden entweder mit der BLAST Software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gegen die NCBI-Datenbank für bekannte mRNAs und ESTs statt oder mit Hilfe der *SeqScape5.2*- Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.2.2.10 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.2.10.1 Herstellung eines Plasmid-T-Vektors

PCR-Produkte, die mit einer Taq-Polymerase amplifiziert wurden, tragen einen 3'-Adenosin-Überhang. Um diese Produkte in einen Vektor zu ligieren, wurde ein so genannter T-Vektor hergestellt.

Dazu wurde der Ausgangsvektor BlueScriptIIKS+ mit dem Restriktionsenzym *SmaI blunt end*, d.h. ohne überhängende Enden, aufgeschnitten. Nun wurden an die Enden mit der *GoTaq* – Polymerase dTTPs (2 mM Endkonzentration) angefügt (1 h, 72 °C). Der so entstandene Vektor mit dTTP-Überhängen wurde über ein Agarosegel und das *Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde bestimmt, auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.10.2 Ligation von DNA-Fragmenten in einen Plasmid-T-Vektor

Den Vorgang der Synthese einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei DNA-Strängen bezeichnet man als Ligation.

Die Ligation von *REDAccuTaq*-PCR-Produkten (*Insert*) in den selbst hergestellten T-Vektor (100 ng Vektor) erfolgte in einem molaren Verhältnis von Vektor:*Insert* = 1:3 durch das Enzym T4-Ligase (Roche, Mannheim) über Nacht (14 h) bei 16 °C.

2.2.2.10.3 Ligation mit dem TOPO TA Cloning Kit

Für die Ligation von PCR-Produkten wurde in einigen Fällen auch das TOPO™ TA Cloning® Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Besonderheit des bei diesem System verwendeten pCR2.1-TOPO-Vektors ist eine mit dem offenen Plasmid verknüpfte Topoisomerase, die einen DNA-Strang mit dem Vektor verbinden kann und dabei freigesetzt wird. Topoisomerasen dienen der Relaxation von DNA-Strängen, indem sie Phosphodiester-

bindungen spalten und dabei eine kovalente Bindung mit der DNA ausbilden. Durch eine chemische Reaktion mit einer 5'-Hydroxylgruppe eines anderen DNA-Stranges wird die Topoisomerase freigesetzt, die die DNA-Stränge verbindet. Der pCR2.1-TOPO-Vektor besitzt an den 3'-Enden einen Thymidinüberhang, wodurch das PCR-Produkt, das einen Adeninüberhang besitzt, problemlos mit dem Vektor ligiert werden kann.

2.2.2.11 Kultivierung von *E.coli*-Zellen (DH5 α)

Die Anzucht von *E. coli* zur Herstellung von Kulturen erfolgte über Nacht (üN) bei 37 °C und 220 UpM auf dem Schüttelinkubator in LB-Flüssigmedium, das bei Bedarf mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen wurde. Ampicillinresistente rekombinante *E. coli* DH5 α wurden in LB-Flüssigmedium mit 100 μ g/ml Antibiotikum kultiviert.

Die kurzzeitige Lagerung von rekombinanten Bakterienklonen erfolgte bei 4 °C auf Agarplatten; zur Lagerung über längere Zeit dienten 15 %ige Glycerin-Bakterien-Suspensionen bei -80 °C.

LB-Medium: 1 % Pepton; 1 % NaCl; 0,5 % Hefeextrakt

LB-Agar: 1 % Pepton; 1 % NaCl; 0,5 % Hefeextrakt; 1,5 % Agar

2.2.2.11.1 Herstellung chemisch kompetenter DH5 α -Zellen

Die Zellen wuchsen bei RT bis zu einer $E_{600\text{ nm}}$ von 0,4-0,6 in 400 ml SOC- Medium und wurden dann auf Eis gestellt. Die Zellernte erfolgte mit 2500 x g bei 4 °C. Mit 100 ml eiskaltem TB-Puffer wurden die Zellen resuspendiert, 10 min inkubiert, erneut abzentrifugiert und in 30 ml TB-Puffer aufgenommen. Dann wurde DMSO bis zur Endkonzentration von 7 % zugegeben, 10 min bei 4 °C inkubiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

SOC-Medium: 0,5 % Hefeextrakt; 2,0 % Trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂;
2 % Glucose

TB-Puffer: 10 mM Pipes; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl → pH auf 6,7 einstellen; 55 mM MnCl₂
(erst nach pH - Werteinstellung zugeben, da sich sonst Braunstein - Präzipitate bilden); sterilfiltrieren

2.2.2.12 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente DH5 α -Zellen

Als Transformation wird der Vorgang bezeichnet, bei dem kompetente Bakterien unter speziellen Bedingungen Plasmid-DNA aufnehmen. Chemisch kompetente Zellen nehmen DNA durch einen Hitzeschock auf.

Standardprotokoll für eine Transformation ligierter T-Vektoren in chemisch kompetente DH5 α -Zellen

- 100 μ l kompetente Bakterien auf Eis auftauen (Transformationseffizienz $1 \cdot 10^7$) und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe des Ligationsansatzes, Inkubation auf Eis 30 min
- Hitzeschock 30 sek bei 42 °C, danach 90 sek auf Eis
- Zugabe von 500 μ l SOC-Medium, Inkubation für 60 min bei 37 °C und 220 Upm
- Ausplattieren auf Agarplatten mit LB-Medium mit X-Gal und Ampicillin, da der BlueScriptIIKS+ eine Resistenzkassette für Ampicillin beinhaltet (dadurch wachsen nur Kolonien aus Bakterien, die den Vektor aufgenommen haben)
- Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank

Standardprotokoll für eine Transformation des TOPO-Vektors in chemisch kompetente TOP10 Zellen

- 25 μ l TOP10-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) auf Eis auftauen und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführen
- Zugabe des Ligationsansatzes, Inkubation auf Eis 30 min
- Hitzeschock 30 sek bei 42 °C, danach 90 sek auf Eis
- Zugabe von 500 μ l SOC-Medium, Inkubation für 60 min bei 37 °C und 220 Upm
- Ausplattieren auf Agarplatten mit LB-Medium mit X-gal und Ampicillin, da der pCR2.1-TOPO-Vektor eine Resistenzkassette für Ampicillin beinhaltet (dadurch wachsen nur Kolonien aus Bakterien, die den Vektor aufgenommen haben)
- Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank

2.2.2.13 Blue-White-Selektion

Sowohl BlueScriptIIKS+ als auch pCR2.1-TOPO enthalten in ihrer *Multi Cloning Site* das Lac Z Gen, das für das Enzym Beta-Galactosidase codiert. Dieses Enzym spaltet Galactose in Lactose und Glucose, aber auch andere Substrate wie z.B. X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-[Beta]-D-Galactopyranosid), einen farblosen modifizierten Galactose-Zucker. Wird X-Gal durch Beta-Galactosidase metabolisiert, entsteht eine charakteristische blaue Farbe. Sie zeigt, dass kein *Insert* in den Vektor ligiert wurde. Nur weiße Kolonien tragen den Vektor mit dem *Insert*.

Die weißen Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in 75-100 μ l Millipor-Wasser aufgelöst. Davon wurden 1-2 μ l in eine *Colony-PCR* mit M13-Sequenzierprimern und

Go-Taq-Polymerase eingesetzt, um positive Klone zu identifizieren (Protokoll und Temperaturprogramm siehe Reamplifizierungs-PCR bei 2.2.2.6).

Von den identifizierten positiven Klonen wurden 5 ml LB-Medium (mit Ampicillin) mit 25 µl der Bakteriensuspension angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.14 Macroarray-Methode

Sucht man nach Unterschieden in der Genexpression bei verschiedenen Bedingungen (z.B. zwei Mausstämme mit unterschiedlichem Phänotyp oder erhöhte Gewichtszunahme bei Gabe einer Hochfett-Diät), so kann man die Methode des Macroarrays anwenden. Sie basiert auf einer reversen *Dot Blot*-Hybridisierungstechnik (Saiki, 1989).

Mit Hilfe dieser Methode kann die Expression verschiedener Gene (bis zu 5000 Gene) gleichzeitig untersucht werden. Dazu benötigt man immobilisierte einzelsträngige DNA-Fragmente der zu untersuchenden Gene (Sonden) auf einem Filter (Okuno *et al.*, 2001; Gemma *et al.*, 2001) und einzelsträngige Gewebs-cDNAs von Tieren unter verschiedenen Bedingungen (Probe), die radioaktiv oder fluoreszent markiert sind. Lässt man die Probe mit den immobilisierten Sonden reagieren (Hybridisierung), so binden spezifisch die cDNA-Moleküle, deren komplementäres DNA-Fragment auf dem Filter vorhanden ist. Anhand der Intensität des Markierungssignals lassen sich Rückschlüsse über die Menge an vorhandener cDNA und damit der mRNA eines Gens ziehen (Bellin *et al.*, 2007; Kahlem *et al.*, 2004). Unterscheiden sich diese Mengen bei einem Gen zwischen zwei Bedingungen (z.B. unterschiedliche Haltungsdieten, verschiedenes Mausalter), so spricht man von einem differentiell exprimierten Gen.

2.2.2.14.1 Gene auf dem Array

Der zu untersuchende Abschnitt des Chromosoms 5 reichte von 31,1 Mbp bis 93,5 Mbp und beinhaltete 302 Gene. Diese sind im Anhang in Tabelle A1 aufgeführt. Für die Auswahl der zu untersuchenden Gene wurden folgende Kriterien verwendet:

- Für das jeweilige Transkript mussten mindestens eine mRNA oder ein EST (*Expressed Sequence Tag*) in den Datenbanken des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) oder UCSC (*University of California, Santa Cruz*) beschrieben sein.
- Es musste eine eindeutige Lokalisation in der *Nob1*-Peak-Region durch die NCBI-Datenbank oder durch die UCSC-Datenbank vorliegen.
- Das Transkript durfte keine Pseudo-RNA sein und für kein ribosomales Protein codieren.

Zusätzlich wurden 38 Gene untersucht, die in einem RNAi-Screening des Wurms *C.elegans* mit einem veränderten Fettgehalt assoziiert wurden (Ashrafi *et al.*, 2003) und die gleichzeitig in einem QTL für verändertes Körpergewicht bei NZO-Mäusen lokalisiert waren.

Als Kontrollgene dienten 217 zufällig ausgewählte Gene aus dem gesamten Mausgenom. Sie wurden vom Max-Planck-Institut für Molekularbiologie (Berlin Dahlem) aus der RZPD-cDNA-Bibliothek (*Mouse UniGene Set RZP2.1*) als cDNA-Klone zur Verfügung gestellt. Einziges Ausschlusskriterium war, dass die Gene nicht in Bereichen lagen, die in anderen Kreuzungsversuchen im Zusammenhang mit verändertem Körpergewicht standen.

Von allen zu untersuchenden Genen wurden mindestens 6 µg DNA mittels zweistufiger PCR hergestellt, lyophilisiert und in Wasser aufgenommen, so dass die Lösungen eine Konzentration von 300 ng/ µl hatten (siehe 2.2.2.6).

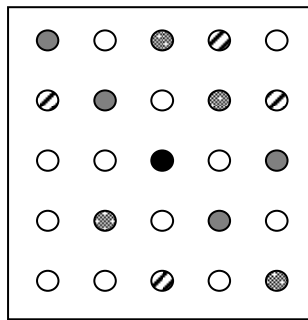
2.2.2.14.2 Aufbringen der DNA auf eine Nylonmembran (*Spotting*)

Das Überführen der DNA-Lösungen (Sonden) auf Nylon-Membranen erfolgte durch den Spotting-Roboter K2 (Kaybee Engineering Limited, Essex, Großbritannien; modifiziert durch Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin-Dahlem). Dazu wurde ein *Gel-Blotting*-Papier (GB004, Schleicher&Schuell) in 0,4 M NaOH getränkt und mittig auf dicke Kunststoffplatten (*slabs*) gelegt. Die Nylon-Membranen (22,2 x 22,2 cm; Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech Europe) wurden beschriftet, ebenfalls in 0,4 M NaOH getränkt und faltenfrei auf die *Blotting*-Papiere aufgelegt. Um eventuelle Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit zu entfernen, wurden die Membranen mit einer sterilen Glaspipette glattgerollt und anschließend in den Roboter gelegt. Aufgrund der Größe der Membranen und der verwendeten Mikrotiterplatten ergaben sich pro Membran 6 Arrays.

Die Sonden wurden in einem 5 x 5-Muster aus vier Mikrotiterplatten (384 Vertiefungen) in Quadruplikaten gespottet, das heißt, dass jede Sonde viermal auf einem Array vorhanden war. Ein positives Signal wurde nur dann in die Auswertung einbezogen, wenn alle vier Spots einer Sonde nach der Hybridisierung ein positives Signal zeigten. So wurden falsch positive Signale ausgeschlossen. Jede Sonde wurde 10 x pro Spot übertragen, so dass genügend DNA für die Hybridisierung auf der Membran vorhanden war (ca. 10 ng).

Als Markierungspunkte für die spätere Analyse und als Kontrolle für eine gleichmäßige Hybridisierung wurde in die Mitte eines jeden 5 x 5-Blocks ein so genannter *Guide dot* gespottet. Dabei handelt es sich um ein DNA-Fragment aus dem Gen *CWLP* von *Arabidopsis thaliana*, das im Mausgenom nicht vorkommt. Jeder Array hatte 384 Blöcke, die aus 25 Spots bestanden – somit eine theoretische Anzahl von 9600 Spots pro Array.

Das 5x5-Muster sah wie folgt aus:



- Zu untersuchendes Gen von Platte 1
- ◌ Zu untersuchendes Gen von Platte 2
- ◌ Gen von der Kontrollplatte
- Guide dot

2.2.2.14.3 Prozessieren der Membranen

Nach dem Spotten der DNA-Sonden wurden die Membranen noch kurz im Roboter belassen, damit die DNA leicht antrocknen konnte. Für eine erfolgreiche Hybridisierung muss die DNA einzelsträngig vorliegen. Zur Denaturierung der Sonden wurden die Membranen mit der DNA-Seite nach oben für 4 min auf zwei in Denaturierungslösung getränkte *Gel-Blotting*-Papiere und anschließend 2 x 2 min auf zwei in Neutralisierungslösung getränkte *Gel-Blotting*-Papiere gelegt. Danach wurden die Membranen getrocknet und die DNA durch UV-Fixierung (0,4 J/cm²) an die Membran gebunden. Die fertigen Arrays wurden bei Raumtemperatur luft- und lichtgeschützt bis zur Hybridisierung aufbewahrt (modifiziert nach Uhde-Stone *et al.*, 2003).

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung: 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7,4

2.2.2.14.4 Herstellung einer radioaktiv markierten cDNA aus Gesamt-RNA

Um Gene zu finden, die mit den gespotteten Sonden auf der Membran interagieren, wurde die mRNA eines Gewebes durch eine reverse Transkription in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde mit α [³³P]-dCTP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig) markiert, um die Interaktion später anhand der β -Strahlung sichtbar zu machen. Für jede Reaktion wurden 10 μ g Gesamt-RNA und 100 μ Ci α [³³P]-dCTP eingesetzt.

Protokoll einer Erststrang-cDNA-Synthese mit α [³³P]-dCTP

Komponente	Finale Konzentration
Gesamt-RNA	10 μ g
oligo (dT) ₂₀ -Primer	1 μ g

→ 5 min 65 °C zum Anlagern der Primer, 2 min auf Eis

Komponente	Finale Konzentration
5 x Puffer	1 x
DTT	4 mM
dATP, dGTP, dTTP	je 0,5 mM
α [³³ P]-dCTP	100 μ Ci
dCTP	2,8 μ M
<i>RNasin</i>	40 units
<i>SuperScriptTM III Reverse Transcriptase</i>	200 units

→ 1,5 h 45 °C inkubieren; 15 min 70 °C zur Denaturierung des Enzyms; plus je 0,5 μ l RNaseH (40 units/ μ l) → 20 min 37 °C inkubieren

Um die cDNA von überschüssigen Nukleotiden und dem Reaktionsgemisch zu befreien, wurde sie mit dem Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Mannheim) wie folgt gereinigt:

- Zugabe von je 50 μ l ddH₂O
- Zugabe von je 75 μ l Bindungspuffer → je 0,75 μ l abnehmen zur Bestimmung der Einbaurrate von α [³³P]-dCTP, 155 μ l auf Säule geben, 1 min stehen lassen, 1 min bei 6000 Upm zentrifugieren, Durchlauf getrennt auffangen
- Zugabe von 2x 300 μ l Waschpuffer, je 1 min bei 6000 Upm zentrifugieren, 2 min bei 13000 Upm leer zentrifugieren
- Ethanol 2 min abdampfen lassen, 2 x 75 μ l warmes ddH₂O (50 °C) zugeben, je 1 min bei 13000 Upm eluieren
- Durchlauf auf dieselbe Säule geben, 1 min stehen lassen, 1 min bei 6000 Upm zentrifugieren
- Zugabe von 2x 300 μ l Waschpuffer, je 1 min bei 6000 Upm zentrifugieren, 2 min bei 13000 Upm leer zentrifugieren
- Ethanol 2 min abdampfen lassen, 50 μ l warmes ddH₂O (50 °C) zugeben, 2 min bei 13000 Upm zentrifugieren; je 1 μ l abnehmen zur Bestimmung der Einbaurrate von α [³³P]-dCTP

Die Einbaurrate von α [³³P]-dCTP wurde mit Hilfe eines Beta-Counters bestimmt. Dieser misst die freiwerdende Lichtenergie, die von Elektronen ausgeht, die durch β -Strahlung angeregt und dadurch auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Dazu wurde jeweils ein Aliquot der Reaktion vor und nach der Reinigung entnommen und mit Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Perkin Elmer) versetzt. Aus der gemessenen Strahlungsintensität (*cpm, counts per minute*) wurde die Einbaurrate in Prozent errechnet. Die Probe wurde nur verwendet, wenn die Einbaurrate über 60 % lag. Zur weiteren Qualitätsüberprüfung der cDNA wurde diese über ein denaturierendes Agarosegel aufgetrennt, um die Länge der entstandenen cDNA-

Moleküle zu bestimmen. Als Größenmarker wurde ein mit α [³²P]-dCTP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig) markierter Lambda DNA/Hind III Größenstandard (Promega, Mannheim) verwendet.

Protokoll für die Markierung des Größenstandards Lambda DNA/Hind III mit α [³²P]-dCTP

Komponente	Finale Konzentration
Lambda DNA/ HindIII	1 μ g
10x Puffer	1 x
dATP, dGTP, dTTP	je 16 μ M
α [³² P]-dCTP	20 μ Ci
Klenow Enzym	10 units

→ 20 min 37 °C inkubieren; 1 μ l EDTA (500 mM, pH 8,0) zum Abstoppen der Reaktion zugeben

Anschließend wurde die Probe zur Entfernung überflüssiger Nukleotide mit dem *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Mannheim) wie oben beschrieben gereinigt.

Für das Blotting der cDNA wurde die Methode von Southern (1975) verwendet. Das Prinzip dieses Blotverfahrens besteht darin, dass gelelektrophoretisch getrennte DNA-Fragmente denaturiert, auf Membranen transferiert und fixiert werden. Während des Transfers der DNA bleiben die Positionen auf dem Gel erhalten, so dass man auf der Membran ein identisches Replikat des Gels erhält. Es wurden keine Nitrozellulosefilter, sondern Nylonmembranen (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech Europe) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Das Gel wurde für 10 min in 2 N HCl gelegt, um die Proteine zu depurinieren. Danach wurde eine Blot-Apparatur aufgebaut (siehe Abb. 2.2) und die cDNA aufgrund von Kapillarkräften über Nacht auf die Nylonmembran transferiert. Am nächsten Tag wurde die Membran luftblasenfrei in Saran-Folie gewickelt. Darauf wurde ein Phosphoimager-Film (PI-Film) gelegt und für mehrere Stunden exponiert. Der Film wurde dann am Phosphoimager eingescannt.

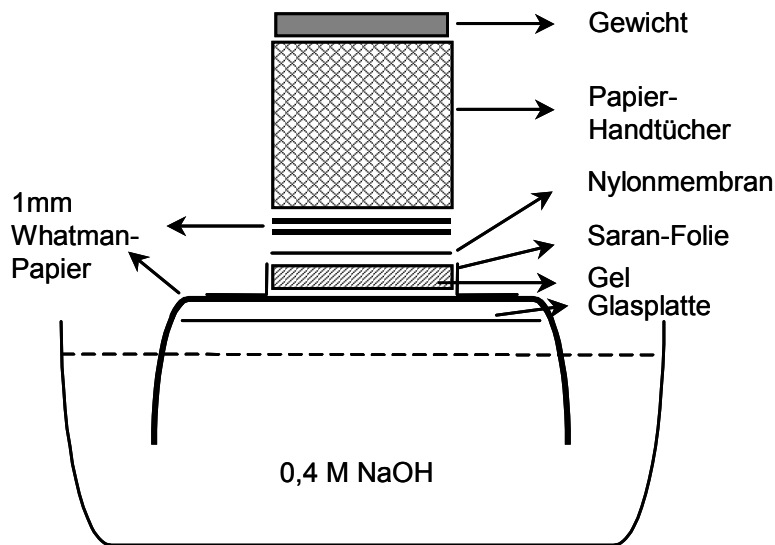


Abb. 2.2: Schematischer Aufbau einer Blot-Apparatur zum Transfer einer gelelektrophoretisch aufgetrennten cDNA auf eine Nylonmembran.

2.2.2.14.5 Radioaktive Markierung des PCR-Produktes Ara179 (*Guide dot*) mit $\alpha[^{33}\text{P}]$ -dCTP

Als Kontrolle für eine gleichmäßige Hybridisierung diente ein PCR-Fragment aus dem Gen *CWLP* von *Arabidopsis thaliana*, das im Mausgenom nicht vorkommt. Dieses wurde mit $\alpha[^{33}\text{P}]$ -dCTP (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig) nach der *Random-Primer-Labeling*-Methode (Feinberg & Vogelstein, 1983) markiert und zum Hybridisierungsmix extra zugegeben.

Protokoll der *CWLP*-Markierung mit $\alpha[^{33}\text{P}]$ -dCTP

Komponente	Finale Konzentration
PCR-Produkt Ara179	100 ng
10x Puffer	1 x
Hexa-Nukleotid- <i>Primer</i>	100 ng

→ 5 min bei 95 °C denaturieren, danach auf Eis stellen

Komponente	Finale Konzentration
dATP, dGTP, dTTP	je 16 μM
$\alpha[^{33}\text{P}]$ -dCTP	10 μCi
Klenow Fragment	10 units

→ 20 min bei 37 °C inkubieren; Zugabe von je 12,5 μM dATP, dGTP, dTTP und dCTP → 5 min bei 37 °C inkubieren; zum Abstoppen der Reaktion 1 μl EDTA (0,5 M, pH 8,0) zugeben

Anschließend wurden überschüssige Nukleotide in den Proben durch Reinigung mit dem *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Mannheim) wie oben beschrieben entfernt und die Einbaurrate bestimmt.

2.2.2.14.6 Hybridisierung der Macroarrays

Verwendete Lösungen:

- Hybridisierungspuffer (100 ml):
 - 60 ml 20 x SSC
 - 10 ml 100 x Denhardt's (2 % BSA, 2 % Polyvinylpyrrolidone, 2 % Ficoll)
 - 1 ml Heringssperma-DNA (10 mg/ ml)
 - 5 ml 10 % SDS (erst zum Schluss nach dem Erwärmen zugeben)
 - 24 ml ddH₂O
- Waschlösung 1: 1 x SSC/ 0,1 % SDS
- Waschlösung 2: 0,3 x SSC/ 0,1 % SDS
- Waschlösung 3: 0,1 x SSC/0,1 % SDS

Standardprotokoll für eine Hybridisierung von cDNA-Macroarrays

- Blot 5 min bei RT in ddH₂O stark schütteln; Achtung: Blot muss überall bedeckt sein!!
- Blot mind. 2 h bei 65 °C in Hybridisierungspuffer inkubieren (8 ml – 15 ml, je nach Größe der Rollflasche) = Prähybridisierung
- Denaturierung der cDNA (Probe, inklusive des Guide dots) 10 min bei 95 °C
- Hybridisierung: Puffer austauschen, gesamte Probe (45-70 Mio. cpm + 0,1-0,2 Mio. cpm *Guide dot*) zugeben, 16 h bei 65 °C hybridisieren
- Waschen (alle Lösungen werden auf 55 °C vorgewärmt)

* 20 min	Waschlösung 1	65 °C	Rollflasche
* 10 min	Waschlösung 2	65 °C	Rollflasche
* 10 min	Waschlösung 3	65 °C	Schale

 - * auf Whatman-Papier lufttrocknen, in Saran-Folie blasenfrei einwickeln
- Exposition: 16 h Phosphoimager-Film, scannen am Phosphoimager Typhoon (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)

2.2.2.14.7. Auswertung der Macroarrays

Die Auswertung der gescannten Filme erfolgte densitometrisch mit der ImageQuant Software (Version 5.2, Molecular Dynamics) Diese Software bestimmt die Pixeldichte der einzelnen Spots und rechnet sie in Zahlen um.

Die Quadruplikate der Gene wurden gemittelt, so dass jedem Gen ein Intensitätswert zugeordnet wurde.

Da die Hybridisierungen der Filter sehr unterschiedlich waren und somit auch die Gesamtintensitäten der Markierung, wurden die Rohdaten auf den Median aller Werte eines Filters normalisiert. Diese normalisierten Werte wurden dann für jeweils eine Bedingung gemittelt (z.B. SJL – 8 Wochen alt – Standard Diät – Braunes Fettgewebe) und die Standardabweichung bestimmt. Pro Bedingung wurden 2-3 Filter hybridisiert.

Als differentiell exprimiert wurden Gene bezeichnet, die folgende Kriterien erfüllten:

- Die normalisierte Intensität musste größer als zwei *Scan*-Einheiten sein (Spots mussten makroskopisch zu sehen sein).
- Die Änderung musste mindestens zweifach sein.
- Der Wert der Änderung musste größer sein als die Summe der Standardabweichung beider untersuchter Bedingungen.

2.2.2.15 Microarray-Methode

Mit DNA-Microarrays kann die Genexpression von mehr als 20 000 Genmodellen auf einmal untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Genexpressionen zwischen den Mausstämmen NZO und SJL auf Chromosom 5 miteinander verglichen.

Es wurden *Gene Chip Mouse Genome 430 2.0* -Microarrays von Affymetrix (Santa Clara, USA) verwendet. Die Qualität der zu untersuchenden RNA wurde durch Kapillarelektrophorese in einem Bioanalytiker (*Agilent Technologies Inc.*, Böblingen) überprüft. Bei der Kapillarelektrophorese dient eine gepufferte Polymerlösung als Matrix, die in eine dünne Kapillare injiziert wird. Durch Anlegen einer Spannung wird die Probe nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Die Trennung erfolgt hier schneller als im Agarosegel.

Die Hybridisierung und Erfassung der Rohdaten der Arrays erfolgte durch die Firma *Signature Diagnostics AG* (Potsdam). Kurz zur Methodik: Die Gesamt-RNA wurde in zwei Schritten in eine doppelsträngige cDNA umgeschrieben und daraus eine Biotin-markierte antisense-cRNA synthetisiert. Mit dieser wurde der Gen-Chip hybridisiert. Es folgte eine Behandlung mit einem *Streptavidin-phycoerythrin biotinylated anti streptavidin* -Antikörper. Nach dem Waschen wurden die Chips mit einem Laser gescannt und die Intensitäten der Interaktionen zwischen den Oligos auf dem Chip und der markierten cRNA mit der Affymetrix *GeneChip® Software* berechnet (Rohdaten). Die Normalisierung und Auswertung der Rohdaten wurde von der Firma *Microdiscovery* (Berlin) durchgeführt. Als differentiell

exprimiert wurden dabei die Gene betrachtet, deren Expressionsunterschied zwischen den zu untersuchenden Bedingungen mehr als zweifach war.

2.2.2.16 Analyse der Genexpression mittels quantitativer Real Time-PCR (qRT-PCR)

Eine weitere Methode der Genexpressionsanalyse ist die qRT-PCR. Mit dieser Methode werden Daten über den Verlauf der PCR erhalten. Dazu bedient man sich verschiedener fluoreszierender Farbstoffe. Die Reaktionen sind durch den so genannten Ct-Wert charakterisiert. Der Ct-Wert ist der Zeitpunkt bzw. der PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz-Intensität der Reaktion größer ist als die Hintergrund-Fluoreszenz. Daraus folgt, je größer die Quantität der Ziel-cDNA in einem Gewebe, desto schneller steigt das fluoreszente Signal und desto niedriger wird der Ct-Wert (Heid *et al.*, 1996). Es wurden zwei unterschiedliche Fluoreszenz-Farbstoffe bzw. Methoden verwendet. Für die Verifizierung der Ergebnisse aus den Macro- und Microarrays wurde die SYBR[®]Green-Methode angewandt. SYBR[®]Green ist ein Farbstoff, der bei 530 nm fluoresziert, wenn er an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet. Diese Bindung ist sequenzunabhängig. Der Farbstoff ist im *Master Mix* enthalten (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Für die Analysen wurden je 10 ng cDNA, 1 mM pro *Primer* und 1x *Master Mix* eingesetzt. Nach dem letzten Zyklus der PCR wird durch Erhitzen auf 95 °C alle DNA denaturiert, bei 55 °C wieder zusammengefügt und durch langsames Erhitzen von 55 °C auf 95 °C erneut denaturiert. Dabei wird in 0,2 °C-Abständen die Fluoreszenz gemessen und als Schmelzkurve dargestellt. Jedes PCR-Produkt hat seine eigene spezifische Schmelzkurve, abhängig von der DNA-Zusammensetzung (Cytosin bzw. Guanosingehalt) und der Länge des PCR-Produktes. Die produktspezifische Schmelztemperatur ist definiert als die Temperatur, bei der die Hälfte der DNA als Doppelstrang und die Hälfte der DNA als Einzelstrang vorliegt.

Die *TaqMan*-qRT-PCR wurde mit 25 ng cDNA und 1 µl Sonde inklusive *Primer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sowie 1x *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix, No AmpErase*[®] *UNG* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Der 1x *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix* enthält 400 µM dATP, dCTP, dGTP, 800 µM dUTP; 0,2 U *UNG* (AmpErase Uracil N-glycosylase) und 1 U *Amplitaq-Gold-DNA-Polymerase*.

Während der PCR-Amplifikation spaltet die *Taq*-Polymerase mit ihrer 5'-nukleolytischen Aktivität die Sonde. Die Emission des 5'-Reporterfluoreszenzfarbstoffs wird nicht mehr durch die räumliche Nähe des 3'-Quencherfluoreszenzfarbstoffs unterdrückt. Somit kann der 5'-Reporterfluoreszenzfarbstoff mittels eines Argon-Lasers angeregt und das emittierte Licht gemessen werden. Die Intensität der Lichtemission ist wiederum direkt proportional zu der Menge des gebildeten PCR-Produkts.

Beide qRT-PCR-Methoden erfolgten in optisch durchlässigen 96-Well-Platten mit optisch durchlässigen Verschlussfolien. Kurz bevor die Platte in das Applied Biosystems 7300 *Real-Time-PCR-System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) eingesetzt wurde, fand eine Zentrifugation für eine Minute bei 1,5 x g statt, damit die gesamte Flüssigkeit am Boden der Wells lag. Ein Dekontaminierungsschritt bei 50 °C für 2 min zum Abbau eventuell vorhandener Uracil-haltiger Amplikons einer vorhergehenden qRT-PCR wurde vorgenommen. Es schloss sich eine initiale Denaturierung für 10 min an, anschließend folgten 40 Zyklen mit je einer Denaturierung für 15 sek bei 95 °C und einem kombinierten Annealing- und Extensionsschritt für 1 min bei 60 °C, entsprechend der Empfehlung von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Die Bestimmung aller qRT-PCR-Werte eines cDNA-Templates erfolgte in Duplikaten/ Triplikaten, um Pipettierungenauigkeiten zu minimieren. Alle Experimente wurden außerdem mit cDNAs von mindestens drei Tieren durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Pfaffl *et al.*, 2001). Als endogene Kontrollgene dienten entweder beta-Aktin oder 18S-RNA.

3 ERGEBNISSE

3.1 Zucht und phänotypische Charakterisierung der Versuchstiere

Um Kandidatengene für *Nob1* zu identifizieren, wurden Expressionsstudien mit RNA aus Geweben der Parentalstämme SJL und NZO durchgeführt. Für diese Analysen wurden männliche und weibliche NZO- und SJL-Mäuse verwendet. Sie wurden unter Standardbedingungen gehalten (siehe 2.2.1) und über einen Zeitraum von zwölf Wochen phänotypisch charakterisiert. Die verabreichten Diäten waren wie folgt zusammengesetzt:

- Standard-Diät (SD): 48 % Kohlenhydrate, 22,5 % Proteine, 5 % Fett (Sojaöl)
- Hochfett-Diät (HFD): 46,8 % Kohlenhydrate, 17,1 % Proteine, 16 % Fett (Sojaöl)

Wie in Tab. 3.1 gezeigt, waren NZO-Mäuse suszeptibel für eine Gewichtszunahme bei Fütterung einer HFD. SJL-Mäuse dagegen waren resistent gegenüber einer diätbedingten Gewichtszunahme. Der Gewichtsunterschied zwischen SD- und HFD-gefütterten Tieren betrug bei NZO-Weibchen ca. 18 g, bei SJL-Weibchen dagegen ca. 1 g. Weibliche NZO-Tiere nahmen in acht Wochen ca. 35 g zu, die vor allem auf eine Zunahme des Fettanteils (ca. 27 g) zurückzuführen waren, während SJL-Weibchen im gleichen Zeitraum nur etwa 5 g zunahmen.

Tab. 3.1: Phänotypische Charakterisierung der Versuchstiere für die Arrayexperimente. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) für die Körpergewichte (KG), Fettgehalte und Muskelmasse der NZO- und SJL-Mäuse bei Fütterung einer (A) Standard-Diät bzw. (B) Hochfett-Diät. [n] – Tierzahl

A Standard-Diät

Mauslinie	Geschlecht	Lebenswoche	KG (g)			Fett (g)			Muskel (g)		
			4	8	12	4	8	12	4	8	12
NZO	♀	MW	19,4	31,9	38,8	3,5	10,0	14,8	14,8	20,9	23,5
		SD	3,5	3,5	1,9	1,1	2,5	3,0	2,1	1,9	0,9
		[n]	19	16	8	19	16	8	19	16	8
SJL	♀	MW	13,9	18,2	19,0	1,2	2,1	2,0	11,3	14,0	14,9
		SD	1,5	1,2	1,4	0,3	0,5	0,6	2,0	0,8	0,9
		[n]	15	15	7	15	15	7	15	15	7
SJL	♂	MW	12,5	17,4	18,1	1,0	1,5	1,7	12,0	15,7	18,4
		SD	3,0	1,8	1,8	0,2	0,3	0,4	3,0	3,6	0,6
		[n]	13	8	8	13	8	8	13	8	8

B Hochfett-Diät

Mauslinie	Geschlecht	Lebenswoche	KG (g)			Fett (g)			Muskel (g)		
			4	8	12	4	8	12	4	8	12
NZO	♀	MW	21,6	40,6	56,5	4,6	18,5	31,3	15,9	23,5	28,8
		SD	1,7	4,4	3,5	0,7	4,6	3,4	1,1	2,2	1,7
		[n]	17	13	5	17	13	5	17	13	5
NZO	♂	MW	23,0	30,7	38,4	5,1	7,4	10,9	17,5	28,1	31,3
		SD	5,1	5,7	2,0	1,5	2,4	2,9	5,1	3,3	1,0
		[n]	13	9	3	13	9	3	13	9	3
SJL	♀	MW	14,4	18,3	20,1	1,6	2,2	2,8	11,3	14,2	15,4
		SD	0,8	0,8	1,4	0,4	0,4	0,9	1,2	0,4	0,8
		[n]	15	10	5	15	10	5	15	10	5
SJL	♂	MW	15,0	18,8	20,1	1,4	1,8	1,8	12,4	17,5	19,0
		SD	1,8	0,9	0,7	0,4	0,6	1,0	1,5	0,6	0,8
		[n]	14	9	9	14	9	9	14	9	9

3.2 Auswahl der Transkripte des *Nob1* für die Herstellung des Macroarray

Zur Bestimmung von Expressionsprofilen wurden Macroarrays hergestellt, mit denen die Expression einzelner Transkripte im kritischen Bereich des QTL analysiert wurde. Der relevante Bereich wurde auf einen *LOD-score*-Wert $> 3,3$ begrenzt und umfasst ca. 64 Mbp (29-93 Mbp). Zu Beginn dieser Arbeit waren in diesem Bereich insgesamt ca. 700 Genmodelle zugeordnet (NCBI, *Build 30.1*, 2003).

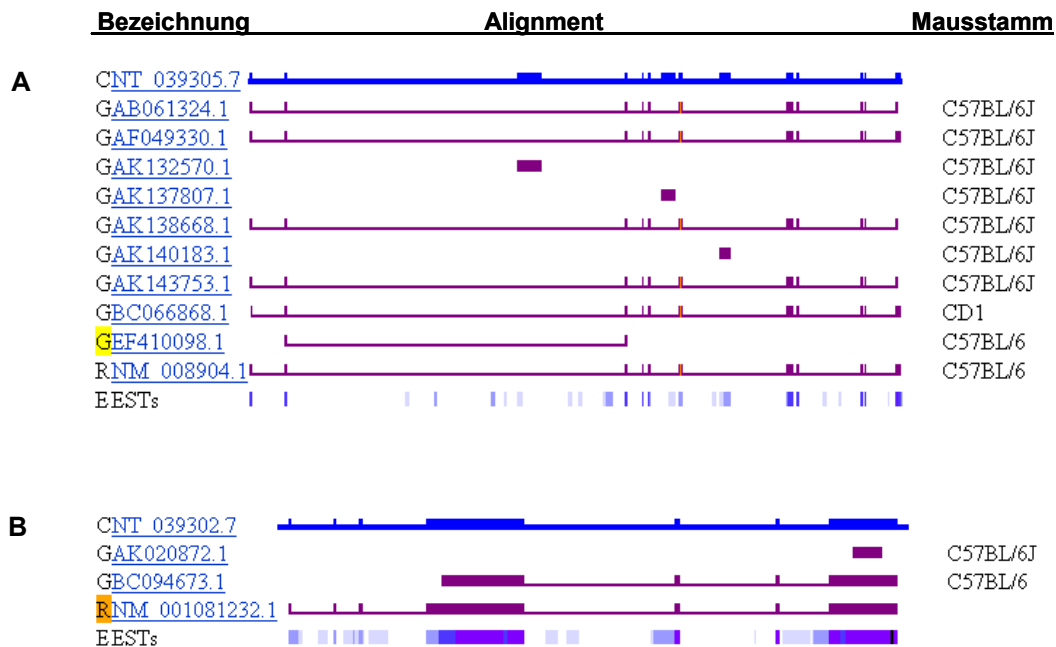
- *RefSeq*-Modelle: zumeist experimentell validierte Genmodelle, die durch beschriebene mRNAs und *Expressed Sequence Tags* (ESTs, 500 bis 800 bp-lange Nukleotidsequenzen einer transkribierten mRNA) unterstützt werden. Die *RefSeq*-Sequenz eines Transkriptes ist dabei die wahrscheinlichste Sequenz der mRNA, die alle zugeordneten ESTs und mRNAs berücksichtigt. Ihre Sequenz-Identitätsnummer beginnt meist mit den Buchstaben NM_[Nr.].
- „LOC“-Modelle: vorhergesagte Genmodelle, für die keine orthologen Gene in anderen Spezies bekannt sind (Kriterien laut NCBI). Die bioinformatisch bestimmte Sequenz beginnt mit den Buchstaben XM_[Nr.].

Jedes im QTL-Bereich lokalisierte Genmodell wurde bioinformatisch auf eine mögliche Expression geprüft. Das wichtigste Kriterium war dabei die Anzahl der zugehörigen mRNAs und ESTs. Für die Expressionsanalysen wurden neben bekannten Genen (mit beschriebenem Protein) hauptsächlich *RefSeq*-Modelle ausgewählt. Zusätzlich wurden solche Genmodelle einbezogen, für die mehrere ESTs oder mindestens eine mRNA in der Gendatenbank angegeben waren (*evidence viewer*, NCBI). Viele „LOC“-Modelle, für die das nicht der Fall war, wurden nicht analysiert sowie Pseudogene und Gene, die für ribosomale RNAs codierten, wurden ausgeschlossen (Σ etwa 200 Genmodelle).

Innerhalb der letzten Jahre wurden große Bereiche des Mausgenoms sequenziert, Mausgene identifiziert und ihre Funktion analysiert. Das führte zu einer ständigen Aktualisierung der Gendatenbanken, so dass sich die ursprüngliche Anzahl der Genmodelle von etwa 700 (NCBI, *Build 30.1*, 2003) auf etwa 500 reduzierte (NCBI, *Build 36.1*, 2006). Während der bioinformatischen Analyse der Genmodelle ließ sich feststellen, dass vornehmlich die „LOC“-Modelle mit zunehmenden Sequenzinformationen in den Datenbanken mehrmals revidiert wurden. Hierbei handelte es sich zum Einen um neue lokale Zuordnungen innerhalb des Chromosoms 5 oder auf andere Chromosomen und zum Anderen um neu berechnete oder neue experimentell identifizierte Genmodelle, in die die vorhergesagten LOC-Modelle integriert wurden.

Nach der bioinformatischen Analyse der Genmodelle wurde mit Hilfe der BLAST- und der BLAT-Software überprüft, ob homologe Abschnitte im Genom zu finden waren oder ob es Bereiche innerhalb der Sequenz gab, die im Genom mehrfach auftraten. Dies geschah, um die Spezifität zu erhöhen und repetitive Sequenzen in DNA-Sonden zu verhindern. Konnte

kein spezifischer Bereich identifiziert werden, wurde das betreffende Modell ausgeschlossen (z.B. LOC100039117). Durch die angelegten Kriterien reduzierte sich die Zahl der zu analysierenden *Nob1*-Transkripte von etwa 500 auf 302 (siehe Tab. A1 im Anhang).



Legende

- Genomic sequence (C)
- model exons, single (M)
- mRNA exons, single (G, R)
- model exons, overlapping (M)
- mRNA exons, overlapping (G, R)
- C = contig; M = model mRNA; R = RefSeq mRNA; G = GenBank mRNA
- R = new since last genome build; R = updated since last genome build

EST-Häufigkeit

- 1 EST
- 2-5 ESTs
- 6-20 ESTs
- 21-99 ESTs
- >100 ESTs

Abb. 3.1: Darstellung der evidence viewer von zwei ausgewählten Transkriptionsmodellen innerhalb des *Nob1*. Der evidence viewer (NCBI) gibt einen Überblick der bekannten ESTs und mRNAs für ein Transkript und lässt Schlussfolgerungen über eine mögliche Expression dieses Modells zu. In den gezeigten Fällen (A) *Ppargc1a* und (B) *D5Erttd579e* deutet die Anzahl der ESTs und mRNA-Sequenzen auf ein exprimiertes Gen hin. Von beiden Genmodellen wurden Sonden für die Expressionsstudien durch Macroarrays hergestellt.

3.2.1 Auswahl von weiteren Kandidatengenen außerhalb des QTL *Nob1*

In einem genomweiten *Screening* mit Hilfe der RNAi-Technik wurden bei dem Fadenwurm *C. elegans* 417 Gene identifiziert, deren Ausschalten eine erniedrigte bzw. erhöhte Fetteinlagerung zur Folge hatte (Ashrafi *et al.*, 2003). Annette Schürmann und Hadi Al-Hasani identifizierten 38 orthologe Mausgene, die einem bekannten Adipositas-QTL bei NZO-Mäusen

zugeordnet waren (Tab. 3.2). Diese Gene wurden ebenfalls mit Hilfe der Macroarrays auf Expressionsunterschiede zwischen NZO- und SJL-Mäusen untersucht.

Tab. 3.2: Kandidatengene aus einem genomweiten RNAi-Screening nach Genen, die den Fettgehalt beim Fadenwurm *C. elegans* beeinflussen. Gezeigt sind orthologe Mausgene, die einem Adipositas-QTL zugeordnet werden konnten. Chr. – Chromosom; Pos (Bp) – genomische Position in Basenpaaren; A – Plum, unveröffentlichte Daten; B – Taylor *et al.*, 2001; C – Leiter *et al.*, 1998; D – Reifsnnyder *et al.*, 2000; E – Giesen *et al.*, 2003

<i>C. elegans</i> Symbol	<i>M. musculus</i>					
	Symbol	Entrez Gene ID	Chr.	Pos (Bp)	NZO-QTL	Referenz
T19D2.2	<i>Ptp4a1</i>	19243	1	30894290	Nzoq1	D
TAG-172	<i>clk1</i>	12747	1	58368549	Nzoq1, Obq7	B, D
C36A4.5	<i>Prg4</i>	96875	1	64325891	Nzoq1	D
F11C1.6	<i>Nr5a2</i>	26424	1	138776858	Obq8	B
C46H11.2	<i>Fmo3</i>	14262	1	164821165	Obq9	B
C24A11.9	<i>Pdss1</i>	56075	2	22747278	D2Mit235/NZO	A
C09G9.7	<i>Pax8</i>	18510	2	24297574	D2Mit235/NZO	A
C18H9.7	<i>Rapsn</i>	19400	2	90836477	Obq10	B
T14B1.1	<i>Trim44</i>	80985	2	102201738	Obq10	B
F56H11.6	<i>Ttbk2</i>	140810	2	120542044	Obq10	B
F46G11.3	<i>Bmp2k</i>	140780	5	97237990	D5Mit81	D
C13D9.7	<i>Slc24a6</i>	170756	5	120771808	Chol1/NZO	E
Y49E10.20	<i>Scarb1</i>	20778	5	125630052	Chol1/NZO	E
B0280.3	<i>Rpia</i>	19895	6	70721733	Obq13	B
Y37A1A.1	<i>Setmar</i>	74729	6	108030821	Obq14	B
Y57A10B.1	<i>March8</i>	71779	6	116303741	Obq14	B
ZK909.3	<i>Hddc3</i>	68695	7	80216649	Obq15	B
K02D3.2	<i>Stard5</i>	170460	7	83508201	Obq15	B
F56F3.4	<i>Zfand6</i>	65098	7	84555535	Obq15	B
T07C12.5	<i>Tyr</i>	22173	7	87369171	Obq15	B
Y11D7A.9	<i>Frag1</i>	233575	7	102096894	D7Mit220/NZO	A
Y6B3B.10	<i>Lass1</i>	93898	8	73244775	D8Mit008/SJL	A
VF13D12L.1	<i>Isyna1</i>	71780	8	73523469	D8Mit008/SJL	A
F52H2.2	<i>Slc7a5</i>	20539	8	124802592	D8Mit013/NZO	A
B0310.1	<i>Kcnk1</i>	16525	8	128881259	D8Mit013/NZO	A
F46C5.6	<i>Ppp4r4</i>	74521	12	104770775	Nzoq2	D
8 F16B4.9	<i>Ppara</i>	19013	15	85563541	D15Mit241/NZO	A
B0285.8	<i>chkb</i>	12651	15	89257665	D15Mit241/NZO	A
Y38F1A.9	<i>Cntn1</i>	12805	15	91956371	D15Mit241/NZO	A
Y53C12A.1	<i>Pkmyt1</i>	268930	17	23454062	Obq4b	B
F49E11.4	<i>Pi16</i>	74116	17	29046244	D17Mit175/NZO	A
F45H7.4	<i>Pim1</i>	18712	17	29217823	D17Mit175/NZO	A
F39D8.2	<i>Pknx1</i>	18771	17	31312405	D17Mit175/NZO	A
C17E4.3	<i>March2</i>	224703	17	33325384	D17Mit175/NZO	A
F14H8.1	<i>Osbpl1a</i>	64291	18	13084888	D18Mit60	D
K03B8.3	<i>Mep1b</i>	17288	18	21215353	D18Mit60	D
F14D12.2	<i>Lims2</i>	225341	18	32074516	D18Mit60	D
ZK686.4	<i>Zmat2</i>	66492	18	36919896	D18Mit60	D

3.2.2 Auswahl von Kontrollsonden

Mit den gewählten Kontrollen sollte die Effizienz und Qualität der Hybridisierungen der Macroarrays evaluiert werden können (Tab. 3.3 und Tab. A2 im Anhang). Die Kontrollsonden wurden aufgrund verschiedener Eigenschaften ausgewählt: (1) Gene, deren Expression sich zwischen verschiedenen Mausstämmen und unterschiedlichen Geweben nicht oder kaum verändert (= *housekeeping gene*); (2) Gene, die gewebsspezifisch exprimiert werden; (3) Gene des Lipid- und Glucose-Metabolismus; (4) zufällig ausgewählte *Unigene*-Transkripte aus der RZPD-cDNA-Bibliothek *Mouse unigene Set 2*, die über das gesamte Genom verteilt waren. Da diese Transkripte aus einer cDNA-Bibliothek stammen, kann davon ausgegangen werden, dass sie exprimiert werden und dienen deshalb der Kontrolle der Hybridisierung. Für die Auswahl galten dieselben Kriterien wie für die Auswahl der *Nob1*-Kandidatengene (siehe 3.2).

Tab. 3.3: Ausgewählte Kontrollsonden für die Macroarrays. Gezeigt sind die Kontrollsonden der Gruppen (1) – (3) und ihre Funktion. Chr. – Chromosom; Pos (Bp) – genomische Position in Basenpaaren

Symbol	Entrez Gene ID	Chr.	Pos (Bp)	Funktion
<i>Adipor1</i>	72674	1	136231877	Fett-Metabolismus
<i>H3f3a</i>	15078	1	182650277	<i>housekeeping</i> Gen
<i>Crat</i>	12908	2	30237756	β-Oxidation
<i>Pck1</i>	18534	2	172796011	Fett-Metabolismus, Gluconeogenese
<i>Cpt2</i>	12896	4	107421465	Fettsäuretransport
<i>Slc4a2</i>	20535	5	23935383	gewebsspezifische Expression
<i>Slc4a4</i>	54403	5	90009307	gewebsspezifische Expression
<i>Acacb</i>	100705	5	114426516	Fettsäuresynthese
<i>Gapdh</i>	407972	6	125131222	<i>housekeeping</i> Gen
<i>Canx</i>	12330	11	50169013	Prozessierung von Antigenen
<i>Arf1</i>	11840	11	59044380	<i>housekeeping</i> Gen
<i>Sreb1</i>	20787	11	60036798	Cholesterin-Metabolismus, Transkriptionsfaktor
<i>Acaca</i>	107476	11	84011658	Fettsäuresynthese
<i>Fasn</i>	14104	11	120640331	Fettsäuresynthese
<i>Cpt1b</i>	12895	15	89253113	Fettsäuretransport (langkettig)
<i>Pcx</i>	18563	19	4594345	Pyruvat-Metabolismus, Citratcyclus
<i>Scd1</i>	20249	19	44460863	Fettsäuresynthese

3.3 Expressionsanalysen

Um mögliche Genvarianten zu identifizieren, die den Gewichtseffekt des *Nob1*-Allels hervorrufen, wurden die zuvor ausgewählten 302 *Nob1*-Transkripte mit Hilfe von Macroarrays auf Expressionsunterschiede zwischen NZO und SJL untersucht.

3.3.1 Design und Herstellung der Sonden

Als Sonden dienten PCR-Produkte mit einer Größe von 300-500 bp, da die PCR-Produkte spezifisch aber nicht zu lang sein sollten, um eine optimale Amplifikationsmenge zu erreichen. Dazu wurden in den cDNA-Sequenzen Exone mit einer Länge größer als 300 bp gesucht (BLAT-Software). Waren keine entsprechend langen Exone vorhanden, dienten die gesamten cDNA-Sequenzen als Vorlage für das Primerdesign. Dieses erfolgte mit Hilfe der *Primer3*-Software (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Eine Überprüfung der so entstandenen PCR-Produkt-Sequenzen auf Sequenzhomologien im gesamten Genom erfolgte erneut mit Hilfe der BLAST-Software. Ein Beispiel ist anhand des Gens *Ttbk1* in Abb. 3.2 dargestellt.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte von ca. 3 % aller Sonden (*Whsc1*, *Msx1*, *Cxcl10*, *CD38*, *A730089K16Rik*, *9030227G01Rik*, *Cdkl2*, *2310045A20Rik*, *C530008M17Rik*, *Cxcl9*, *Brdg1-pending*) zeigte, dass die gewünschten PCR-Produkte amplifiziert wurden und damit auch die Primerspezifität.

3.3.2 Präparative PCR

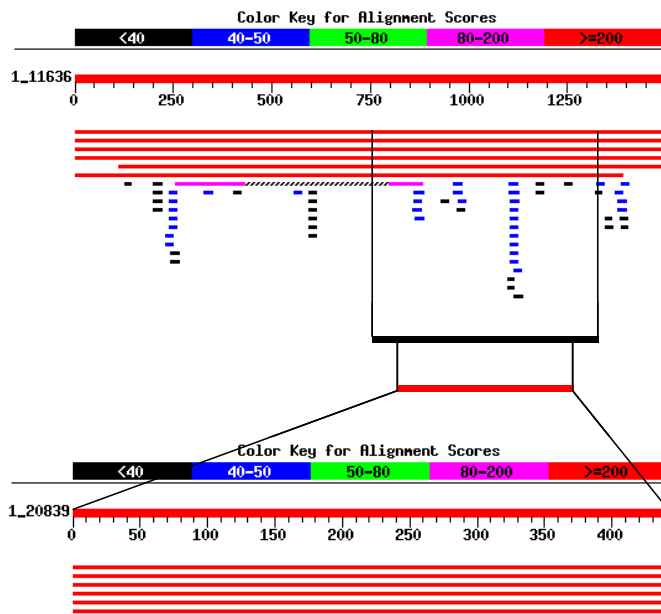
Die DNA-Sonden wurden mit Hilfe der PCR-Technik hergestellt. Als Matrize (*Template*) für die DNA-Sonden sollte genomische DNA von C57BL/6J-Mäusen verwendet werden bzw. einzelsträngige cDNA (C57BL/6J-Mäuse), die durch reverse Transkription von mRNA entstand. Für die Sonden, die als cDNA-Klone von der RZPD-cDNA-Bibliothek *Mouse unigene Set 2* bezogen wurden, diente Plasmid-DNA als *Template* (Tab. 3.4). Einige der Sonden, deren *Template* genomische DNA war, zeigten eine geringe PCR-Ausbeute (19 %). Diese PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer TA-Klonierung in einen Sequenzierungsvektor eingebracht und anschließend mit Hilfe der jeweiligen Sequenzier-Primer amplifiziert (Abb. 3.3). Durch die Anwendung dieser Klonierungsmethode konnte die PCR-Ausbeute um das drei- bis vierfache gesteigert werden. Es gab nur zwei Transkripte der insgesamt 340 Kandidatengene, die sich weder mit Hilfe der Klonierungstechnik noch durch die Nutzung eines zweiten Primerpaares in ausreichender Menge amplifizieren ließen (*Gm1676*, *BC061212*).

Tab. 3.4: Nutzung unterschiedlicher *Templates* zur Herstellung der DNA-Sonden für die Macroarrays.

<i>Template</i>	Anzahl der Sonden
Genomische DNA gesamt	201
- davon kloniert	38
cDNA	46
RZPD-Unigene-cDNA-Klone <i>Nob1</i>	112
RZPD-Unigene-cDNA-Klone Kontrollen	217

>gi|18201864|ref|NM_080788.1| Mus musculus tau tubulin kinase 1 (Ttbk1), mRNA

```
GGGGATGGGCGGGTGGGGGCCCGCTGCTGAGCGGTGACTCCCTGCCGGTGCGGACCTGAGCTAGACCCCTCGTCCTCCGTC
AGARATCCTGCGTCCCGCGGGCCAGGTTAAATGGAATCCACCTTGGGAAGCTAGATGCCTGTGATAGCTGTTTGACCTCAT
CAGGGTTTTGCAATGAGTGGAGGAGGAGAGCAGCCAGATATCCCTCAGTGTGGAATCCTGGTCAAAGAAAGATGGAAGTGTAA
GAAAGATTGGAGGTGGGGCTTTGGAGAAATTTACGATGCCTTGGACATGCTCACAGGGGAGAATGTGGCGCTGAAGTGGAGTC
AGCTCAGCAGCCAAAGCAGGTTCTGAAGATGGAGGTGCTGTGTTGAAGAACTGCAAGGGAAAGACCATGTTGTAGATTTAT
GGCTGTGGGAGAAATGATCCTTTCACTACGTGGTTCATGCAATGTCAGGGACGGAATCTGGCAGATCTCCGACGTAGCCAATCCC
GGGACACATTCACTATTAGCACCCTTCGCTCTGGGAAACAGATTCTGGAGTCTATTGAAAGCATACTTCTGTGGGATTCTCT
TCACAGAGACATCAAACCGTCAAACCTTCGCCATGGGACGTTTCCCCAGTACGTGTAGGAAATGTTTCATGCTGATTTTGGCTTG
GCTCGACAATTTACTAATTCCTGTGGTGACGTGACGCCACCTCGTGTGCTGTGGCAGGCTTTCGAGGGACAGTTCGTTGTGCATCAA
TCGATGCTCATCGAACAGGAAATGGGAAGACATGATGACCTTTGGTCTTTATTTCTACATGTGGTGGAGTTTGTGGTTGGCCA
ACTGCCTGGAGAGAAATAAAGGACAAGGAGCAAGTAGGCTCCATTAAGGAGAGATATGACCACAGGCTCATGTTAAAAACACCTC
CCTCCAGAATTCAGCACCTTTCTTGACCATAATTTCTCTTTGGATTTATTTACAAAACCGGACTACCAGCTTCTAACATCCGCTGT
TTGACAATAGCATCAAGACCTTTGGAGTAATTGAGAGTGACCCGTTTACTGGGAGAAGAGTGGAACTGATGGTCCCTGACAAC
CACCACCCTCTGCCACCCTCAGTGCACACCCTTGACCCCTGCTGCTATCGGAATTGCAAAATGCCACCCCATCCAGGAG
ACTTGTCTCGAGAAATCACAGATGAAGTGTTTCCAGATGAACAGCTTAGTGATGGGAGAATGGAATCCCTGTGGTGTATCAC
CAGATAAATTCCTGGTATCTCTGGGGACCCAGCCCTCAGGAAAAGGATGCTGGGAAGAGATGGATATCAACAAAGAACAAAGA
TAAAGCTGGGAATTTGCAAAGCAGCTACTGAAGAAGAAATAGCCATGGTCAAGTAAATGGCATACTCAATGCTCAAGCCCTGG
TTCACCAATTCGTGCCATCAGAGATTACTCAGCCAGACAGAGATGTAG
```



Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
ref NM_080788.1 Mus musculus tau tubulin kinase 1 (Ttbk1),...	878	0.0
dbj AB046593.2 Mus musculus Ttbk mRNA for Tau-tubulin kina...	878	0.0
ref XM_147298.1 Mus musculus hypothetical gene supported b...	823	0.0
dbj AK053820.1 Mus musculus 0 day neonate eyeball cDNA, RI...	823	0.0
dbj AK077011.1 Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN ...	823	0.0
dbj AK046978.1 Mus musculus 10 days neonate cerebellum cDN...	823	0.0

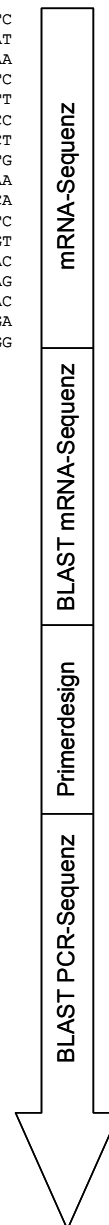


Abb. 3.2: Flussschema des Designs genspezifischer Primer für PCR-Produkte am Beispiel des Gens *Ttbk1*. Mit Hilfe der BLAST-Software erfolgte eine Überprüfung der mRNA-Sequenz aus der NCBI-Genbank auf Sequenzhomologien im gesamten Genom. Für das Design der Primer (*Primer3*-Software) wurde ein Bereich gewählt, der keine oder sehr wenige Homologien zu anderen Genen aufwies (> 300 bp). Die Basensequenz des elektronischen PCR-Produktes wurde erneut auf Homologien zu anderen Genen im gesamten Genom untersucht (BLAST-Software).

Um eine ausreichende Anzahl an Macroarrays zur Verfügung zu haben (ca. 80 Nylon-Filter), sollte eine finale DNA-Menge von 3-10 µg pro Sonde amplifiziert werden. Um diese DNA-Menge herzustellen, wurde eine präparative PCR durchgeführt. Dazu diente die erste PCR als *Template* für die zweite PCR, eine sogenannte Reamplifizierungs-PCR. Mit dieser Methode wird eine höhere DNA-Ausbeute erreicht. Das Gesamt-PCR-Volumen lag – je nach Effizienz

der PCR-Reaktionen – zwischen 200 µl und 400 µl. Eine besonders hohe DNA-Ausbeute bei der Reinigung aus der PCR-Reaktion mit Hilfe von Säulenchromatographie wurde durch eine doppelte Elution der DNA mit warmem doppelt destilliertem Wasser (50 °C) erreicht. Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Sonden erfolgte densitometrisch im Ethidiumbromid-Agarosegel (Abb. 3.3).

Durch die angewandte Reamplifizierungsmethode wurde eine hohe DNA-Ausbeute erreicht. Für den größten Teil der Sonden wurde eine gesamte DNA-Menge von 3-15 µg erreicht, für 18 % der Sonden sogar mehr als 16 µg DNA.

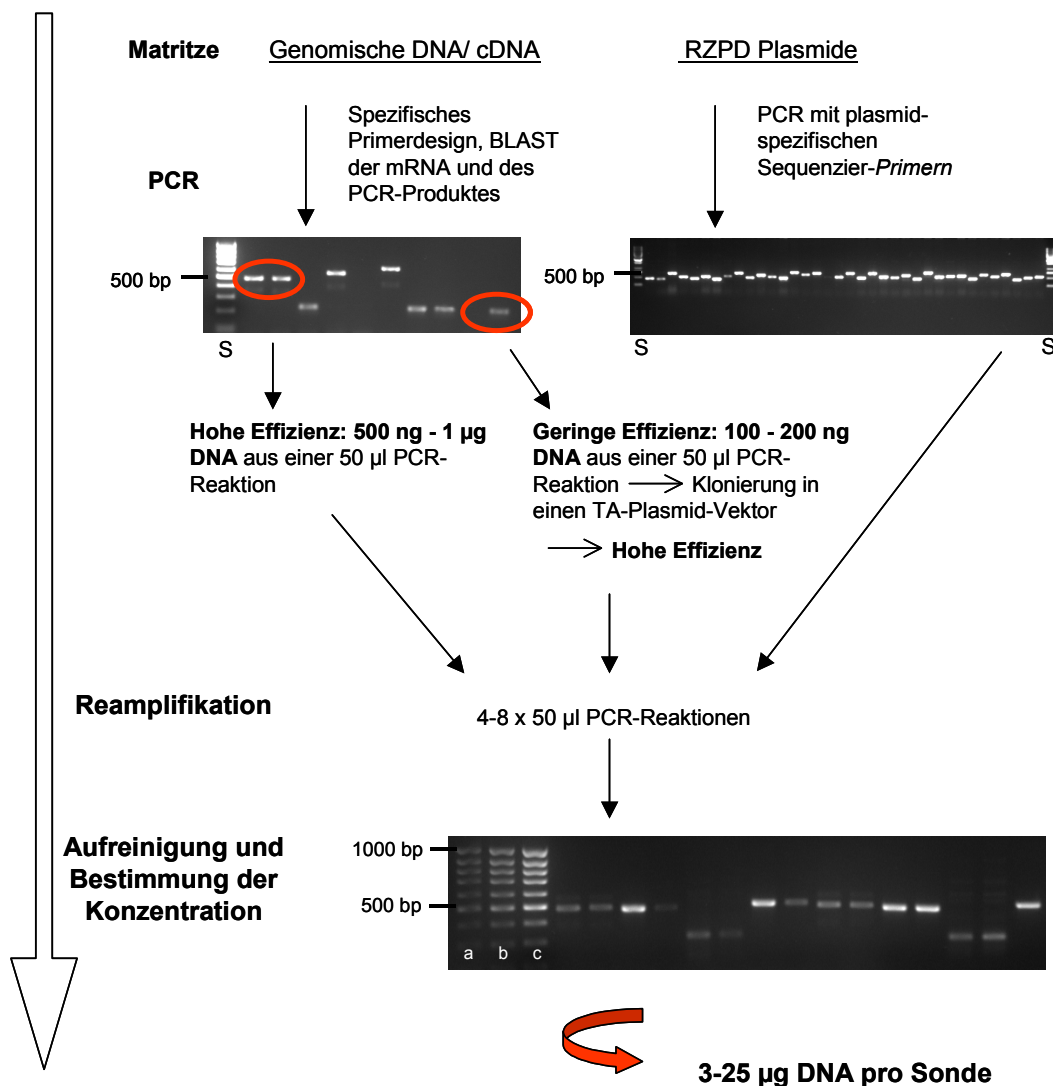


Abb. 3.3: Strategie zur Amplifikation von DNA-Sonden für die Herstellung von Macroarrays. Nach der ersten PCR wurde ein Aliquot der Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Qualität und Quantität zu überprüfen (S = Größenstandard). PCR-Produkte mit starker Bande (hohe Effizienz) wurden direkt in die Reamplifizierungs-PCR eingesetzt, solche mit schwacher Bande (geringe Effizienz) wurden erst in einen Plasmidvektor eingebracht und anschließend reamplifiziert. Die Konzentration der aufgereinigten PCR-Reaktionen wurde mit drei unterschiedlichen Mengen des *MassRulers* (a, b, c) durch lineare Regression mit der Software ImageQuant bestimmt. Dabei entsprachen die Pixel-Intensitäten der 500 bp-Bande von a) 2,5 µl; b) 5 µl und c) 10 µl den DNA-Mengen von a) 25 ng; b) 50 ng und c) 100 ng.

3.3.3 Herstellung der Filter

Für die Herstellung der Filter wurde die doppelsträngige DNA durch ein alkalisches Milieu denaturiert. Dies war notwendig, um später die einzelsträngige radioaktiv markierte cDNA binden zu können. Jede Sonde wurde durch einen Roboter vierfach auf den Filter gespottet, so dass für die Auswertung vier Einzelwerte zur Verfügung standen. Dieser Prozess wurde am MPI für Molekulare Genetik (Berlin) in Zusammenarbeit mit Claus Hultschig durchgeführt (siehe 2.2.2.14.2 und 2.2.2.14.3).

3.3.4 cDNA-Synthese und Hybridisierung der Macroarrays

Die Hybridisierung der Macroarrays erfolgte mit revers transkribierter mRNA aus Geweben von SJL- und NZO-Mäusen. Es wurden acht Wochen alte Weibchen verwendet, denen nach dem Absetzen von der Mutter über einen Zeitraum von 5 Wochen entweder Standard-Diät oder Hochfett-Diät verabreicht wurde. Während der reversen Transkription, die mit *Oligo-dT-Primern* erfolgte, wurde in die entstehende einzelsträngige cDNA das radioaktiv markierte Nukleotid α [³³P]-dCTP (200 μ Ci/ Reaktion) eingebaut.

Die erfolgreiche Hybridisierung der Arrays setzt eine Einbaurate des radioaktiv markierten Nukleotids in die cDNA von mind. 50 % voraus. Dies wurde durch den Einsatz von zusätzlichem nicht markiertem dCTP und durch die Modifizierung des Reinigungsprotokolls erreicht. Der erste Durchlauf des Reaktionsgemisches, der eigentlich nur Reaktionspuffer, Enzym und nicht eingebaute Nukleotide enthalten sollte, wurde aufbewahrt und nach der ersten Elution nochmals auf die Reinigungssäule (Säulenchromatographie) gegeben. Die Elution der radioaktiv markierten cDNA nach dieser zweiten Bindung an die Silica-Matrix der Säule erfolgte zweimal mit warmem destilliertem Wasser (50 °C). Durch diese Modifizierungen erhöhte sich die Ausbeute von 25 % auf 60-70 %. Zusätzlich ist es für die Hybridisierung des gesamten Filters immens wichtig, dass die revers transkribierten cDNAs aus Gesamt-mRNAs Längen bis zu 1500 bp erreichen, weil einige DNA-Sonden bis zu 1500 bp vom 3'-Ende der mRNA entfernt lagen. Dies wurde mit Hilfe von denaturierenden cDNA-Gelen überprüft. Das Gel wurde auf einen Nylonfilter geblottet und die Länge der cDNAs mit Hilfe eines radioaktiv markierten Größenstandards bestimmt (Abb. 3.4).

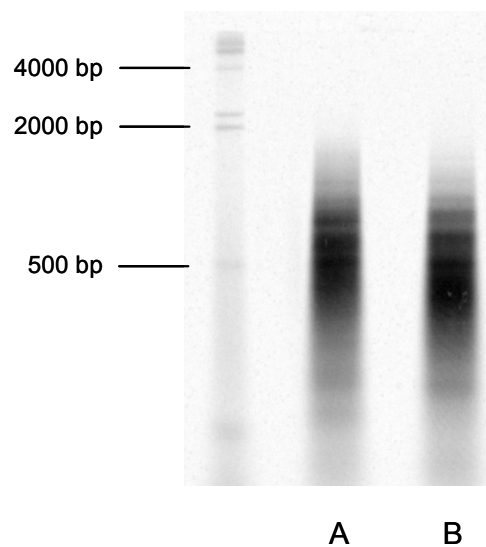


Abb. 3.4: Denaturierendes Agarosegel zur Bestimmung der Länge von revers transkribierten cDNAs. Die mit $\alpha[^{33}\text{P}]$ -dCTP markierten cDNAs wurden nach der Methode von Southern auf eine Nylonmembran geblottet, auf einen Phosphoimager-Film exponiert und mit einem Phosphoimager gescannt. Zu sehen sind cDNAs aus GesamtmRNAs von (A) Leber, SJL weiblich, 8 Wochen, SD und (B) Leber, NZO weiblich, 8 Wochen, SD. Beide cDNA-Gemische enthalten cDNAs, die bis zu 1500 bp lang sind und eignen sich daher zur Hybridisierung der Macroarrays.

Die Hybridisierung der Filter mit der radioaktiv markierten cDNA über Nacht und das Waschen der Arrays am nächsten Morgen erfolgten nach einem Standard-Protokoll (siehe 2.2.2.14.6). Nach einer 16-stündigen Exposition der Arrays auf einem Phosphorimager-Film (PI-Screen) wurde dieser auf einem Phosphorimager gescannt (*Image*). Dabei spiegelt die Intensität der β -Strahlung eines Spots die Menge an gebundener markierter cDNA und somit an exprimierter mRNA wieder. Die Pixelintensität jedes Spots wurde mit Hilfe der *ImageQuant*-Software bestimmt. Zur Überprüfung der Qualität des Spottens und der Hybridisierung der Macroarrays wurde eine *spike-in*-Kontrolle verwendet. Dazu wurde eine DNA-Sonde (*CWLP*-Gen aus *Arabidopsis thaliana*) gleichmäßig über den gesamten Filter gespottet (Abb. 3.7A). Die *spike-in*-Kontrolle diente zusätzlich als Orientierung für die Zuordnung der Hybridisierungssignale. Beispiele einiger *Images* von Macroarrays sind in Abb. 3.5 dargestellt.

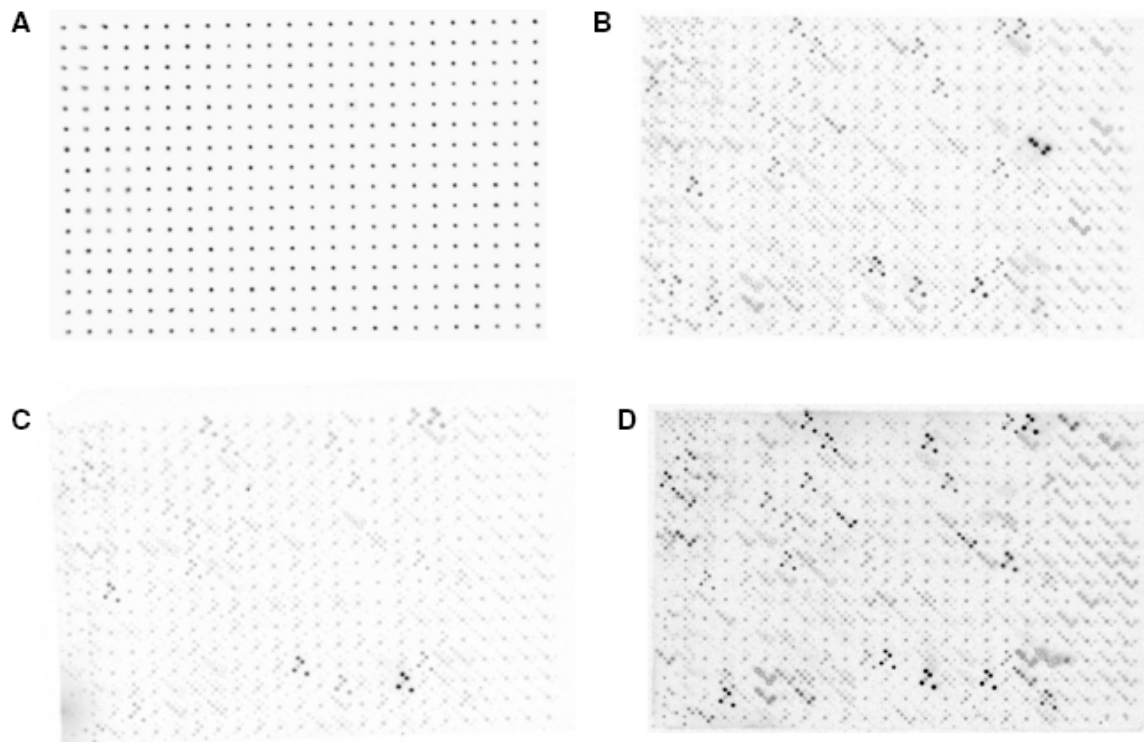


Abb. 3.5: Exemplarische Darstellung gescannter Macroarrays. (A) *spike-in*-Kontrolle (*guide dots*; *CWLP*-Gen aus *Arabidopsis thaliana*) (B)-(D) Die hybridisierten Macroarrays (radioaktiv markierte cDNA aus den RNAs von (B) Leber des SJL-Weibchens 187A/4 f2, (C) BAT des NZO-Weibchens 179A/3 f4 und (D) Hypothalamus des SJL-Weibchens 363 A/3 f3; alle 8 Wochen alt und HFD gefüttert) wurden über Nacht auf einen Phosphormager-Film exponiert und mit einem Phosphormager eingescannt. Die *guide dots* sind wie ein gleichmäßiges Gitter angeordnet. Alle anderen sichtbaren *Spots* stellen radioaktiv markierte cDNAs dar, die in den jeweiligen Geweben exprimiert werden. Starke bzw. schwache Expression wird durch dunkle bzw. helle *Spots* wiedergegeben. Jede Sonde wurde vier Mal in einem bestimmten Muster auf die Membran aufgebracht (siehe 2.3.14.2).

Mit den Macroarrays wurden mRNAs folgender Gewebe untersucht: Leber, weißes Fettgewebe, braunes Fettgewebe, Skelettmuskel und Hypothalamus. Diese Gewebe spielen eine wichtige Rolle im Fett- und Kohlenhydrat-Metabolismus sowie bei der Regulation von Hunger und Sättigung und tragen somit zur Regulation des Körpergewichts bei. Der Einfluss der Diät auf die Genexpression wurde durch die Gabe von SD und HFD bei beiden Mausstämmen analysiert. Pro Bedingung wurden je 1-3 Arrays hybridisiert und ausgewertet. Eine Übersicht der insgesamt 38 hybridisierten Macroarrays ist in Tab. 3.5 zu sehen.

Tab. 3.5: Überblick über die hybridisierten Macroarrays. n = Anzahl der hybridisierten Arrays, WAT = weißes Fettgewebe, BAT = braunes Fettgewebe, SM = Skelettmuskel, SD = Standard-Diät, HFD = Hochfett-Diät

Mausstamm	Diät	[n] Leber	[n] WAT	[n] BAT	[n] SM	[n] Hypothalamus
NZO	SD	2	1	3		2
	HFD	3	2	2	2	1
SJL	SD	2	1	3		2
	HFD	3	2	2	3	2

3.3.5 Auswertung der Macroarrays

Nach der Auswertung der Pixelintensitäten mit der *ImageQuant*-Software wurden die vier Einzelwerte jeder Sonde gemittelt und dieser Mittelwert auf den Median der Gesamtintensität aller Spots normalisiert (Herwig *et al.*, 2001).

Eine Möglichkeit der Auswertung von Array-Experimenten sind *Scatter*-Plots. Dabei werden die normalisierten Intensitäten der Sonden zweier Bedingungen gegeneinander aufgetragen. Werden Gene unter den untersuchten Bedingungen differentiell exprimiert, weicht der resultierende Punkt von der Ideallinie ab (Abb. 3.6).

Als differentiell exprimiert wurden Gene bezeichnet, die folgende Kriterien erfüllten:

- Die normalisierte Intensität musste größer als zwei *Scan*-Einheiten sein (Signal der Spots auf dem PI-Film musste makroskopisch sichtbar sein).
- Die Änderung musste mindestens zweifach sein.
- Der numerische Wert der Änderung musste größer sein als die Summe der Standardabweichung beider Bedingungen.

Die Gene, die als differentiell exprimiert identifiziert wurden, sind in Tab. 3.7 aufgelistet.

3.3.6 Hybridisierung der Microarrays

Zusätzlich zu den Macroarrays wurden Microarray-Experimente mit mRNAs aus weißem Fettgewebe von NZO- und SJL-Männchen durchgeführt. Die verwendeten Tiere waren vier und acht Wochen alt. Dabei stammen die Array-Daten der NZO-Tiere von Tanja Dreja (Promotion in Vorbereitung). Es wurden je drei RNA-Proben von SJL-Tieren getestet, die mit einer SD bzw. einer HFD gefüttert wurden.

Für die vorliegende Arbeit wurden nur Expressionsunterschiede von Genen auf Chromosom 5 betrachtet.

Ein Vergleich der Transkripte im Bereich des *Nob1* auf dem Macroarray und Microarray zeigte elf Transkripte, die exklusiv mit dem Macroarray analysiert wurden und zwölf Transkripte, die nur mit den Microarrays untersucht wurden (Tab. 3.6).

Die Gene, die eine differentielle Expression im weißen Fettgewebe zwischen SJL- und NZO-Mäusen zeigten, sind in Tab. 3.7 aufgelistet.

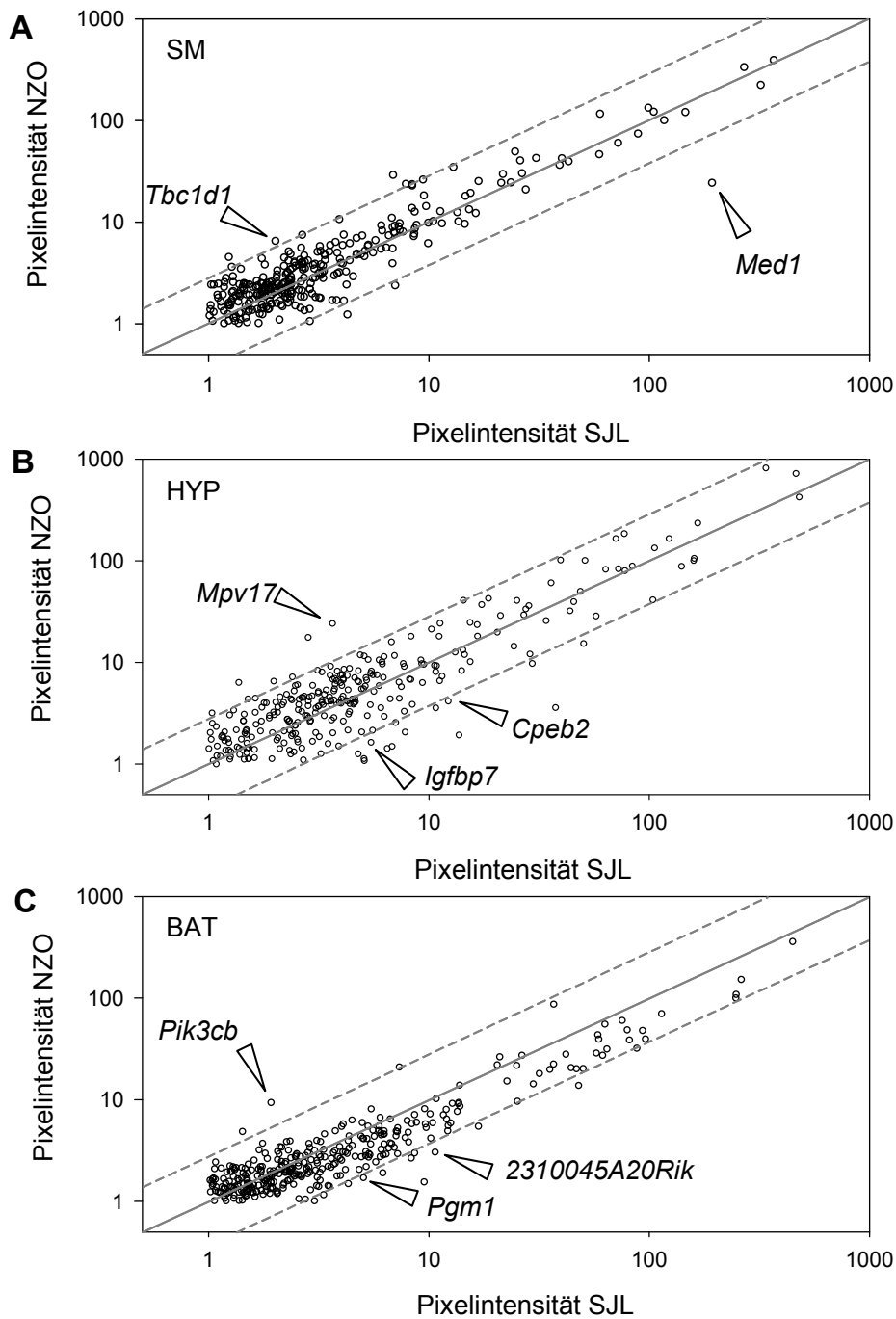


Abb. 3.6: Ausgewählte Scatter-Plots der exprimierten *Nob1*-Gene bei weiblichen NZO- und SJL-Mäusen. Die mRNAs der verwendeten Tiere waren 8 Wochen alt und wurden mit HFD gefüttert. Jeder Punkt repräsentiert eine Sonde. Gene, deren Sonden oberhalb bzw. unterhalb der gestrichelten Linie liegen, wurden als differentiell exprimiert bezeichnet. Dargestellt sind exprimierte *Nob1*-Gene (A) im Skelettmuskel, (B) im Hypothalamus und (C) im BAT. Dargestellt sind Mittelwerte; die Skalierung ist logarithmisch; die gestrichelten Linien geben die Ausschlusskriterien für eine differentielle Expression an. Mit Pfeilen sind Gene gekennzeichnet, deren differentielle Expression im weiteren Verlauf mit Hilfe der quantitativen *Real-Time*-PCR untersucht wurde (mit Ausnahme von *Med1* und *Pik3cb*, da die Standardabweichung für einen signifikanten Unterschied zu groß war).

Tab. 3.6: Vergleich der nicht betrachteten *Nob1*-Transkripte mit den durchgeführten Macro- bzw. Microarrays. Dargestellt sind Transkripte, die (A) ausschließlich Hilfe des selbst hergestellten Macroarray bzw. (B) nur durch den Einsatz des kommerziell erhältlichen Affymetrix-Chips *Mouse 430.2* auf ihre Expression untersucht wurden. Grundlage der Lokalisation der Transkripte war (A) die NCBI-Gendatenbank (Build 36.1) bzw. (B) die Affymetrix-Annotation für den Bereich 29-93 Mbp des Chr. 5.

A

Gename	EntrezGene ID	Protein
<i>1110019K23Rik</i>	665563	-
<i>9430027B09Rik</i>	77272	hypothetisch
<i>Dnajc5g</i>	231098	hypothetisch
<i>G6pd2</i>	14380	beschrieben, NP_062341
<i>Pdlim1</i>	54132	beschrieben, NP_058557
<i>Rbpj</i>	19664	beschrieben, 3 Isoformen
<i>Slc10a4</i>	231290	beschrieben, NP_775579
<i>Ugt2b35</i>	243085	beschrieben, NP_766469
<i>Ugt2b5</i>	22238	beschrieben, NP_033493
<i>UTP3</i>	65961	beschrieben, NP_075541
<i>Zar1</i>	317755	beschrieben, NP_777366

B

Gename	EntrezGene ID	Protein
<i>1700021O21Rik</i>	75536	-
<i>1700031L13Rik</i>	67327	-
<i>2210406O10Rik</i>	76710	-
<i>2900064F13Rik</i>	73043	-
<i>4930421C12Rik</i>	78788	-
<i>4930432L08Rik</i>	74621	-
<i>4930478P22Rik</i>	74429	-
<i>AW125296</i>	13839	-
<i>B930098A02Rik</i>	320462	-
<i>C030009O12Rik</i>	77328	-
<i>C630010D07Rik</i>	665563	hypothetisch, 2 Isoformen
<i>Dcun1d4</i>	100737	hypothetisch

3.3.7 Ergebnisse der Array-Analysen

Nach der Auswertung aller Array-Experimente wurden 17 Gene auf Chr. 5 als differentiell exprimiert identifiziert, davon 14 Gene im Bereich des *Nob1* (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Differentiell exprimierte Gene zwischen NZO- und SJL-Mäusen auf Chromosom 5. Durch Experimente mit Macro- und Microarrays wurden 18 Gene auf Chr. 5 gefunden, die entweder zwischen beiden Mausstämmen oder durch den Einfluss der Diät innerhalb eines Mausstammes differentiell exprimiert wurden. Die Verifizierung erfolgte mit quantitativer RealTime-PCR, dabei konnte die differentielle Regulation bei 7 der 18 Gene bestätigt werden (**fette** Schrift). WAT = weißes Fettgewebe; BAT = braunes Fettgewebe

Symbol	Gewebe	Array	genomische Position auf Chr. 5	normalisierte Arrayintensitäten NZO:SJL	verifiziert durch qRT-PCR
<i>Mll5</i>	WAT	Microarray	23 Mbp	2,93	x
<i>Insig1</i>	WAT	Microarray	28 Mbp	0,82	x
<i>Mpv 17</i>	Hypothalamus	Macroarray	31 Mbp	6,60	
<i>Abhd1</i>	WAT	Microarray	31 Mbp	0,46	x
<i>Ppp1cb</i>	Hypothalamus	Macroarray	32 Mbp	3,16	
<i>Ppp1cb</i>	WAT	Microarray	32 Mbp	2,00	x
<i>Letm 1</i>	Hypothalamus	Macroarray	34 Mbp	4,52	
<i>Mrfap 1</i>	Hypothalamus	Macroarray	37 Mbp	0,18	
<i>Cpeb2</i>	Hypothalamus	Macroarray	43 Mbp	0,34	
<i>Qdpr</i>	Hypothalamus	Macroarray	46 Mbp	0,35	
<i>2310045A20Rik</i>	BAT	Macroarray	54 Mbp	0,44	x
<i>Pgm1</i>	BAT	Macroarray	64 Mbp	0,43	
<i>Tbc1d1</i>	Skelettmuskel	Macroarray	64 Mbp	3,25	x
<i>Gabra 4</i>	Hypothalamus	Macroarray	71 Mbp	4,22	
<i>Igfbp7</i>	Hypothalamus	Macroarray	78 Mbp	0,42	
<i>Spink 2</i>	WAT	Microarray	78 Mbp	0,39	
<i>Aacs</i>	WAT	Microarray	126 Mbp	0,68	
<i>Alox5ap</i>	WAT	Microarray	149 Mbp	1,08	x

Nob1

Zur unabhängigen Bestätigung der Ergebnisse aus den Array-Experimenten wurden die Genexpressionen mit q-RT-PCR ermittelt und zwischen den Stämmen NZO und SJL verglichen. Die Expressionsunterschiede bei den Genen *2310045A20Rik*, *Tbc1d1*, *Mll5*, *Insig1*, *Abhd1*, *Ppp1cb* und *Alox5ap* wurden validiert (siehe Tab. 3.7).

Die Riken-cDNA *2310045A20Rik* wurde im braunen Fettgewebe von SJL-Mäusen stärker exprimiert als bei NZO-Mäusen ($1,03 \pm 0,26$ vs. $0,33 \pm 0,07$). *Tbc1d1* zeigte im Skelettmuskel der SJL-Tiere eine deutlich erniedrigte Expression im Vergleich zu NZO-Tieren ($0,13 \pm 0,05$ vs. $1,71 \pm 0,73$). Die Gene *Abhd1* und *Insig1* zeigten im weißen Fettgewebe der SJL-Tiere eine höhere Expression ($3,93 \pm 0,26$ vs. $1,14 \pm 0,57$ und $1,64 \pm 0,21$ vs. $1,02 \pm 0,19$) als bei den NZO-Tieren. Die Gene *Mll5* und *Ppp1cb* hingegen wiesen im weißen Fettgewebe der NZO-Mäuse

($1,00 \pm 0,09$ vs. $0,34 \pm 0,17$ und $1,00 \pm 0,11$ vs. $0,75 \pm 0,09$) eine erhöhte Expression im Vergleich zu den SJL-Mäusen auf. Eine Expression des Genes *Alox5ap* war nur im weißen Fettgewebe von NZO-Tieren zu detektieren, bei SJL-Tieren war keine Expression nachzuweisen ($1,12 \pm 0,53$ vs. $0,02 \pm 0,004$; siehe Abb. 3.7).

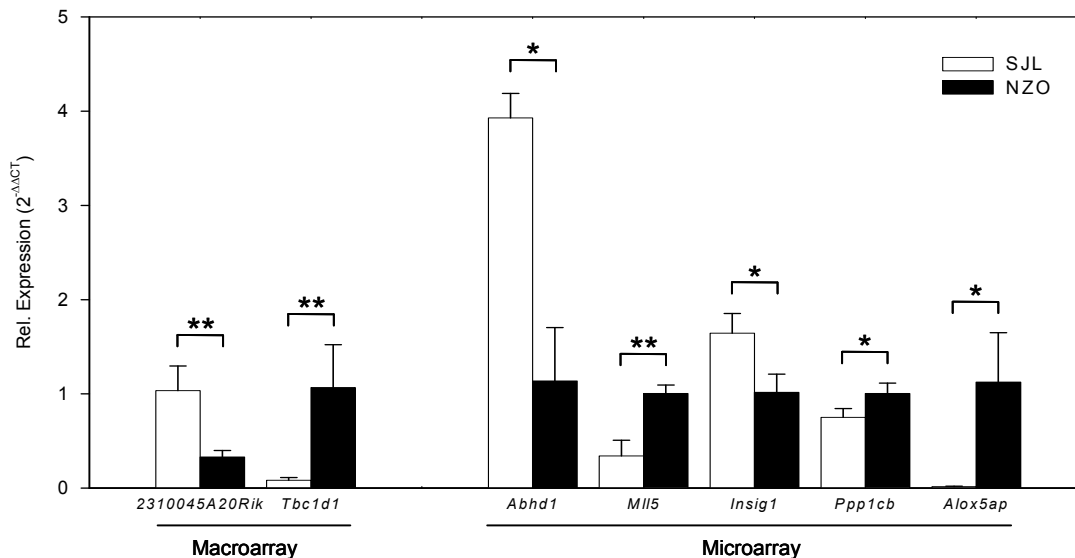


Abb. 3.7: Validierung der differentiell exprimierten Gene auf Chromosom 5 von SJL- und NZO-Mäusen. Mit quantitativer Real-Time-PCR verifizierte differentielle Genexpression der Gene, die zuvor mit Array-Experimenten identifiziert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3-6 unabhängigen Experimenten, die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Die Untersuchungen wurden im braunen Fettgewebe sowie Skelettmuskel (Macroarray) und weißen Fettgewebe (Microarray) durchgeführt.

3.4 Sequenzierung der Kandidatengene

Zur weiteren Untersuchung der potentiellen Kandidatengene aus den Expressionsstudien wurden die codierenden Bereiche der Gene *2310045A20Rik*, *Mll5*, *Insig1*, *Ppp1cb* und *Tbc1d1* sequenziert und nach Unterschieden zwischen den Stämmen NZO und SJL gesucht. Als Referenzsequenz diente dabei die Basensequenz des Stammes C57BL/6J. *Tbc1d1* war das einzige Gen, in dem Abweichungen zur Referenzsequenz gefunden wurden.

Im Gen *Tbc1d1* des SJL-Stammes (SJL/NBom) wurde eine Deletion von sieben Basenpaaren (4047delACTCGCT) im Exon 18 identifiziert (Abb. 3.8). Diese Deletion führt zur Verschiebung des Leserasters der mRNA und zu einem aberranten Protein bei SJL-Mäusen (Abb. 3.9). Diese Deletion wurde ebenfalls in der Sublinie SJL/J detektiert. Das Gen *Tbc1d1* (*tre-2/USP6*, *BUB2*, *cdc16 domain family member 1*) gehört zur Familie der Rab-GAP-Proteine (*Rab-GTPase activating proteins*). Die Rab-GAP-Domäne ist eine konservierte Region in GTPase-aktivierenden Proteinen, die mit kleinen Rab-G-Proteinen interagieren können.

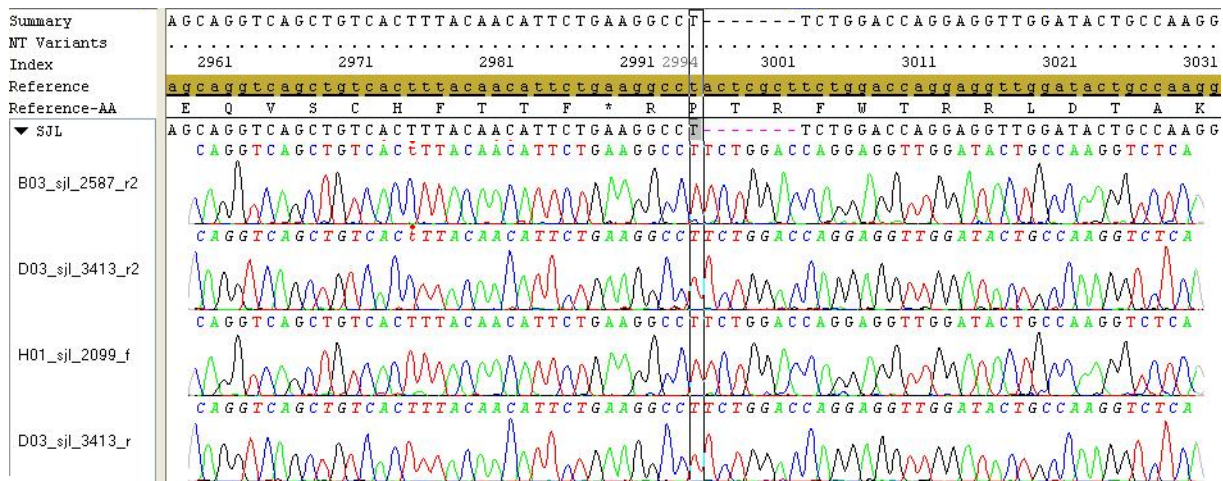


Abb. 3.8: Sequenzausschnitt des Gens *Tbc1d1* mit Hilfe der Software SeqScape. Dargestellt sind drei unabhängige cDNA-Sequenzen des Gens *Tbc1d1* des Mausstammes SJL (2587, 3413, 2099) aus Skelettmuskel-cDNA. Alle untersuchten cDNA-Sequenzen weisen eine Deletion von sieben Basenpaaren (2995-3001) im Vergleich zur Referenzsequenz (AK154591) auf.

Das Gen *Tbc1d1* ist auf Chr. 5 bei 64,6 Mbp lokalisiert (NCBI, Build 37.1, 2008). In der Gendatenbank *Ensembl* werden zwei Genmodelle beschrieben. Das längere Modell, das auf der mRNA AK122445 beruht, umfasst 5711 bp in 22 Exons. Das kürzere Modell beruht auf der mRNA AK154591 und umfasst 5432 bp in 20 Exons, wobei die Exons 12 und 13 des längeren Modells nicht enthalten sind. Im proximalen Teil des Proteins liegen zwei Phosphotyrosin-Bindungsstellen, im distalen Proteinbereich ist eine funktionelle *Rab-GTPase activating protein*-Domäne lokalisiert (Rab-GAP-Domäne; Abb. 3.9A). Die Deletion von sieben Basenpaaren in Exon 18 des Gens befindet sich in der Rab-GAP-Domäne des Proteins. Die resultierende Leserasterverschiebung führt zu einem vorzeitigen Stop-Codon innerhalb dieser funktionellen Domäne (Abb. 3.9B). Die Folge ist ein aberrantes Protein, das seine ursprüngliche katalytische Funktion nicht mehr wahrnehmen kann, weil der dafür essentielle Glutaminfinger im TBC1D1-Protein von SJL-Mäusen fehlt (Abb. 3.9C). Dieser Glutaminfinger ist Teil eines *Zwei-Finger-Mechanismus*, der für die katalytische Funktion von GYP-Proteinen der Hefe sowie deren orthologe GAP-Proteine in Säugetieren angenommen wird (Pan *et al.*, 2006).

Der vorzeitige Abbruch des Proteins wurde experimentell von Ulrike Bernhardt mit Hilfe einer *in vitro* Translation bestätigt. Durch den Einbau von radioaktiv markiertem Methionin in das Protein konnte die Proteinbande auf einem Phosphorimager-Film sichtbar gemacht werden. Das *in vitro* translatierte SJL-Protein zeigte eine Bande mit geringerem Molekulargewicht als das *in vitro* translatierte Protein der C57BL/6J-Mäuse (117 kDa vs. 141 kDa).



Abb. 3.9: Charakterisierung der Deletion von sieben Basenpaaren im Gen *Tbc1d1* bei SJL-Mäusen. (A) Genstruktur von *Tbc1d1*. Sie umfasst 22 Exone, wobei die Exone 12 und 13 in einer alternativen Isoform zu finden sind (schräg gestreifte Markierung). Am N-Terminus des Proteins befinden sich zwei Phospho-Tyrosin-Bindungsstellen (gepunktete Markierung), im C-terminalen Teil ist die funktionelle Rab-GAP-Domäne lokalisiert (graue Markierung). Die Deletion im Gen des SJL-Mausstammes (rot markiert) liegt in Exon 18. (B) Sequenzausschnitt aus Exon 18 des Gens *Tbc1d1*. Die 7 bp-Deletion im SJL-Stamm führt zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Stop-Codon, sodass das Protein bei Aminosäure 988 vorzeitig abbricht. Die Nummerierung beruht auf der langen Isoform, *Accession*-Nummer AK122445. (B6 = C57BL/6J) (C) Darstellung der konservierten Aminosäuremotive innerhalb der Rab-GAP-Domäne von TBC1D1, dessen nahem Verwandten TBC1D4 (AS160) und einem orthologen Hefe-Protein Gyp1p. Rot hervorgehoben sind die Motive RxxxW, IxxDxxR (Argininfinger) und YxQ (Glutaminfinger). Das TBC1D1-Protein der SJL-Maus bricht aufgrund einer Leserasterverschiebung, die durch eine 7 bp-Deletion bedingt ist, bei Tyr967 (rot markiert) vor dem Glutaminfinger ab und verliert dadurch seine GAP-Aktivität.

3.4.1 Deletion in Exon 18 des Gens *Tbc1d1* bei SJL-Mäusen ist stammspezifisch

Mehrere Inzucht-Mausstämme wurden mit Hilfe der Sequenzierung des Exons 18 des Gens *Tbc1d1* auf das Vorhandensein der 7 bp-Deletion untersucht. Dazu wurden insgesamt neun Inzucht-Mausstämme ausgewählt. Diese können in zwei Gruppen eingeteilt werden:

- Dem SJL/NBom-Stamm nahe verwandt: SJL-Sublinie SJL/J, FVB, SWR
- Dem SJL/NBom-Stamm entfernt verwandt: C57BL/6J, NZO, NZB, NON, SM, AKR

Die im SJL/NBom-Mausstamm identifizierte Deletion wurde ebenfalls in der Sublinie SJL/J gefunden. Alle anderen untersuchten Mauslinien wiesen keine Deletion in Exon 18 des *Tbc1d1*-Gens auf (Abb. 3.10). Somit kann von einer SJL-spezifischen Deletion ausgegangen werden.

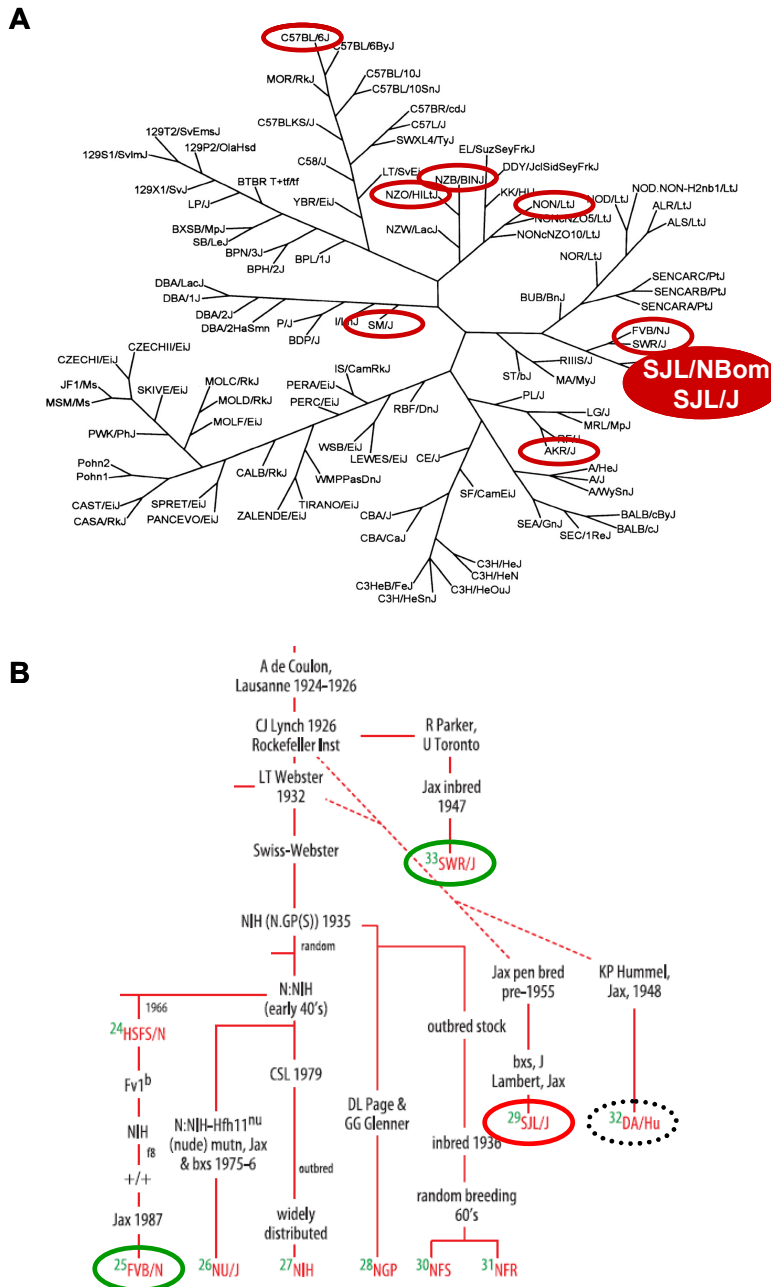


Abb. 3.10: Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen von Maus-Inzuchtstämmen. (A) Sequenzanalyse-basierter Stammbaum nach Petkov *et al.* (2004). **Rot** markiert sind die Mausstämmen, die auf die LOF-Mutation im *Tbc1d1*-Gen untersucht wurden. Nur die Sublinien SJL/NBom und SJL/J tragen diese Deletion von sieben Basenpaaren im Exon 18 des Gens *Tbc1d1*. Alle anderen analysierten Mausstämmen translatieren ein Protein mit funktioneller TBC-Domäne. (B) Ausschnitt des auf Zuchtbüchern basierenden Stammbaums bekannter Mauslinien nach Beck *et al.* (2000). **Grün** markiert sind die Mausstämmen, die eine nahe Verwandtschaft zum SJL/J-Mausstamm aufweisen und die auf die LOF-Mutation im *Tbc1d1*-Gen untersucht wurden. Der gestrichelte DA/Hu-Stamm wurde nicht analysiert.

3.4.2 Sequenzierung weiterer Kandidatengene im *Peak*-Bereich des *Nob1*

Die *Nob1-Peak*-Region wird aufgrund eines polymorphen Haplotypenblocks zwischen NZO- und SJL-Mäusen durch die Mikrosatellitenmarker D5Mit82 und D5Mit15 (60,3 Mbp bzw. 65,8 Mbp) begrenzt (Abb. 3.11). Dieser Bereich ist innerhalb des *Nob1.24*-Fragments lokalisiert. Dieses Fragment entstand bei einem Kreuzungsexperiment der Mausstämmen SJL und C57BL/6J von Stephan Scherneck (rekombinant kongene Mauslinie SB6^{*Nob1.24*}; 53-77 Mbp; Abb. 3.11). Tiere, die homozygot das SJL-*Nob1.24*-Fragment aufwiesen, zeigten ein signifikant geringeres Körpergewicht als Tiere, die das B6-*Nob1.24*-Fragment (homozygot und heterozygot) trugen.

Informationen der Gendatenbanken und Mikrosatellitenanalysen in unserer Abteilung zeigen einen gemeinsamen Haplotypenblock zwischen den Mausstämmen SJL und NZB, dem nächsten verwandten Mausstamm von NZO, im *Peak*-Bereich des *Nob1* (genaue Auflistung der bekannten SNPs im Anhang unter Tab. A4). Da der größte Teil der genetischen Variation zwischen Maus-Inzuchtstämmen auf gemeinsame Vorfahren zurückgeht, werden in solchen Bereichen, die eine durch Abstammung erworbene Gleichheit (*identity by descent*, IBD) aufweisen, keine Genvarianten vermutet, die für die Ausprägung eines unterschiedlichen Merkmals verantwortlich sind (DiPetrillo *et al.*, 2005). Zudem konnte der Effekt des *Nob1* aus der NZO-SJL-Kreuzung in einer NZO-NZB-Kreuzung nicht beobachtet werden (Katja Schmolz, Dissertation 2008). Deshalb ist davon auszugehen, dass SJL-Sequenzunterschiede zum Referenzstamm C57BL/6J, die ebenfalls im NZB-Stamm detektiert werden, nicht ursächlich für den Effekt des *Nob1* sein können.

Tbc1d1 ist in der *Peak*-Region des QTL *Nob1* lokalisiert. In der *Nob1-Peak*-Region kartieren insgesamt 26 Genmodelle, die sich aus sechs theoretischen Modellen (Bezeichnung: LOC + Nummer, z.B. *LOC100041543*), einem Pseudogen, drei Genmodellen des Riken-Consortiums mit bekannten mRNAs und mehreren ESTs sowie sechzehn Genmodellen mit bekannten mRNAs oder Proteinen zusammensetzen (Abb. 3.11). Für die theoretischen Modelle gibt es keine beschriebene mRNA oder ESTs, die dieser genomischen Region zugeordnet werden. Mit Ausnahme des am proximalen Ende lokalisierten Gens *G6pd2* und des Pseudogens *Ppia-ps22* kann allen anderen Genen ein humanes Ortholog auf dem korrespondierenden Abschnitt auf Chromosom 4 zugeordnet werden. Diese 19 Gene wurden auf Sequenzunterschiede in den codierenden Genbereichen, nicht aber die Introns der Gene, zwischen SJL und C57BL/6J untersucht (die Sequenzierung von *Pgm1* erfolgte von Katja Schmolz im Rahmen ihrer Dissertation). Zusätzlich erfolgte die Sequenzierung von 1,6 kbp der 5'-flankierenden Region von *Tbc1d1*. Insgesamt wurden etwa 41,7 kbp sequenziert. Als Referenzsequenzen dienten, soweit vorhanden, C57BL/6J-mRNA-Referenzsequenzen der NCBI-Genbank. Waren diese

nicht verfügbar, wurden bekannte mRNA-Sequenzen anderer Stämme genutzt. Zur Auswertung wurde das Programm *SeqScape* verwendet.

In der 5'-flankierenden Region von *Tbc1d1* wurden keine SJL-spezifischen Austausche identifiziert. In sechs *Peak*-Genen wurden 12 SNPs identifiziert, die allerdings auch beim Stamm NZB detektiert und teilweise auch in beschriebenen cDNAs von C57BL/6J gefunden wurden. In den übrigen Genen wurden keine weiteren SJL-spezifischen Austausche identifiziert (Tab. 3.8).

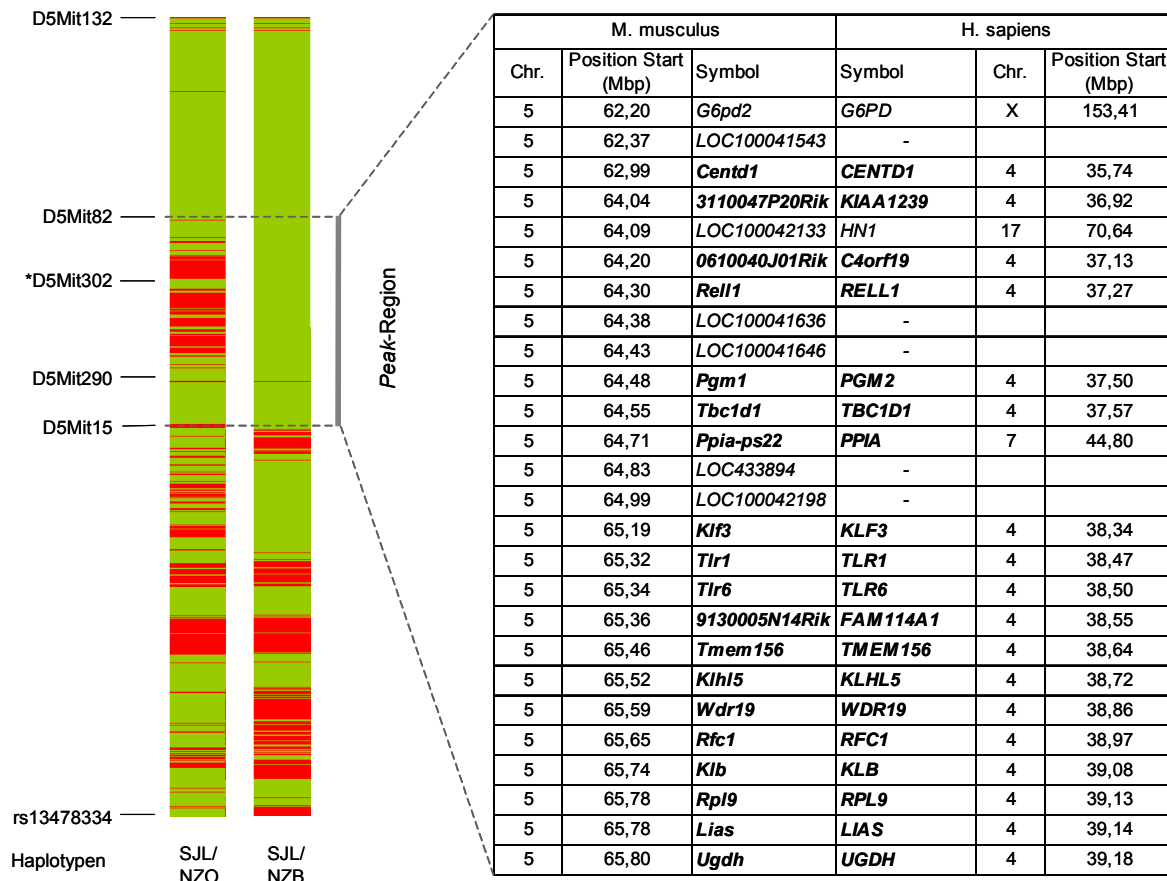


Abb. 3.11: *Nob1.24*-Fragment und *Peak*-Region des *Nob1*. Die *Peak*-Region umfasst ca. 5 Mbp und wird durch die Mikrosatellitenmarker D5Mit82 (60,3 Mbp) und D5Mit15 (65,8 Mbp) begrenzt. Dies entspricht einem polymorphen Haplotypenblock zwischen den Mausstämmen SJL und NZO (rote Markierung; grüne Bereiche sind nicht polymorph). Dieser Abschnitt des Chromosoms ist zwischen den Mausstämmen SJL und NZB nicht polymorph. NZB ist der nächstverwandte Mausstamm zu NZO, in einer Kreuzung dieser beiden nah verwandten Stämme wurde keine signifikante Korrelation des Körpergewichts mit einem bestimmten Genotyp im *Nob1*-Bereich erreicht. In der *Nob1*-*Peak*-Region sind 26 Genmodelle lokalisiert. **Fett** hervorgehoben sind die Genmodelle, deren humane Orthologe auf dem syntänen Abschnitt auf Chromosom 4 zu finden sind. *D5Mit302 ist der *Peak*-Marker des QTL *Nob1*.

Tabelle 3.8: Sequenzanalyse der codierenden Bereiche der Gene im *Peak*-Bereich des *Nob1* bei den Mausstämmen SJL und NZB

Symbol	Entrez Gene ID	Genomische Position (bp) ^a	Accession No.	CDS (bp) ^b	Diff. Expr.	Austausche bei SJL ^c	Austausche auch bei NZB	AS-Austausch	Bemerkungen
<i>Pcdh7</i>	54216	58109338	NM_018764	3210	-	t2855a	+	-	BG085683
<i>G6pd2</i>	14380	62200122	NM_019468	1542	-	c692t c880t a1206c	+ + +	A231V R294C	rs29551589, auch bei A/J, DBA/2J rs33269840, auch bei A/J, DBA/2J
<i>Centd1</i>	212285	62993684	XM_900367	5112	-	g2393a	+	-	
<i>3110047P20Rik</i>	319807	64041409	XM_132047	5229	-	c846g t942c t943c g1092a a1201g	+ + + +	- - - -	
<i>0610040J01Rik</i>	76261	64203603	NM_029554	942	-	t981a t1117g	+ +	I401V L226Q D271E	auch bei XM_914264, AB093290 (gemischte Stämme) rs14459170, auch bei Czech II (AAH04797) und FVB/N (AW911314); Q auch bei orthologem Rattengen (<i>EntrezID</i> 498368; NM_001017500) auch bei Czech II (AAH04797); auch bei C57BL/6J genomischer <i>contig</i> NT_039305 (gi:94374801); BI904941
<i>Rell1</i>	100532	64300137	NM_145923	819	-	-	-	-	
<i>Pgm1</i>	66681	64484189	NM_025700	1860	-	t1397a g1649a	+ +	C455S D539N	rs13460885, auch bei DBA/2, FVB/N und humanem Ortholog (PGM2; NP_060760) rs33382775, auch bei DBA/2
<i>Tbc1d1^d</i>	57915	64551450 64437843 - 64439442	NM_019636 NT_039305	3489 n/a	+	del3009-3015 -	-	-	nicht in AKR/J, C57BL/6J, FVB/N, NON/LtJ, NZB/OlaHsd, NZO/HlBom, SM/JCrI, und SWR/J 5' flankierende Region (1,6 kbp), putativer Promoterbereich
<i>Klf3</i>	16599	65194762	NM_008453	1035	-	-	-	-	
<i>Tlr1</i>	21897	65316073	NM_030682	2388	-	-	-	-	
<i>Tlr6</i>	21899	65344345	NM_011604	2421	-	a1946g	+	I600V	mRNA Sequenz für C57BL/6J ist AK137502; BAE23384
<i>9130005N14Rik</i>	68303	65361351	NM_026667	1710	-	-	-	-	
<i>Tmem156</i>	243025	65456174	XM_144292	1038	-	-	-	-	
<i>Klh5</i>	71778	65522910	NM_175174	771	-	-	-	-	
<i>Wdr19</i>	213081	65590952	NM_153391	3849	-	g3821a g3823a g3828a a3876c a3898c c3903t t3910c	+ + + + + +	R1172K E1173K - - K1198Q - S1202P	mRNA Sequenz für C57BL/6J ist AK147970; BAE28258
<i>Rfc1</i>	19687	65653097	NM_011258	3396	-	-	-	-	
<i>Klb</i>	83379	65739650	NM_031180	3129	-	-	-	-	
<i>Rpl9</i>	20005	65779604	NM_011292	579	-	-	-	-	
<i>Lias</i>	79464	65782736	NM_024471	1122	-	-	-	-	
<i>Ugdh</i>	22235	65804460	NM_009466	1482	-	-	-	-	

a) NCBI's *Mus musculus* Genome Build 37.1 (Juli, 2008); b) Länge der codierenden Sequenz; c) Referenzstamm ist C57BL/6J, Positionen beziehen sich auf die Referenzsequenz mit der angegebenen *Accession* Nummer (RefSeq Acc. No.);

d) lange Isoform, beste Übereinstimmung mit AK122445 (*Ensembl Transcript* ID: ENSMUST00000043893); NCBI's RefSeq *accession* (NM_019636) für Genbereich (*EntrezID* 57915) bezieht sich auf die kurze Isoform; RefSeq Sequenz für *Tlr6* und *Wdr19* beziehen sich auf C3H/He bzw. BALB/C; angegeben sind die korrespondierenden *accessions* für C57BL/6J.

3.5 mRNA-Expressionsanalysen des Gens *Tbc1d1*

3.5.1 Untersuchung auf differentielle Expression zwischen SJL- und NZO-Mäusen

Zur Untersuchung des Expressionsprofils von *Tbc1d1* wurden q-RT-PCR-Experimente mit cDNA folgender Gewebe durchgeführt: Leber, WAT, BAT, Herz, Pankreas, Niere, Dünndarm, Colon, Hypothalamus. Dabei zeigte sich neben der Bestätigung der erniedrigten Expression im Skelettmuskel von SJL-Mäusen ($0,13 \pm 0,05$ vs. $1,71 \pm 0,73$ bei NZO-Tieren) eine deutlich geringere *Tbc1d1*-Expression in allen untersuchten Geweben. Die höchsten mRNA-Expressionsraten wurden in der Niere ($2,74 \pm 0,56$) und im Skelettmuskel ($1,71 \pm 0,73$) von NZO-Mäusen gefunden. Etwas geringer wurde *Tbc1d1* in Hypothalamus ($1,47 \pm 0,30$), Herz ($1,23 \pm 0,48$) und Pankreas ($0,89 \pm 0,30$) exprimiert. Schwache Expression zeigten Dünndarm, Colon und BAT. In Leber und WAT konnte keine mRNA-Expression detektiert werden (Abb. 3.12).

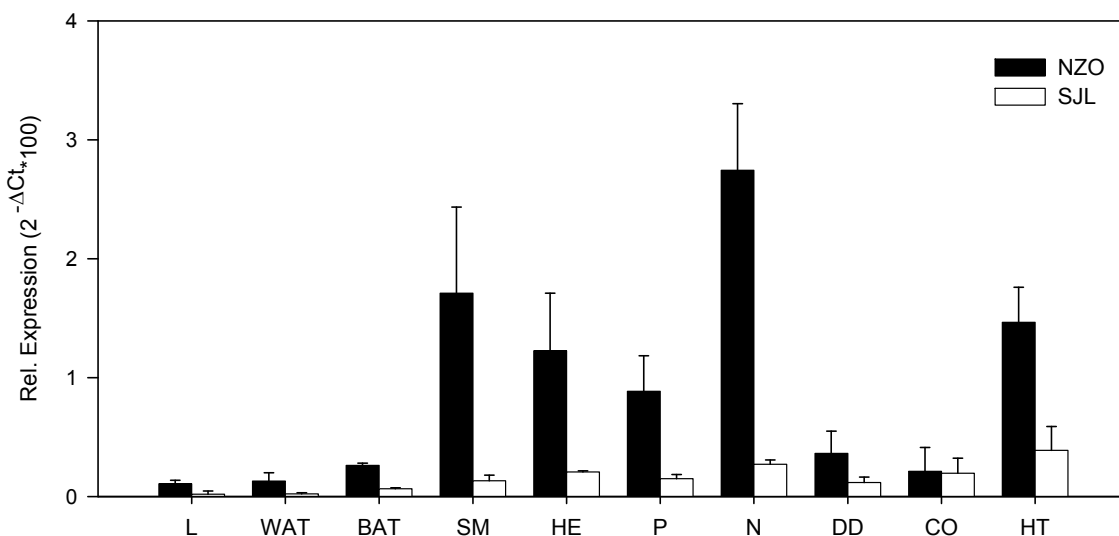


Abb. 3.12: Darstellung der relativen Expression des Gens *Tbc1d1* in verschiedenen Geweben von NZO- und SJL-Mäusen. Die Daten wurden mit q-RT-PCR ermittelt; es wurden je 3-6 männliche, 8 Wochen alte Tiere untersucht, die mit Standard-Diät gefüttert wurden. SJL-Tiere wiesen im Vergleich zu NZO-Tieren in allen untersuchten Geweben eine geringere Expression auf. Die stärksten Expressionsraten bei NZO-Mäusen zeigten der Skelettmuskel (SM), das Herz (HE), Pankreas (P), Niere (N) und Hypothalamus (HT). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3-6 Experimenten. L – Leber, WAT – weißes Fettgewebe, BAT – braunes Fettgewebe, DD – Dünndarm, CO – Colon

3.5.2 Isoformen von *Tbc1d1*

Nach dem Auftreten von PCR-Doppelbanden (500 bp vs. 800 bp) im Zuge der Klonierung der *Tbc1d1*-cDNA wurden mehrere Gewebe auf die Expression von verschiedenen *Tbc1d1*-Isoformen untersucht. Bei der Sequenzierung der cDNA von *Tbc1d1* in Skelettmuskel und WAT von NZO-Mäusen wurde ebenfalls festgestellt, dass unterschiedliche Genvarianten in beiden Geweben vorlagen. Im WAT fand sich eine um ein Exon kürzere Form (Exon 12 fehlt) und im Skelettmuskel eine Form, die das Exon 12 enthielt. Zur Analyse der gewebsspezifischen Expression der Isoformen wurden zwei *TaqMan*-Sonden für die qRT-PCR verwendet. Die *TaqMan*-Sonde, die spezifisch die lange Isoform detektiert, wurde in Exon 12 lokalisiert. Die *TaqMan*-Sonde für alle Isoformen ist in Exon 14 und 15 lokalisiert (Abb. 3.13A und B). Die Expression der Isoformen wurde auf die *beta-Actin*-Expression in den jeweiligen cDNAs normalisiert. In einer qRT-PCR mit einer definierten Menge der klonierten langen Isoform als *template* und je der Sonde für die lange bzw. für alle Isoformen wurde durch vergleichbare Ct-Werte die Vergleichbarkeit beider Sonden sichergestellt.

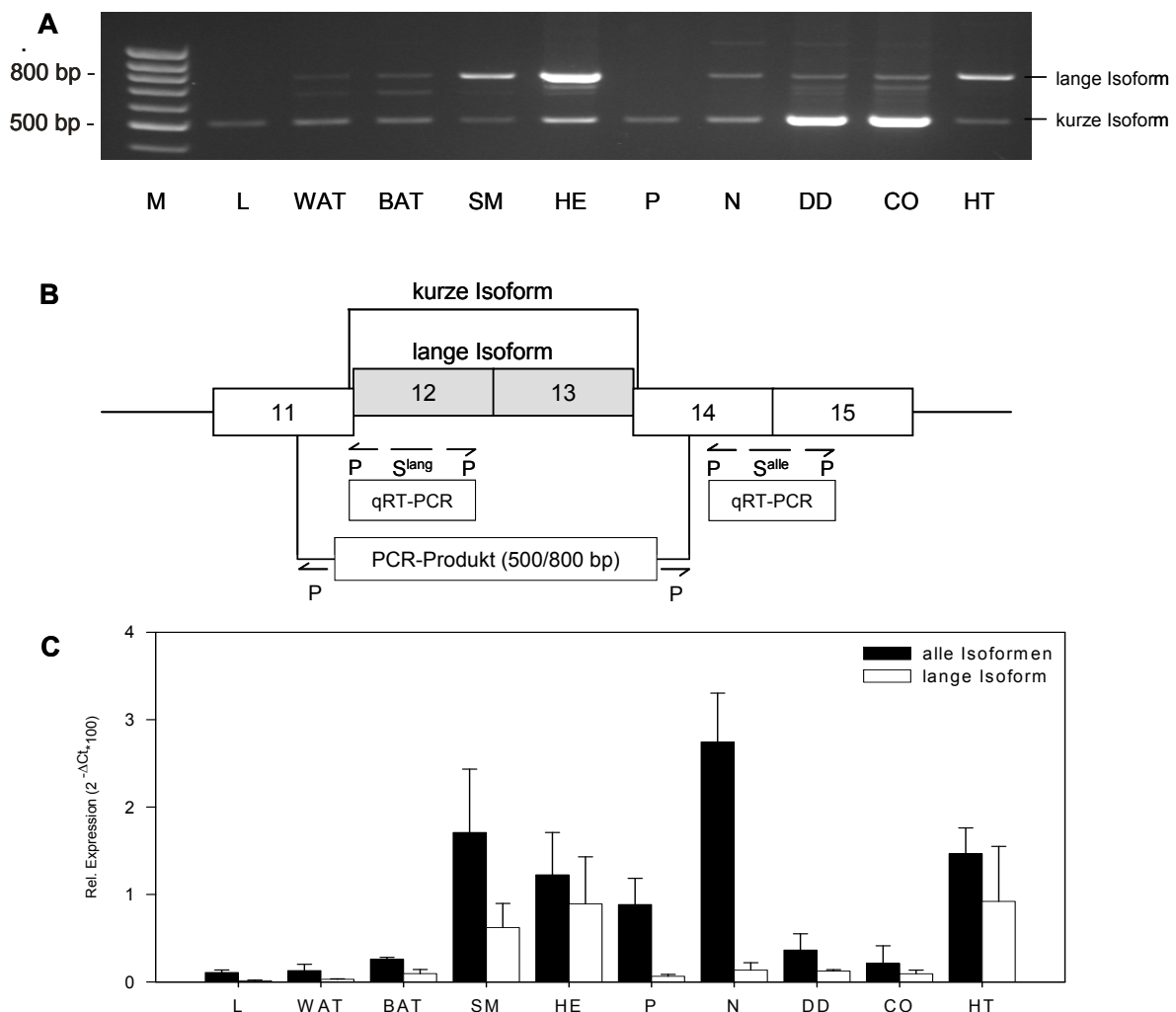


Abb. 3.13: Darstellung der *Tbc1d1*-Isoformverteilung in verschiedenen Geweben von NZO-Mäusen. (A) PCR-amplifizierte Doppelbanden in verschiedenen Geweben von NZO-Mäusen. Die Primer sind in Exon 11 und 14 lokalisiert, sodass das PCR-Produkt der kurzen Isoform eine Länge von etwa 500 bp hat, dagegen zeigte das PCR-Produkt der langen Isoform eine ungefähre Länge von 800 bp. (B) Lokalisation der Primer (P) für die PCR-Reaktion sowie der *TaqMan*-Sonden (S) für die quantitative Bestimmung der Isoformverteilung. (C) Quantitative Bestimmung der Isoformverteilung mit Hilfe der qRT-PCR und der spezifischen *TaqMan*-Sonden. Mit der PCR- und qRT-PCR-Methode wurden ähnliche Verteilungsmuster der beiden Isoformen erhalten. Die lange Isoform kam verstärkt in Skelettmuskel (SM), Herz (HE) und Hypothalamus (HT) vor, während ein größerer Anteil der kurzen Isoform in Leber (L), WAT, BAT, Pankreas (P), Niere (N), Dünndarm (DD) und Colon (CO) zu finden war.

Mit beiden Methoden (PCR und qRT-PCR) zeigte sich eine gewebsspezifische Expression der beiden *Tbc1d1*-Varianten. Die lange Isoform fand sich mehr im Skelettmuskel, Herz und Hypothalamus. Die kürzere Isoform wurde verstärkt in den folgenden Geweben gefunden: Leber, WAT, BAT, Pankreas, Niere, Dünndarm und Colon (Abb. 3.13A und C). Die Sequenz der langen und kurzen Isoform ist im Anhang zu finden.

3.5.3 mRNA-Expression von *Tbc1d4*

Das dem *Tbc1d1* nächste verwandte Gen *Tbc1d4* (*AS160*) wurde mit der GLUT4-Translokation im Skelettmuskel in Verbindung gebracht (Sano *et al.*, 2003; Kane und Lienhard, 2002). Eine Untersuchung der mRNA-Expression der Gene *Tbc1d1* und *Tbc1d4* bei NZO-Männchen zeigte signifikant verschiedene Ct-Werte von *Tbc1d1* in Pankreas ($0,06 \pm 0,02$ vs. $0,03 \pm 0,01$) und Hypothalamus ($0,02 \pm 0,004$ vs. $0,003 \pm 0,001$), im Skelettmuskel und WAT wurde kein Unterschied detektiert.

Das Fehlen der *Tbc1d1*-mRNA bei SJL-Mäusen wird im Vergleich zu NZO-Mäusen nicht durch eine verstärkte Expression von *Tbc1d4* kompensiert. Nur im weißen Fettgewebe wurde bei SJL-Tieren eine leicht höhere mRNA-Expression von *Tbc1d4* gemessen ($0,023 \pm 0,009$ vs. $0,013 \pm 0,004$ bei NZO-Tieren; Abb. 3.14).

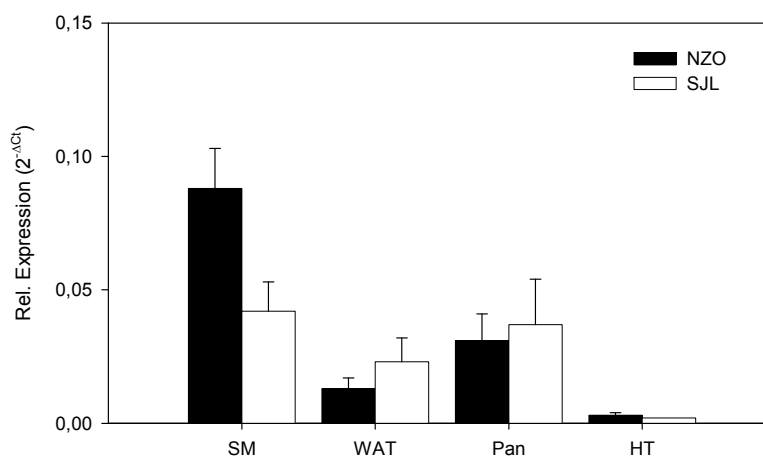


Abb. 3.14: Expression von *Tbc1d4* in unterschiedlichen Geweben von NZO- und SJL-Mäusen. Es wurden je 5-6 männliche Tiere untersucht, die mit SD gefüttert wurden. Nur im weißen Fettgewebe (WAT) wurde eine höhere Expression bei SJL-Tieren detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, die Expression von *Tbc1d4* ist auf die *beta-Actin*-Expression der jeweiligen Gewebe normalisiert. SM-Skelettmuskel, Pan-Pankreas, HT-Hypothalamus

3.5.4 Verteilung von *Tbc1d1* in verschiedenen Muskelfasern im Skelettmuskel des Mausstamms C57BL/6J

Zur Untersuchung der mRNA-Expression von *Tbc1d1* in unterschiedlichen Muskeltypen, die sich im Hinblick auf die Nutzung von Energie aus aeroben bzw. anaeroben Stoffwechselprozessen unterscheiden, wurden qRT-PCR-Experimente durchgeführt. Dazu wurden von Susanne Neschen verschiedene Muskelareale bei B6-Mäusen präpariert. Der *Musculus gastrocnemius* ist dabei eine Mischung von glycolytischen und oxidativen Fasern, der *Musculus soleus* stellt das Modell für überwiegend oxidative Fasern dar. Der *M. gastrocnemius* wurde in glycolytische und oxidative Fasern disseziert. Die erfolgreiche Trennung wurde mit Hilfe des Vergleichs der *UCP2*-mRNA-Expression in den cDNAs der unterschiedlichen Muskelfasern überprüft (Samec *et al.*, 1998). Die relative mRNA-

Expression von UCP2 zeigte in den Fasern des *M. soleus* die höchsten Werte ($8,46 \pm 2,53$), in den glycolytischen Fasern des *M. gastrocnemius* die geringsten Werte ($2,84 \pm 0,79$). Die getrennten oxidativen Fasern des *M. gastrocnemius* wiesen zwar höhere Werte auf ($5,41 \pm 2,77$) als die glycolytischen Fasern, allerdings nicht so hoch wie die Fasern des *M. soleus*. Somit muss davon ausgegangen werden, dass die Trennung der oxidativen Fasern nicht ganz erfolgreich war bzw. dass noch viele glycolytische Fasern enthalten waren. Für die Analyse der *Tbc1d1*-Expression wurden deshalb nur cDNAs von *M. soleus* und *M. gastrocnemius* (glycolytisch) verwendet. *Tbc1d1*-mRNA wurde zu einem signifikant höheren Anteil ($p < 0,005$) in den glykolytischen Fasern des *M. gastrocnemius* gefunden und kaum im oxidativen *M. soleus* ($5,39 \pm 1,80$ vs. $1,22 \pm 0,47$; Abb. 3.15).

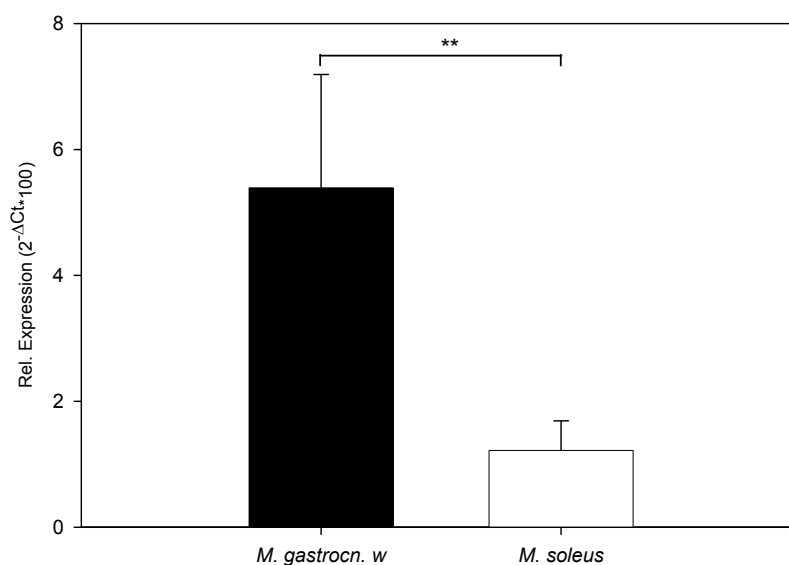


Abb. 3.15: Darstellung der *Tbc1d1*-Expression in zwei unterschiedlichen Muskelfasertypen des Skelettmuskels bei C57BL/6J-Mäusen. Das Ergebnis aus den q-RT-PCR-Versuchen zeigte eine signifikant stärkere Expression in den glycolytischen Fasern des *M. gastrocnemius* (*M. gastrocn. w*) als im *M. soleus*. Untersucht wurden männliche, acht Wochen alte Tiere, die mit SD gefüttert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 6 Experimenten; ** $p < 0,005$ (Mann-Whitney-Test).

3.5.5 Untersuchung auf differentielle Expression im Skelettmuskel der Mausstämme NZO, C57BL/6J und C57BL/6J^{ob/ob}

Für die weiteren Untersuchungen wurde Skelettmuskel-cDNA (*M. gastrocnemius*) verschiedener Mausstämme mit Hilfe der q-RT-PCR analysiert. Zunächst wurde untersucht, ob *Tbc1d1* gewichtsabhängig exprimiert wird. Dazu wurde die mRNA-Expression von *Tbc1d1* zwischen dem normalgewichtigen Stamm C57BL/6J und den adipösen Stämmen C57BL/6J^{ob/ob} sowie NZO verglichen. Zwischen den Stämmen C57BL/6J und C57BL/6J^{ob/ob} wurde kein Unterschied in der *Tbc1d1*-mRNA-Expression gemessen. Die *Tbc1d1*-

Expression bei C57BL/6J- und C57BL/6J^{ob/ob}-Mäusen war jedoch signifikant höher als bei NZO-Mäusen (Abb. 3.16).

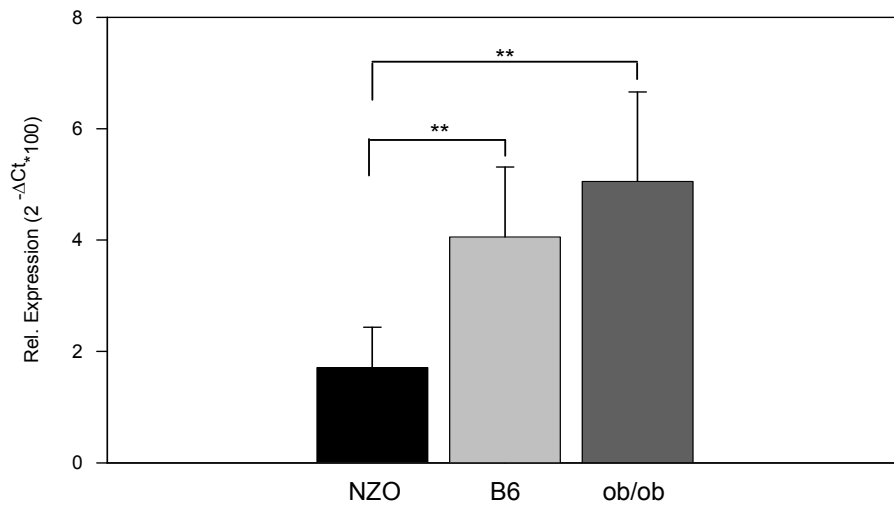


Abb. 3.16: Vergleich der *Tbc1d1*-mRNA-Expression im *M. gastrocnemius* zwischen verschiedenen Mausstämmen. Untersucht wurden je 4-6 männliche Tiere, die mit SD gefüttert wurden. Die Expression der *Tbc1d1*-mRNA weist zwischen den Stämmen C57BL/6J (B6) und C57BL/6J^{ob/ob} (ob/ob) keinen signifikanten Unterschied auf. Beide Stämme zeigen jedoch eine signifikant höhere Expression als NZO-Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 4-6 Experimenten; ** p<0,005 (Mann-Whitney-Test).

In einer zweiten Analyse wurde die Expression von *Tbc1d1* bei weiblichen NZO-Mäusen gemessen, die aufgrund von verschiedenen Diätbedingungen (SD bzw. HFD) ein unterschiedliches Körpergewicht aufwiesen. Hier konnte ein tendenzieller Anstieg der Expression mit steigendem Körpergewicht ermittelt werden (Abb. 3.17).

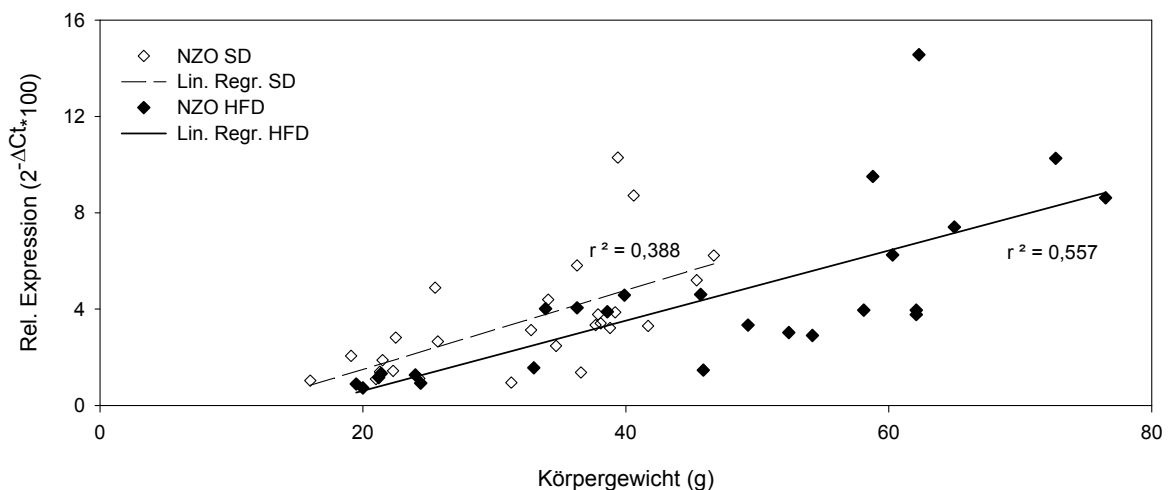


Abb. 3.17: Korrelation der Körpergewichte mit der *Tbc1d1*-Expression im Skelettmuskel von NZO-Mäusen. Die mit q-RT-PCR ermittelten *Tbc1d1*-Expressionswerte wurden mit den entsprechenden Körpergewichten der Mäuse korreliert. Die untersuchten weiblichen Tiere waren zwischen 4 und 22 Wochen (n=3-6) alt und wurden mit Standard-Diät (SD) bzw. Hochfett-Diät (HFD) gefüttert. Dabei ergab sich Tiere, die mit SD gefüttert wurden, nur eine leichte Korrelation. Die Korrelation war bei HFD-gefütterten Tieren etwas stärker. Jeder Punkt zeigt ein Tier mit Gewicht und entsprechender relativer Expression der *Tbc1d1*-mRNA.

Weiterhin wurde untersucht, ob die *Tbc1d1*-mRNA-Expression im Skelettmuskel mit dem Lebensalter korreliert. Bei C57BL/6J-Mäusen wurde ein Anstieg der mRNA-Expression mit steigendem Lebensalter ermittelt (Abb. 3.18).

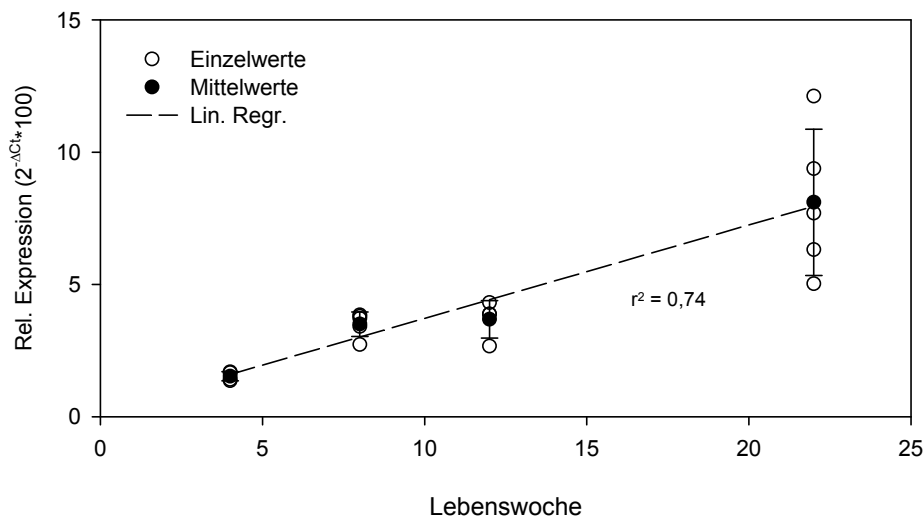


Abb. 3.18: Plot der Expression von *Tbc1d1* im Skelettmuskel von C57BL/6J-Tieren im Zeitverlauf. Es wurden qRT-PCR-Experimente mit cDNAs von je 4-8 weiblichen Mäusen durchgeführt, die mit SD gefüttert wurden. Es zeigte sich, dass die mRNA-Expression von *Tbc1d1* im Skelettmuskel mit zunehmendem Lebensalter der Tiere signifikant stärker wurde (C57BL/6J: $r^2 = 0,74$).

3.6 Untersuchung weiterer Kandidatengene

Zwei weitere Gene wurden aufgrund ihrer differentiellen Expression zwischen NZO- und SJL-Mäusen näher mit Hilfe der qRT-PCR untersucht.

Das Gen *Abhydrolase domain containing 1 (Abhd1)*, ein transmembranes Protein (Edgar und Polak, 2002), ist auf Chr. 5 bei 23 Mbp lokalisiert und damit in der Nähe des *Peak*-Bereichs des Adipositas-QTL *Obq11* (Taylor *et al.*, 2001).

Für das Gen *Abhd1* zeigte sich eine generell niedrigere Expression bei NZO- im Vergleich zu SJL-Tieren. Signifikante Unterschiede wurden im braunen Fettgewebe ($1,03 \pm 0,31$ vs. $0,09 \pm 0,05$), Leber ($1,01 \pm 0,17$ vs. $0,27 \pm 0,20$), Niere ($7,01 \pm 0,40$ vs. $0,66 \pm 0,14$), Dünndarm ($1,05 \pm 0,24$ vs. $0,24 \pm 0,20$) und Hypothalamus ($0,47 \pm 0,12$ vs. $0,11 \pm 0,03$) detektiert. Eine tendenziell erniedrigte Expression zeigte sich bei NZO-Mäusen im Vergleich zu SJL-Mäusen im Skelettmuskel ($1,21 \pm 0,80$ vs. $1,00 \pm 0,73$) und Pankreas ($0,69 \pm 0,65$ vs. $0,53 \pm 0,64$) (Abb. 3.19).

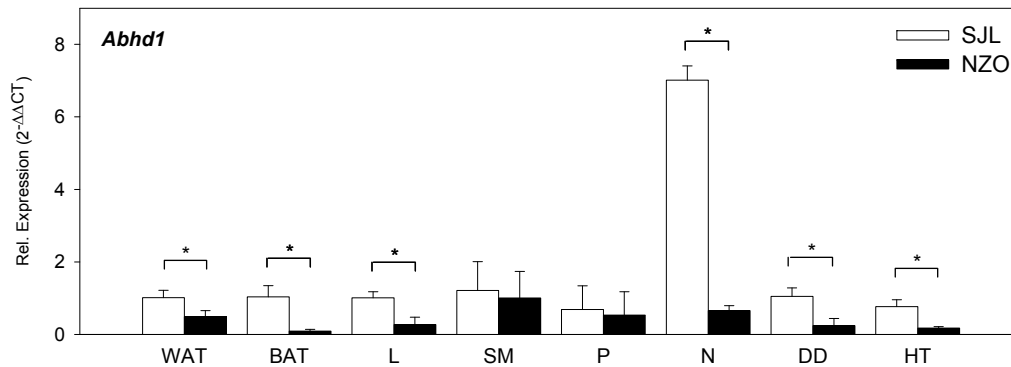


Abb. 3.19: Expressionsunterschiede des Gens *Abhd1* in verschiedenen Geweben von SJL- und NZO-Mäusen. SJL-Männchen zeigten eine signifikant höhere Expression des Gens *Abhd1* im WAT, BAT, Leber (L), Niere (N), Dünndarm (DD) und Hypothalamus (HT). Im Skelettmuskel (SM) und Pankreas (P) war dieser Unterschied nicht zu beobachten. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3-6 Experimenten; * $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test).

Das Gen *Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein (Alox5ap)* codiert für das aktivierende Protein des Enzyms 5-Lipoxygenase (5LO), das den ersten Schritt der Synthese von Leukotrien B4 (LTB4) aus Arachidonsäure katalysiert (Dixon *et al.*, 1990). Es wird dem distalen Ende des Chr. 5 zugeordnet und ist als Suszeptibilitätsgen für Adipositas und Insulinresistenz sowie Schlaganfall bekannt (Helgadottir *et al.*, 2004; Kaaman *et al.*, 2006). Die fehlende Expression des Gens *Alox5ap* bei SJL-Mäusen im weißen Fettgewebe wurde in allen anderen untersuchten Geweben bestätigt: BAT, Leber, Skelettmuskel, Pankreas, Niere, Dünndarm und Hypothalamus (Abb. 3.20).

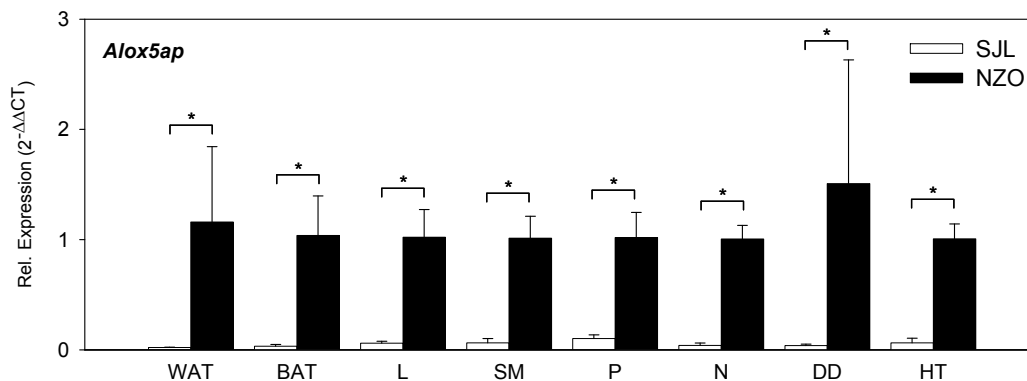


Abb. 3.20: Expressionsunterschiede des Gens *Alox5ap* in verschiedenen Geweben von SJL- und NZO-Mäusen. SJL-Männchen zeigten keine Expression des Gens *Alox5ap* in allen untersuchten Geweben. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3-6 Experimenten; * $p < 0,05$ (Mann-Whitney-Test). WAT – weißes Fettgewebe, BAT – braunes Fettgewebe, L – Leber, SM – Skelettmuskel, P – Pankreas, N – Niere, DD – Dünndarm, HAT - Hypothalamus

Die Sequenzierung der codierenden cDNA-Bereiche beider Gene wies keine Unterschiede in der Basenfolge zwischen SJL- und NZO-Mäusen auf. Die 5'UTR sowie die genomischen Regionen, die ca. 1,5 kbp proximal der Gene lokalisiert sind und mögliche Promotorsequenzen enthalten, wurden nicht sequenziert, da eine PCR-Amplifikation dieses Bereichs bisher erfolglos war.

4 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Kandidatengene für Adipositas im Bereich des QTL *Nob1* identifiziert werden.

Dazu wurden mRNA-Expressionsanalysen (Macro- und Microarrays) mit 302 *Nob1*-Genen in den Geweben weißes und braunes Fett, Skelettmuskel, Hypothalamus sowie Leber durchgeführt und auf Expressionsunterschiede zwischen den Parentalstämmen NZO und SJL untersucht. Die Validierung erfolgte mit Hilfe der quantitativen *Real-Time*-PCR (qRT-PCR). Die cDNAs differentiell exprimierter Gene wurden auf Sequenzunterschiede (NZO vs. SJL) überprüft.

4.1 Auswahl des Mausmodells für die Expressionsanalysen

Der Adipositas-QTL *Nob1* wurde in einem Rückkreuzungsmodell der Kreuzungspartner NZO und SJL identifiziert (Kluge *et al.*, 2000). Der NZO-Stamm stellt in dieser Kreuzung das Modell für eine frühe Diät-induzierbare Adipositas dar, während der SJL-Stamm den schlanken Gegenpart übernimmt, der resistent gegenüber einer Diät-induzierten Adipositas ist (Jürgens *et al.*, 2006; Festing 1997).

Die ideale Vorgehensweise zur Untersuchung der *Nob1*-Gene auf eine genotypabhängige Expression wäre die Analyse der Gewebe-RNA der ursprünglichen Rückkreuzungspopulation, in der der QTL identifiziert wurde: Tiere mit dem Genotyp $Nob1^{NZO/NZO}$ im Vergleich zu $Nob1^{SJL/SJL}$. Dies war aus technischen Gründen nicht möglich. Die gesamte Rückkreuzungspopulation (> 450 Tiere) wurde bis zur Lebenswoche 22 phänotypisch charakterisiert. Daher kamen diese Tiere für die geplanten Genexpressionsanalysen in Lebenswoche 8 bis 12 nicht in Frage. Daher wurden die Expressionsanalysen mit RNA aus Geweben der Parentalstämmen NZO und SJL durchgeführt. Es wurden weibliche Tiere verwendet, da männliche NZO-Mäuse nach Gabe einer HFD einen Typ2-Diabetes mellitus entwickeln, der zu einer Gewichtsabnahme führt (Leiter und Reifsnyder, 2004; Kluge *et al.*, 2000). Weibliche NZO-Tiere dagegen nehmen unter HFD-Bedingungen ebenfalls stärker zu als unter SD-Bedingungen, sie werden aber nicht diabetisch. Vermutlich ist dies eine Folge des antidiabetischen Einflusses von Östrogen (Le May *et al.*, 2006; Louet *et al.*, 2004). Wie in Tab. 3.1 gezeigt, wiesen NZO-Mäuse generell ein höheres Körpergewicht als SJL-Mäuse auf. Dieser Unterschied war bei Gabe einer HFD noch deutlicher. Ortlepp und Kollegen zeigen ebenfalls eine größere Körperlänge von NZO-Mäusen im Vergleich zu SJL-Mäusen (Ortlepp *et al.*, 2000). Weiterhin zeigten NZO-Mäuse eine Suszeptibilität für Hochfett-Diät-abhängige Gewichtszunahme, die bei SJL-Mäusen nicht zu beobachten war (Tab. 3.1).

Für die mRNA-Analysen wurden Tiere verwendet, die acht Wochen alt waren, um einen möglichst frühen Zeitpunkt der Adipositas auf Ebene der Genexpression zu untersuchen (5-wöchige Fütterung der entsprechenden Diät).

4.2 Expressionsanalysen mit Hilfe von Macroarrays und Microarrays

Zur Identifizierung unterschiedlich exprimierter Gene auf Chr. 5 zwischen den Mausstämmen NZO und SJL wurden im Rahmen dieser Arbeit Macroarray- und Microarray-Experimente durchgeführt. Mit Hilfe der selbst hergestellten Macroarrays wurde die Expression von 302 Transkripten des *Nob1* im Bereich 29-93 Mbp untersucht.

In einer RNAi-Studie beim Fadenwurm *C. elegans* wurden mehr als 400 Gene identifiziert, die den Fettgehalt des Wurms beeinflussen (Ashrafi *et al.*, 2003). Das sind ca. 2,5 % der bekannten *C. elegans*-Transkripte (ca. 16 800 Transkripte; *Wormbase*; <http://www.wormbase.org>). Werden diese 2,5 % auf die bekannten Transkripte des humanen Genoms übertragen (>26 000 Transkripte; *Ensembl Build 50*, 2006), ergeben sich ungefähr 650 Transkripte, die den Körperfettgehalt beeinflussen könnten. Die mehr als 400 den Fettgehalt verändernden *C. elegans*-Gene wurden von Annette Schürmann und Hadi Al-Hasani daraufhin analysiert, ob orthologe Mausgene in Gendatenbanken vorlagen. In einer weiteren Selektion identifizierten sie 38 dieser Mausgene, die einem aus NZO identifizierten QTL für verändertes Körpergewicht zugeordnet werden konnten. Diese Gene wurden mit Hilfe der Macroarrays zusätzlich zu den *Nob1*-Genen auf Expressionsunterschiede zwischen NZO- und SJL-Mäusen analysiert.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zusätzlich Expressionsanalysen mit Hilfe der Microarray-Technik durchgeführt. Für die vorliegende Arbeit wurden nur die Transkripte mit unterschiedlicher Expression zwischen den Mausstämmen SJL und NZO auf Chromosom 5 betrachtet.

In Tab. 3.6 sind die Transkripte im *Nob1*-Bereich dargestellt, deren mRNA-Expression exklusiv mit Macroarrays bzw. Microarrays untersucht wurden. Beide Methoden decken den größten Teil der Transkripte im *Nob1* ab. Mit den Macroarrays wurden exklusiv acht Transkripte mit beschriebenem Protein und drei Genmodelle ohne beschriebenes Protein im *Nob1* untersucht, während mit den Microarrays exklusiv zwölf Genmodelle ohne beschriebenes Protein analysiert wurden.

4.2.1 Differentiell exprimierte Gene

Die Expressionsanalysen erfolgten mit RNAs weiblicher NZO- und SJL-Mäuse, die aus den Geweben weißes und braunes Fett, Skelettmuskel, Hypothalamus sowie Leber isoliert

wurden. Die Arrays wurden mit revers transkribierten cDNAs dieser Gewebe-RNAs hybridisiert.

Die Hybridisierung der Macroarrays erfolgte mit radioaktiv markierten cDNAs. Die Strahlungsintensität der einzelnen Spots wurde durch Exposition des Arrays auf einen Phosphorlamer-Film und die anschließende Detektion durch einen Phosphorlamer gewährleistet. Die Affymetrix-Microarrays wurden mit Biotin-markierten antisense-cRNAs hybridisiert. Die Auswertung der Expressionsintensitäten der Gene erfolgte für die Macroarrays mit Hilfe der *ImageQuant*-Software bzw. für die Microarrays in Zusammenarbeit mit der Firma Microdiscovery (Berlin).

In den Macroarray-Experimenten zeigten die Gene *Mpv 17*, *Ppp1cb*, *Letm 1*, *Mrfap 1*, *Cpeb2*, *Qdpr*, *2310045A20Rik*, *Pgm1*, *Tbc1d1*, *Gabra 4*, *Igfbp7* eine differentielle Expression zwischen NZO- und SJL-Mäusen. Die Microarray-Experimente zeigten für die Gene *Mll5*, *Insig1*, *Abhd1*, *Ppp1cb*, *Spink2*, *Aacs*, *Alox5ap* eine differentielle Expression zwischen NZO- und SJL-Mäusen (Tab. 3.7). Die Änderung der Expression zwischen den Stämmen schwankte zwischen 1,2- bis 6,6-fach.

Die anschließende quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) verifizierte folgende differentiell exprimierte Gene:

2310045A20Rik*, *Tbc1d1*, *Mll5*, *Ppp1cb*, *Insig1*, *Abhd1* und *Alox5ap

Nur zwei von elf Genen, die mit den Macroarray-Analysen eine differentielle Expression zeigten, konnten mit Hilfe der qRT-PCR validiert werden. Bei den Microarray-Experimenten wurde die differentielle Expression bei fünf von sieben Genen bestätigt (Tab. 3.7; Abb. 3.7). Somit weisen die Microarrays eine deutlich bessere Validierungsrate auf.

Die Analyse der Expression der 38 Kandidatengene aus dem *C. elegans*-Screening zeigte keine Unterschiede zwischen NZO- und SJL-Mäusen.

4.3 Sequenzierung der Kandidatengene

Die Gene mit differentieller mRNA-Expression zwischen den Mausstämmen NZO und SJL auf Chr. 5 wurden auf Unterschiede in der Basensequenz untersucht. Dazu wurden die codierenden Bereiche der betreffenden Gene sequenziert. Dies umfasste ca. 17 kbp. *Insig1* wurde von Katja Schmolz im Rahmen ihrer Dissertation sequenziert.

Der einzige Unterschied in der Basenabfolge zwischen NZO- und SJL-Mäusen wurde für *Tbc1d1* detektiert. Die Deletion von sieben Basen im Exon 18 des SJL-Gens (4047delACTCGCT) führt zu einer Verschiebung des Leserasters und zu einem vorzeitigen Stop-Codon (Abb. 3.9B). *Tbc1d1* (*tre-2/USP6*, *BUB2*, *cdc16 domain family member 1*) gehört

zur Familie der Rab-GAP-Proteine (*Rab-GTPase activating proteins*). Es ist das nächstverwandte Gen zum Rab-GAP-Protein *AS160 (Tbc1d4)*. Das vorzeitige Stop-Codon im SJL-Gen befindet sich in der funktionellen GAP-Domäne (TBC-Domäne). Das resultierende Protein bricht in dieser TBC-Domäne ab, so dass die katalytische Funktion nicht mehr gewährleistet ist (*nonsense mutation*, Abb. 3.9C).

Beim Inzuchtmausstamm SJL ist eine weitere Mutation beschrieben, die eine Veränderung des Phänotyps zur Folge hat. Das Gen Dysferlin (*Dysf*) weist eine Deletion von 171 bp auf. Das dadurch um 57 Aminosäuren verkürzte Protein führt zu einer Muskeldystrophie bei SJL-Mäusen ab einem Alter von 6-8 Monaten (Weller *et al.*, 1997; Bittner *et al.*, 1999).

Nonsense-Mutationen treten auch bei anderen Inzuchtstämmen auf. Frazer und Mitarbeiter führten eine Sequenzanalyse verschiedener Mausinzuchtstämmen durch (Frazer *et al.*, 2007). Sie identifizieren beim Referenzmausstamm C57BL/6J zehn Gene, die eine *nonsense*-Mutation aufweisen (*Atp10d*, *Ttk*, *Mtg1*, *Gprc2a-rs1*, *Olf421*, *Ptprv*, *Klra12/13/23*, *2610208M17Rik*, *5832418A03Rik*, *Camp*). Mögliche Veränderungen des Phänotyps, die durch das vorzeitige Stop-Codon verursacht werden, sind jedoch nicht bekannt.

4.3.1 Deletion im *Tbc1d1*-Gen ist SJL-spezifisch

Die Sequenzierung von Exon 18 des *Tbc1d1*-Gens bei mehreren Mausstämmen zeigte die Stammspezifität der Deletion von sieben Basen bei SJL-Mäusen (SJL/NBom). Dabei wurden sowohl nah verwandte Mausstämmen (SJL/J, SWR/J, FVB/N) als auch einige entfernt verwandte Mausstämmen (C57BL/6J, NZO, NZB, NON, SM, AKR) untersucht. Keiner der entfernt verwandten Stämme trägt die Deletion von sieben Basenpaaren in Exon 18 des Gens *Tbc1d1*. Von den nah verwandten Stämmen ist die SJL/J-Sublinie die Einzige, die diese Mutation aufweist. Weder bei SWR/J noch bei FVB/N-Mäusen wurde die Deletion detektiert.

Die Stammspezifität der *Tbc1d1*-Deletion wirft die Frage nach dem Zeitpunkt der Mutation auf. Der von Petkov und Mitarbeitern erstellte Sequenz-basierte Stammbaum von Maus-Inzuchtstämmen (Abb.3.10A) zeigt die enge Verwandtschaft der SJL-Sublinien SJL/NBom und SJL/J mit den Stämmen FVB/NJ und SWR/J (Petkov *et al.*, 2004). In der Genealogie von Beck und Mitarbeitern (Abb.3.10B) ist ebenfalls die nahe Verwandtschaft der Mauslinien SJL/J, SWR/J und FVB/N zu sehen. In dieser Übersicht sind Jahreszahlen zu Abspaltungen und Kreuzungen von Mauslinien angegeben (Beck *et al.*, 2000).

Für die Stämme SWR/J, FVB/N, SJL/J und SJL/NBom ist eine gemeinsame *nonsense*-Mutation (C/A-Austausch in Codon 347) im Gen Phosphodiesterase 6B (*Pde6b*) bekannt, die zur Degradation der Retina führt (Pittler und Baehr, 1991). Diese gemeinsame Mutation ist laut der Stammbäume schon vor 1924 aufgetreten. Die SJL-spezifische LOF-Mutation im

Gen *Tbc1d1* dagegen kann erst nach 1932 entstanden sein, da in diesem Jahr zwei *Swiss-Webster*-Subpopulationen (Mäuse von CJ Lynch und LT Webster) miteinander verpaart wurden. Aus den Mäusen von LT Webster entstand durch weitere Züchtungen die FVB/N-Linie, die die 7 bp-Deletion im *Tbc1d1*-Gen nicht trägt. SWR/J-Mäuse, die ebenfalls keine *Tbc1d1*-Mutation aufweisen, haben ihren Ursprung in *Swiss-Webster*-Mäusen aus der Zucht von CJ Lynch. Die Aufspaltung des SJL-Stammes in die Sublinien SJL/J und SJL/NBom fand sehr früh statt. Somit muss die Mutation in dem Zeitraum zwischen 1932 und der Aufspaltung der SJL-Sublinien aufgetreten sein.

4.4 *Tbc1d1*^{SJL} – kausale Genvariante für QTL *Nob1*

Zur Identifizierung der genetischen Herkunft des kausalen Allels von *Nob1* wurden in unserer Abteilung weitere Kreuzungsexperimente durchgeführt. In Kreuzungen von NZO mit NZB (Schmolz, Dissertation 2008) sowie NZO mit C57BL/6J (B6) (Vogel, Diplomarbeit 2005) konnte keine Abhängigkeit des Körpergewichtes vom Genotyp am *Nob1*-Locus gefunden werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass dem Gewichtseffekt des QTL *Nob1* eine oder mehrere suppressive Genvarianten des SJL-Stammes zugrunde liegen. Diese Hypothese wird durch die Zucht einer rekombinant kongenen Mauslinie von Stephan Scherneck bestätigt, bei der ein 24 Mbp-großes Fragment des *Nob1* (*Nob1.24*; 53-77 Mbp) von der SJL-Maus auf einem C57BL/6J-Hintergrund übertragen wurde (Introgression). Tiere, die homozygot und heterozygot für das SJL-Allel sind (*Nob1.24*^{SJL/SJL}, *Nob1.24*^{SJL/B6}) weisen ein signifikant geringeres Körpergewicht und eine verringerte Fettmasse auf als Tiere, die homozygot das B6-Allel (*Nob1.24*^{B6/B6}) tragen (Scherneck, unveröffentlichte Daten). Aufbauend auf diese Linie wurde das *Nob1.24*-Fragment durch Rückkreuzung mit B6-Tieren auf ca. 10 Mbp verkleinert (*Nob1.10*; 64-74 Mbp). Auch dieses Fragment führt bei Vorliegen eines *Nob1.10*-SJL-Genotyp (homo- oder heterozygot) zu verringertem Körpergewicht und Fettmasse im Vergleich zum homozygoten *Nob1.10*-B6-Genotyp (Chadt *et al.*, 2008).

4.4.1 Haplotypenanalyse

Neben Expressionsanalysen und Sequenzierungen von Genen kann zur Identifizierung von Kandidatengenen auch eine Haplotypenanalyse durchgeführt werden (Dokmanovic-Chouinard *et al.*, 2008; Pletcher *et al.*, 2004). Dieses Konzept setzt eine gemeinsame Vererbung von genomischen Blöcken voraus, ohne dass eine Rekombination innerhalb dieser Blöcke stattfindet. Demnach weisen nicht-polymorphe Bereiche zwischen zwei Maus-Inzuchtstämmen auf eine nahe Verwandtschaft hin, während polymorphe Bereiche auf eine länger zurückliegende Rekombination deuten und demzufolge keine nahe Verwandtschaft anzunehmen ist (Paigen *et al.*, 2008; Reuveni *et al.*, 2007; Petkov *et al.*, 2005). Mit der Haplotypenanalyse wurden Verwandtschaftsverhältnisse von Maus-Inzuchtstämmen bestimmt und Stammbäume erstellt (Frazer *et al.*, 2007; Petkov *et al.*, 2004). Haplotypen

werden mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern und SNPs bestimmt. Die Dichte dieser Marker variiert zwischen verschiedenen Mausstämmen. Der C57BL/6J-Stamm gehört zu den Stämmen mit sehr hoher Markerdichte (> 10 Mio. SNPs gesamt), für den SJL-Stamm (mittlere Markerdichte) sind >166 000 SNPs beschrieben. Der NZO-Stamm dagegen gehört zu einer Gruppe mit geringer Markerdichte (ca. 27 000 SNPs gesamt), somit vergrößert sich der Abstand zwischen den beschriebenen Markern. Die Markerdichte variiert beim NZO-Stamm z.B. für die *Nob1*-Region zwischen wenigen Basenpaaren und mehr als 300 Kilobasenpaaren. Da für die Bereiche zwischen den Mikrosatellitenmarkern und SNPs keine Information über mögliche Sequenzunterschiede vorliegen und die meisten Marker in intronischen Sequenzen von Genen oder in Bereichen zwischen Genen liegen, in denen keine funktionellen Mutationen vermutet werden, kann die Haplotypenanalyse bei Stämmen mit geringer Markerdichte nur eine Approximierung über polymorphe bzw. nicht-polymorphe Chromosomenabschnitte sein. Yalcin und Mitarbeiter fanden eine unerwartet hohe Komplexität der Haplotypen zwischen den von ihnen untersuchten Stämmen A/J, AKR, BALB, C3H, C57BL/6, DBA, I und RIII. Sie raten deshalb davon ab, Kandidatengene nur aufgrund einer Haplotypenanalyse zu identifizieren (Yalcin *et al.*, 2004).

Eine Haplotypenanalyse der *Nob1*.10-Region zur Identifizierung von SJL-spezifischen Polymorphismen zwischen den Mausstämmen SJL und NZO zeigte insgesamt 189 beschriebene SNPs, für die Allelinformationen der beiden Mausstämme vorlagen – unabhängig davon, ob sich die Allele unterschieden. In die Analyse wurden zusätzlich die Stämme NZB und C57BL/6J einbezogen, da deren Kreuzung mit dem NZO-Stamm keine Abhängigkeit des Körpergewichtes vom *Nob1*-Genotyp zeigte. Die Anzahl der beschriebenen SNPs, für die Allelinformationen aller Mausstämme vorlagen, änderte sich nicht (siehe Tab. A3 im Anhang; <http://www.jax.org/phenome/snp.html>). Von diesen 189 SNPs sind 89 SNPs SJL-spezifisch. Sie werden sechs Genen zugeordnet, wobei allein 83 SNPs in Introns des Gens *Corin* lokalisiert sind. Vier weitere SNPs sind Introns der Gene *Txk*, *Tec* und *Slain2* zugeordnet. Die verbliebenen zwei SNPs liegen (1) im untranslatierten Genbereich von *Cnga1* (rs31537882) bzw. (2) in Exon 4 des Gens *Rasl11b* (rs13478326). Dieser codierende SNP führt jedoch nicht zu einem Aminosäureaustausch. Für den SNP im UTR von *Cnga1* kann eine funktionelle Mutation nicht ausgeschlossen werden, ohne das Gen auf Expressionsunterschiede zu untersuchen. Die chromosomale Lokalisation von *Cnga1* ist jedoch ca. 10 Mbp vom *Nob1*-Peak entfernt, was nicht auf einen kausalen Zusammenhang zum *Nob1*-Phänotyp hinweist. Wird die Haplotypenanalyse auf den *Peak*-Bereich des *Nob1* (62-66 Mbp) begrenzt, gibt es keinen einzigen SJL-spezifischen SNP.

Diese Methode ist demnach nicht für die Identifizierung von Mutationen geeignet, die erst in den letzten 50-60 Jahren auftraten, wie es für die Deletion im *Tbc1d1*-Gen des SJL-Stammes der Fall ist, sondern für Mutationen, die schon bei Stämmen auftraten, aus denen sich durch weitere Zucht verschiedene Linien entwickelten, die diese Mutationen ebenfalls tragen.

4.4.2 Sequenzierung von anderen Genen in der *Peak*-Region des *Nob1*

Die *Nob1-Peak*-Region wird aufgrund eines polymorphen Haplotypenblocks zwischen NZO- und SJL-Mäusen durch die Mikrosatellitenmarker D5Mit82 und D5Mit15 (60,3 Mbp bzw. 65,8 Mbp) begrenzt (Abb. 4.1).

Tbc1d1 ist im *Peak*-Bereich des QTL *Nob1* lokalisiert (64 Mbp; White *et al.*, 2000)). Wie in Abb. 3.11 dargestellt, sind in der *Nob1-Peak*-Region insgesamt 19 Gene lokalisiert (62-66 Mbp). Mit Hilfe der Sequenzierung wurden diese Gene auf weitere Varianten analysiert, die für den Effekt des *Nob1* verantwortlich sein können. Zu diesem Zweck wurden die codierenden Bereiche dieser Gene auf Unterschiede in der Basensequenz zwischen SJL- und C57BL/6J-Mäusen untersucht. Neben der 7 bp-Deletion im *Tbc1d1*-Gen von SJL-Mäusen wurden zwölf SNPs in sechs Genen identifiziert (Tab. 3.8). Alle SNPs wurden jedoch ebenfalls im NZB-Stamm detektiert. Damit können diese Genvarianten nicht für den suppressiven Gewichtseffekt des *Nob1* verantwortlich sein, da der *Nob1* in der Kreuzung von NZO- mit NZB-Mäusen nicht bestätigt werden konnte (Schmolz, Dissertation 2008). Mutationen in intronischen Bereichen bzw. in den 5'-flankierenden Regionen der Gene, die zu einer Änderung des Phänotyps der Mäuse führen, können nicht ausgeschlossen werden, da diese Sequenzen nicht auf SJL-spezifische Unterschiede analysiert wurden.

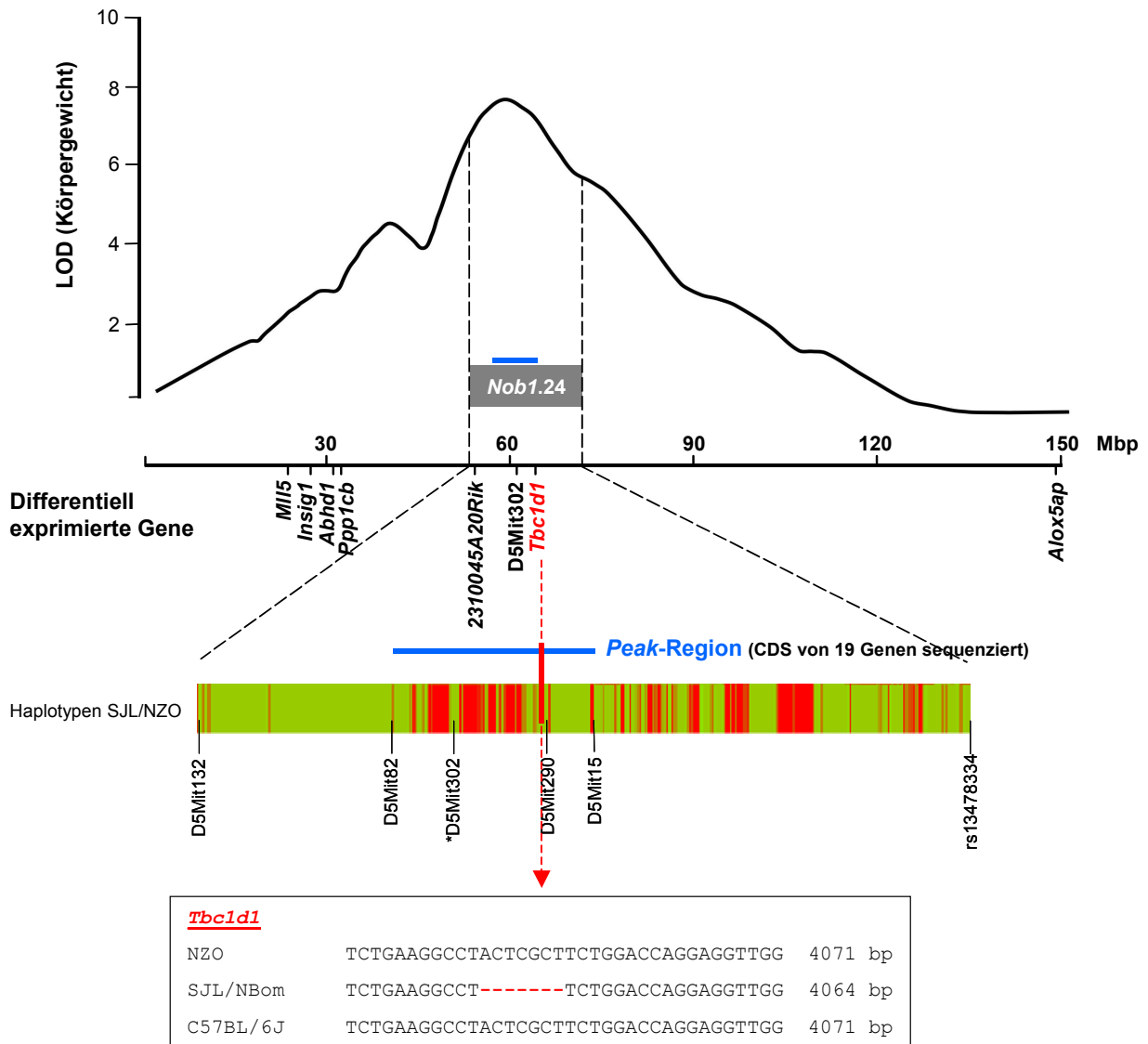


Abb. 4.1: Positionelle Klonierung von *Tbc1d1* im Adipositas-QTL *Nob1*. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen wurden sieben Gene auf Chr. 5 identifiziert, die eine differentielle mRNA-Expression zwischen den Mausstämmen NZO und SJL zeigten. Die Sequenzierung der codierenden Abschnitte dieser Gene zeigte eine SJL-spezifische Deletion von sieben Basen im Gen *Tbc1d1* (rot), die zum vorzeitigen Abbruch des Proteins in der funktionellen Rab-GAP-Domäne führt (*loss-of function*-Mutation). Eine rekombinant kongene Mauslinie, die ein 24 Mbp-großes SJL-Fragment des *Nob1* trägt (*Nob1.24*), zeigt geringere Körpergewichte als Wildtyp-Tiere. Innerhalb dieses *Nob1.24* ist die *Nob1*-Peak-Region aufgrund eines polymorphen Haplotypenblocks lokalisiert (D5Mit82-D5Mit15; 60-66 Mbp), der 19 Gene zugeordnet sind. In den codierenden Bereichen dieser Gene wurde keine weitere SJL-spezifische Mutation detektiert.

4.4.3 Verringerte Expression von *Tbc1d1* bei SJL-Mäusen

Tbc1d1 zeigt eine deutlich verringerte mRNA-Expression bei SJL-Mäusen im Vergleich zu NZO-Tieren in allen untersuchten Geweben (Abb. 3.12). Dieser Befund wurde durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen *TaqMan*-Sonden validiert. Der Expressionsunterschied kann nicht auf Sequenzunterschiede zwischen SJL und NZO im genomischen Bereich 1,5 kbp proximal des Gens zurückgeführt werden, da die Basenabfolge keine Unterschiede zwischen beiden Stämmen aufweist. Befindet sich der Promotor proximal dieses Bereiches oder in Introns des *Tbc1d1*-Gens, kann hier keine Aussage über mögliche Sequenzunterschiede und deren Folgen auf die Expression getroffen werden, da diese Regionen nicht sequenziert wurden.

Wahrscheinlicher ist allerdings der Abbau der *Tbc1d1*-mRNA bei SJL-Mäusen durch *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). Eukaryotische Zellen haben Mechanismen zur Qualitätskontrolle ihrer mRNA, so dass nur komplette und fehlerfreie mRNAs translatiert werden. Nach dem Speißen der mRNA sind die Exon-Exon-Übergänge durch Exon-*junction*-Komplexe (EJC) markiert. Diese Proteinkomplexe werden während der Translation der mRNA von Ribosomen entfernt. Beim Auftreten einer *nonsense*-Mutation bleibt ein EJC nach dem Stop-Codon erhalten. Bei der Translation bindet der Proteinkomplex SURF an das Translationsende der mRNA. Befindet sich nun ein EJC mehr als 50-55 bp vom Stop-Codon entfernt, phosphoryliert eine im SURF-Komplex befindliche Kinase einen Faktor, der am EJC bindet, was den NMD zur Folge hat (Rio Frio *et al.*, 2008; Übersichtsdarstellungen sind Isken und Maquat, 2007 sowie Behm-Ansmant und Izaurralde, 2006).

4.4.4 *Tbc1d1*-Expressionsprofil und –Isoformen bei NZO-Mäusen

Das mRNA-Expressionsmuster von *Tbc1d1* in NZO-Mäusen zeigte eine gewebsspezifische Verteilung. In Skelettmuskel, Herz, Pankreas, Niere und Hypothalamus zeigte sich eine stärkere Expression, während in weißem und braunem Fettgewebe, Leber, Dünn- und Dickdarm nur eine geringe Expression detektiert wurde (Abb. 3.12). Auch beim Menschen ist eine vorwiegende Expression in Skelettmuskel und Herz zu finden (Stone *et al.*, 2006).

Im Zug der Klonierung von *Tbc1d1* wurden zwei Isoformen identifiziert. Die lange Isoform umfasst 22 Exone, für die kurze Isoform wird Exon 11 alternativ mit Exon 14 verbunden. Die Basensequenz der Exone 12 und 13 codieren für 93 Aminosäuren, die auch in TBC1D1-Proteinsequenzen von Ratte und Schimpanse, allerdings nicht beim Menschen gefunden werden. Die Expression dieser *splice*-Varianten wurde mit Hilfe von zwei *TaqMan*-Sonden in qRT-PCR-Analysen validiert. Dabei zeigte sich eine gewebsspezifische Expression. So wurde die lange Isoform überwiegend in Skelettmuskel, Herz und Hypothalamus exprimiert, während in weißem Fettgewebe, Niere und Pankreas fast ausschließlich die kurze Isoform

zu finden war (Abb. 3.13). Diese gewebsspezifische Isoformverteilung von *Tbc1d1* deckt sich mit der von humanem *AS160* (Baus *et al.*, 2008), dessen lange Isoform ebenfalls überwiegend in Skelettmuskel und Herz exprimiert wird. Die kurze Isoform, der Exon 11 und 12 fehlen, wird in den meisten humanen Geweben exprimiert.

Aufgrund der prädominanten Expression der *Tbc1d1*-mRNA im Skelettmuskel wurden die weiteren Experimente mit Skelettmuskel-cDNA durchgeführt. Hierfür ist der verwendete Muskeltyp von Bedeutung, da sich glykolytische und oxidative Muskeltypen in ihrer Substratverwertung und Funktion unterscheiden (Widmaier *et al.*, 2004). *Tbc1d1*-mRNA wurde fast ausschließlich in glykolytischen Muskelfasertypen des *M. Gastrocnemius* nachgewiesen, während die mRNA in oxidativen Fasern des *M. Soleus* so gut wie nicht zu detektieren war (Abb. 3.15). Diese Ergebnisse werden durch Daten von Taylor und Mitarbeitern bestätigt, die eine sieben- bis zehnfach höhere *Tbc1d1*-Expression (mRNA und Protein) in glykolytischen Muskelfasern von *Tibialis anterior* und *Extensor digitorum* im Vergleich zum *M. Soleus* nachweisen. Im Gegensatz dazu wird *AS160* überwiegend in Fasern des *M. Soleus* sowie im weißen und braunen Fettgewebe exprimiert (Taylor *et al.*, 2008).

Die nahe Verwandtschaft von *Tbc1d1* und *AS160* sowie ihre vermutlich ähnliche Substratspezifität (Rab2, Rab8a, Rab10; Roach *et al.*, 2007) lässt die Vermutung zu, dass bei SJL-Tieren das fehlende *Tbc1d1* durch eine verstärkte Expression von *AS160* kompensiert wird. Diese Hypothese wurde jedoch nicht bestätigt. Nur im weißen Fettgewebe von SJL-Mäusen wurde eine höhere mRNA-Expression von *AS160* detektiert als bei NZO-Mäusen (Abb. 3.14). Allerdings wurde dieser Befund im Rahmen dieser Arbeit nicht auf Proteinebene untersucht.

4.4.5 *Tbc1d1*-Expression ist nicht gewichtsabhängig

Der Befund der geringeren Expression von *Tbc1d1* bei schlanken SJL-Mäusen führte zur Vermutung, dass *Tbc1d1* bei adipösen Mausmodellen verstärkt exprimiert sein könnte.

Um dies zu überprüfen wurde die mRNA-Expression von *Tbc1d1* im Skelettmuskel (*M. Gastrocnemius* gesamt) von schlanken C57BL/6J- (B6) und adipösen C57BL/6J^{ob/ob}-Mäusen (ob/ob) verglichen. Diese beiden Modellstämme wurden für den Vergleich ausgewählt, da der adipöse Phänotyp der ob/ob-Mäuse nur auf eine Punktmutation im Leptin-Gen zurückzuführen ist (monogene Adipositas). Der Gewichtsunterschied der untersuchten Mäuse betrug ca. 20-25 g. Die Expressionsanalyse von *Tbc1d1* in Skelettmuskeln der Stämme C57BL/6J (B6) und C57BL/6J^{ob/ob} (ob/ob) wies jedoch keine signifikanten Unterschiede auf.

Weiterhin wurde die mRNA-Expression von *Tbc1d1* bei B6-Mäusen mit der von NZO-Mäusen verglichen, wobei NZO-Mäuse ein polygenes Adipositasmodell darstellen (Gewichtsunterschied der untersuchten Tiere ca. 15-20 g). Überraschenderweise zeigten NZO-Tiere im Vergleich zu B6-Tieren eine signifikant geringere Expression von *Tbc1d1* (Abb. 3.16).

Somit kann nicht von einer gewichtsabhängigen *Tbc1d1*-Expression ausgegangen werden, da die mRNA-Expression bei schlanken B6-Mäusen und monogen adipösen ob/ob-Mäusen keine Unterschiede aufwies, und die mRNA-Expression von *Tbc1d1* bei B6-Mäusen sogar höher war als bei polygen adipösen NZO-Mäusen.

Daraufhin wurde die mRNA-Expression von *Tbc1d1* bei NZO- und B6-Mäusen mit unterschiedlichem Alter und Gewicht untersucht. Wie in Abb. 3.17 dargestellt, gibt es einen tendenziellen Anstieg der *Tbc1d1*-mRNA-Expression mit wachsenden Körpergewichten verschiedener weiblicher NZO-Mäuse, der bei Fütterung einer HFD etwas stärker ist als bei SD-gefütterten Tieren. Bei C57BL/6J-Mäusen korreliert der Anstieg der *Tbc1d1*-mRNA-Expression im Skelettmuskel mit zunehmendem Lebensalter und damit indirekt mit steigendem Körpergewicht (Abb. 3.20).

4.4.6 Mögliche Funktion von *Tbc1d1*

TBC1D1 zählt zur Proteinfamilie der Rab-GAPs, die bei Mäusen mehr als 20 Proteine umfasst (<http://www.ensembl.org>). Im menschlichen Genom werden mehr als 50 Rab-GAPs gefunden (Pfeffer, 2005). Rab-GAP-Proteine besitzen eine TBC-Domäne (*Tre-2*, *Bub2* and *Cdc16*, TBC), die für ihre GTPase-aktivierende Funktion essentiell ist (Pan *et al.*, 2006; Albert *et al.*, 1999). Rab (*Ras-related in brain*) -Proteine sind kleine hochkonservierte GTPasen, die eine zentrale Stellung in der Regulation vesikulärer Transportprozesse einnehmen (Übersichtsdarstellungen sind Grosshans *et al.*, 2006 sowie Stenmark und Olkkonen, 2001). Einige Rab-Proteine (Rab5 und Rab6) werden mit der Translokation von Proteinen zu ihren intrazellulären Speicherkompartimenten in Verbindung gebracht (Nielsen *et al.*, 1999; Echard *et al.*, 1998).

Rab-GAP-Proteine sind hochkonserviert von Bakterien bis zum Menschen. Die orthologen Proteine in der Hefe werden Gyp-Proteine (*GAPs for Ypt/Rab proteins*) genannt. Für das am Golgi-Apparat lokalisierte Gyp1p wurde die Kristallstruktur einer funktionellen TBC-Domäne beschrieben (Du *et al.*, 2001; Rak *et al.*, 2000). Bei der angenommenen Funktionsweise der GYP-GTPasen handelt es sich um einen *Zwei-Finger-Mechanismus*, zwei hochkonservierte Aminosäuremotive, die an der Hydrolyse von GTP beteiligt sind – Argininfinger (IxxDxxR) und Glutaminfinger (YxQ). Dieser Mechanismus wird auch für Rab-GAP-Proteine bei Säugern angenommen (Pan *et al.*, 2006). Bei SJL-Mäusen bricht das aberrante Protein vor dem Glutaminfinger ab, wodurch die katalytische Funktion des Proteins nicht möglich wäre.

Das nächstverwandte Rab-GAP-Protein zu TBC1D1 ist TBC1D4, dessen TBC-Domäne zu 79 % identisch mit der von TBC1D1 ist. TBC1D4 – auch AS160 (*Akt substrate 160 kDa*) genannt – wurde als letztes Glied in der Insulin-stimulierten GLUT4-Translokation identifiziert. AS160 bindet im phosphorylierten Zustand Rab-Proteine, die GLUT4-Transporter an der Translokation zur Plasmamembran hindern (Sano *et al.*, 2003; Kane und Lienhard, 2002). Diese Rolle von AS160 wird in neueren Studien auch für TBC1D1 diskutiert. In 3T3-L1-Adipocyten hemmt eine Überexprimierung von *TBC1D1* die Insulin-stimulierte GLUT4-Translokation zur Plasmamembran (Chavez *et al.*, 2008). Allerdings kommt TBC1D1 in 3T3-L1-Adipocyten natürlicherweise nicht vor (Chadt *et al.*, 2008). Zusätzlich zur Regulation der GLUT4-Translokation wird für TBC1D1 die Regulation der GLUT1-Expression über den mTOR-Signalweg beschrieben. Einer siRNA-vermittelten Verringerung der TBC1D1-Expression folgt eine gesteigerte GLUT1-Expression (Zhou *et al.*, 2008).

Die gesteigerte *Tbc1d1*-Expression bei älteren Tieren könnte ein Grund für die verminderte Insulinsensitivität sein, falls es wie *AS160* eine Rolle in der GLUT4-Translokation spielt. Altersabhängige Proteinexpressionen sind ebenfalls für Insulinrezeptoren (IR) in Skelettmuskeln von Ratten beschrieben. Hier werden in alten Tieren weniger IR mit einer hohen Affinität exprimiert (Torlińska *et al.*, 2000). Auch eine geringere Insulinsensitivität, Insulin-stimulierter Glucose-Transport und Lipogenese wird bei älteren Ratten beobachtet (Kamel *et al.*, 2004).

Denkbar wäre eine ergänzende regulatorische Funktion der beiden Proteine TBC1D1 und AS160, da sie über verschiedene Kinasen (AMPK bzw. Akt) reguliert werden können (Chen *et al.*, 2008) und eine gewebsspezifische Proteinexpression zeigen – TBC1D1 vorwiegend im Skelettmuskel, AS160 in Skelettmuskel und Fettgewebe. Auch die Regulation weiterer Translokationsprozesse im Muskel sind möglich, denn AMPK-vermittelte Regulationsmechanismen im Muskelgewebe betreffen auch den Lipidstoffwechsel (Nilsson *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2005) und freie Fettsäuren gelangen, ebenso wie Glucose, über Transportproteine in die Zellen (Chabowski *et al.*, 2005; Luiken *et al.*, 2002). Neue Ergebnisse zu *Tbc1d1* in unserer Abteilung deuten auf eine Regulation des Fettsäure-Metabolismus hin. Mäuse der rekombinant kongenen Linie SB6^{Nob1.10}, die homozygot das SJL-Allel (*Nob1.10*^{SJL/SJL}) aufweisen, zeigen eine signifikant höhere Oxidation von Palmitinsäure im Skelettmuskel als Mäuse, die homozygot das B6-Allel (*Nob1.10*^{B6/B6}) tragen. Im C2C12-Muskelzellmodell weisen Zellen mit verringerter TBC1D1-Expression ebenfalls eine erhöhte Fettsäureaufnahme und -oxidation auf im Vergleich zu TBC1D1-überexprimierenden C2C12-Zellen, die den gegenteiligen Effekt zeigen (Chadt *et al.*, 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Tbc1d1* ein sehr plausibles Kandidatengen im *Nob1* ist, das für dessen suppressiven Gewichtseffekt verantwortlich scheint. Darauf deuten hin:

- 1) die genomische Position im *Peak* des QTL
- 2) die SJL-spezifische LOF-Mutation
- 3) Assoziation von seltenen humanen TBC1D1-Varianten mit Adipositas (R125W; Meyre *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2006)
- 4) Mäuse, die ein Fragment des *Nob1* der SJL-Maus tragen, in dem die mutierte Form von *Tbc1d1* lokalisiert ist (*Nob1.10*), zeigen geringere Körpergewichte und Fettmasse im Vergleich zu Tieren, die ein intaktes *Tbc1d1*-Gen aufweisen
- 5) putative Funktion im Metabolismus von Glucose aufgrund der nahen Verwandtschaft zu AS160 sowie der Muskeltyp-spezifischen mRNA-Expression; mögliche Regulation des Fettsäurestoffwechsels im Skelettmuskel.

Um die funktionellen Eigenschaften des Gens *Tbc1d1* näher zu untersuchen, sind eine Kombination aus der Charakterisierung von transgenen Mäusen, die das Protein im Skelettmuskel vermehrt exprimieren, und *Knockout*-Mäusen sowie metabolische Studien in Zellmodellen geplant. *In vitro* können mit Hilfe quantitativer *Real-Time-PCR* oder *Western Blot* zudem die Reaktionen von überexprimiertem *Tbc1d1* bzw. si-RNA-vermitteltem *Tbc1d1-knockdown* in Zellen auf Schlüsselprozesse des Glucose- bzw. Fettstoffwechsels und Transportmechanismen untersucht werden.

4.5 Weitere Kandidatengene

Neben *Tbc1d1* wurde die mRNA-Expression zweier Gene mit differentieller Expression zwischen NZO und SJL näher untersucht, obwohl sie nicht in der *Nob1*-Region lokalisiert sind. Außerdem wurden die codierenden Bereiche der cDNAs dieser Gene bei NZO- und SJL-Mäusen sequenziert. *Abhd1* liegt im *Peak*-Bereich des Adipositas-QTL *Obq11* (23 Mbp), der von Taylor und Mitarbeitern in einer Kreuzung der Mausstämmen NZO und SM identifiziert wurde (Taylor *et al.*, 2001). *Alox5ap* wird dem distalen Ende des Chromosoms 5, aber keinem beschriebenen Adipositas-QTL zugeordnet. Es ist als Suszeptibilitäts-gen für Adipositas und Insulinresistenz sowie Schlaganfall bekannt (Helgadottir *et al.*, 2004; Kaaman *et al.*, 2006). Für beide Gene kann ein möglicher Einfluss auf den Phänotyp der Mäuse nicht ausgeschlossen werden.

4.5.1 *Abhydrolase domain containing 1 (Abhd1)*

Abhd1 wurde im WAT von NZO-Mäusen mehr als dreifach geringer exprimiert als bei SJL-Mäusen. Dieser deutliche Unterschied wurde ebenfalls in den Geweben BAT, Leber, Niere, Dünndarm und Hypothalamus detektiert (Abb. 3.19). Die Sequenzanalyse des codierenden Bereiches der cDNA zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen. Zudem konnte durch den Einfluss einer HFD keine Änderung der Expression induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Abhd1 gehört zu einer Genfamilie, die drei Gene umfasst und für transmembrane Proteine codiert (Edgar und Polak, 2002). Für die orthologen humanen Proteine *ABH2* und *ABH3* wurden in *Cross-link*-Studien Interaktionen mit einzel- und doppelsträngiger DNA nachgewiesen. Möglicherweise sind diese mit den in *E.coli* exprimierten *AlkB*-Proteinen verwandten Proteine an der Reparatur von DNA-Läsionen beteiligt. Für *ABH1* wurden keine solchen DNA-Interaktionen beobachtet (Mishina *et al.*, 2004). DNA-reparierende Eigenschaften werden auch für die Mausgene *Abh2* und *Abh3* beschrieben (Lee *et al.*, 2005). Für das humane *ABHD1*-Gen wird die höchste Expression in Skelettmuskel und Testis beschrieben. Die genomische Organisation des Gens zeigt eine funktionelle Polyadenylierungs-Sequenz und das Protein weist eine katalytische Gruppe auf, die auch in Serin-Proteasen gefunden wird (Edgar, 2003).

4.5.2 *Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein (Alox5ap)*

Bei SJL-Mäusen konnte in keinem der untersuchten Gewebe eine mRNA-Expression von *Alox5ap* nachgewiesen werden (Abb. 3.20). Die Sequenzierung des codierenden cDNA-Bereiches zeigte keinen Unterschied zwischen SJL- und NZO-Mäusen. Wie bei *Abhd1* erfolgt auch hier keine Veränderung der Genexpression unter dem Einfluss einer HFD bei NZO-Mäusen. Seine genomische Lokalisation am distalen Ende des Chr. 5 lässt keine direkte Assoziation des Expressionsunterschiedes zwischen NZO- und SJL-Mäusen und dem *Nob1*-Effekt zu.

Das Gen *Alox5ap* codiert für ein Protein, das für die Leukotrien-Biosynthese benötigt wird. Es aktiviert das Enzym 5-Lipoxygenase (5LO), das den ersten Schritt in der Synthese von Leukotrien B4 (LTB4) aus Arachidonsäure katalysiert (Dixon *et al.*, 1990). *Alox5ap* ist in der Plasmamembran lokalisiert, Inhibitoren hemmen die Translokation von 5LO zur Zellmembran und somit deren Aktivierung durch *Alox5ap*. Eine schwedische Studie beschreibt eine erhöhte mRNA-Expression von *ALOX5AP* und 5LO im Fettgewebe von adipösen Menschen und eine Korrelation von erhöhter *ALOX5AP*-Expression mit Insulinresistenz (Kaaman *et al.*, 2006). *Alox5ap-Knockout*-Mäuse zeigen ein erhöhtes Körpergewicht und verringerte inflammatorische Reaktionen auf eine erhöhte Arachidonsäurezufuhr (Byrum *et al.*, 1997).

Arachidonsäure-Metaboliten werden mit verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen wie Asthma und Arthritis assoziiert (Holloway *et al.*, 2008). Verschiedene Studien beim Menschen zeigen eine positive Korrelation von *ALOX5AP*-Polymorphismen mit einem erhöhten Risiko für Schlaganfall und Herzinfarkt (Linsel-Nitschke *et al.*, 2008; Löhmußaar *et al.*, 2005; Helgadottir *et al.*, 2004). Bei Mäusen wird 5LO als Suszeptibilitätsgen für Artherosklerose beschrieben (Mehrabian *et al.*, 2002), ebenso wie pleiotrope metabolische Effekte auf Adipositas und Funktionen des Pankreas (Mehrabian *et al.*, 2008).

Eine weitere Untersuchung der SJL-Sequenzen des nicht codierenden Bereiches und der potentiellen Promotorregion dieses interessanten Kandidatengens kann Aufschluss geben, ob die fehlende Expression auf eine Mutation in diesen Bereichen zurückzuführen ist. Um zu überprüfen, ob die LTB₄-Biosynthese durch das Fehlen von *Alox5ap* inhibiert wird, ist ein enzymatischer LTB₄-Nachweis mit Hilfe eines ELISAs (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) mit dem Plasma von SJL-Tieren geplant.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Nob1 (*New Zealand obese 1*) bezeichnet einen Adipositas-QTL auf Chr. 5 der Maus ($\text{LOD}^{\text{BMI}} > 3,3$), der in einem Rückkreuzungsexperiment der Mausstämmen NZO (adipös) und SJL (schlank) identifiziert wurde. Um Kandidatengene für Adipositas zu finden, wurden mehr als 300 *Nob1*-Transkripte mit Hilfe von Genexpressionsanalysen auf Unterschiede in stoffwechselrelevanten Geweben zwischen beiden Mausstämmen untersucht. Sieben Gene zeigten eine differentielle Expression: *2310045A20Rik*, *Tbc1d1*, *Ppp1cb*, *Mll5*, *Insig1*, *Abhd1* und *Alox5ap*. Die codierenden Bereiche dieser Gene wurden anschließend auf Sequenzunterschiede zwischen NZO und SJL untersucht. Nur im Gen *Tbc1d1*, das im *Peak*-Bereich des *Nob1* lokalisiert ist, wurde eine SJL-spezifische Deletion von sieben Basen detektiert, die zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Abbruch des Proteins in der funktionellen Rab-GAP-Domäne führt (*Loss-of-Function*-Mutation). Interessanterweise wurde eine Variante von TBC1D1 (R125W) in Kopplungsanalysen mit Adipositas beim Menschen assoziiert (Stone *et al.*, 2006). TBC1D1 zeigt eine hohe Homologie zu TBC1D4 (AS160), das im Insulinsignalweg eine wichtige Rolle spielt. In 17 weiteren Genen im *Peak*-Bereich des *Nob1* wurde keine weitere SJL-spezifischen Mutation detektiert. Bei NZO-Tieren erfolgte die *Tbc1d1*-mRNA-Expression vorwiegend in glycolytischen Fasern des Skelettmuskels. Zudem wurden zwei gewebsspezifisch exprimierte *Tbc1d1*-Isoformen identifiziert, die sich durch alternatives Splicen der Exone 12 und 13 unterscheiden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse machen *Tbc1d1* zu einem plausiblen Kandidatengen für den *Nob1*-QTL. Welche Funktion *Tbc1d1* im Glucose- und Fettstoffwechsel des Skelettmuskels hat, muss in weiteren Analysen untersucht werden.

Summary

Nob1 (*New Zealand obese 1*) has been identified as an obesity QTL on chromosome 5 ($\text{LOD}^{\text{BMI}} > 3,3$) in a backcross experiment of obese NZO and lean SJL mice. To identify candidate genes for obesity expression profiling experiments with RNA from metabolic tissues were performed with more than 300 *Nob1*-genes. Seven genes showed differences in mRNA expression levels between both strains: *2310045A20Rik*, *Tbc1d1*, *Ppp1cb*, *Mll5*, *Insig1*, *Abhd1*, and *Alox5ap*. Sequencing of the coding regions of these genes revealed a SJL-specific deletion of seven basepairs in the *Tbc1d1* gene that is located in the peak region of *Nob1*. This mutation leads to a frameshift resulting in a truncated protein that lacks the important Rab-GAP-domain (*Loss-of-Function*-mutation). Interestingly, linkage analysis of the R125W-variant of TBC1D1 has been recently associated with human obesity. TBC1D1 shows high homology to TBC1D4 (AS160) that plays an important role in the insulin signaling pathway. No other SJL-specific mutations were detected in 17 further genes in the *Nob1* peak region. In NZO mice *Tbc1d1* mRNA is predominantly expressed in glycolytic fibres of skeletal muscle. Two isoforms were identified differing in alternative spliced exons 12 and 13 and showing a tissue specific mRNA expression.

The results presented in this work make *Tbc1d1* a very feasible candidate gene to be causal for *Nob1*. The function of *Tbc1d1* in the metabolism of carbohydrates and fat has yet to be analyzed.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abiola O, Angel JM, Avner P, Bachmanov AA, Belknap JK, Bennett B, Blankenhorn EP, Blizard DA, Bolivar V, Brockmann GA, Buck KJ, Bureau JF, Casley WL, Chesler EJ, Cheverud JM, Churchill GA, Cook M, Crabbe JC, Crusio WE, Darvasi A, de Haan G, Dermant P, Doerge RW, Elliot RW, Farber CR, Flaherty L, Flint J, Gershenfeld H, Gibson JP, Gu J, Gu W, Himmelbauer H, Hitzemann R, Hsu HC, Hunter K, Iraqi FF, Jansen RC, Johnson TE, Jones BC, Kempermann G, Lammert F, Lu L, Manly KF, Matthews DB, Medrano JF, Mehrabian M, Mittlemann G, Mock BA, Mogil JS, Montagutelli X, Morahan G, Mountz JD, Nagase H, Nowakowski RS, O'Hara BF, Osadchuk AV, Paigen B, Palmer AA, Peirce JL, Pomp D, Rosemann M, Rosen GD, Schalkwyk LC, Seltzer Z, Settle S, Shimomura K, Shou S, Sikela JM, Siracusa LD, Spearow JL, Teuscher C, Threadgill DW, Toth LA, Toyee AA, Vadasz C, Van Zant G, Wakeland E, Williams RW, Zhang HG, Zou F. (2003). The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nat Rev Genet* 4:911-916.
- Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. & Flier, J. S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382, 250-2.
- Albert, S., Will, E. & Gallwitz, D. (1999). Identification of the catalytic domains and their functionally critical arginine residues of two yeast GTPase-activating proteins specific for Ypt/Rab transport GTPases. *Embo J* 18, 5216-25.
- Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. (1996). The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20, 501-506.
- Ashrafi, K., Chang, F. Y., Watts, J. L., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J. & Ruvkun, G. (2003). Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 421, 268-72.
- Baus, D., Heermeier, K., De Hoop, M., Metz-Weidmann, C., Gassenhuber, J., Dittrich, W., Welte, S. & Tennagels, N. (2008). Identification of a novel AS160 splice variant that regulates GLUT4 translocation and glucose-uptake in rat muscle cells. *Cell Signal*.
- Beck, J. A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J. T., Festing, M. F. & Fisher, E. M. (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* 24, 23-5.
- Befroy, D. E., Petersen, K. F., Dufour, S., Mason, G. F., de Graaf, R. A., Rothman, D. L. & Shulman, G. I. (2007). Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 56, 1376-81.
- Behm-Ansmant, I. & Izaurralde, E. (2006). Quality control of gene expression: a stepwise assembly pathway for the surveillance complex that triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 20, 391-8.

- Bellin, D., Schulz, B., Soerensen, T. R., Salamini, F. & Schneider, K. (2007). Transcript profiles at different growth stages and tap-root zones identify correlated developmental and metabolic pathways of sugar beet. *J Exp Bot* 58, 699-715.
- Bergman, R. N., Kim, S. P., Catalano, K. J., Hsu, I. R., Chiu, J. D., Kabir, M., Hucking, K. & Ader, M. (2006). Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 1, 16S-19S.
- Bergmann, K. E. & Mensink, G. B. (1999). [Anthropometric data and obesity]. *Gesundheitswesen* 61 Spec No, S115-20.
- Brehm, A., Krssak, M., Schmid, A. I., Nowotny, P., Waldhausl, W. & Roden, M. (2006). Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle. *Diabetes* 55, 136-40.
- Bielschowsky, M. & Bielschowsky, F. (1953). A new strain of mice with hereditary obesity. *PROCEEDINGS OF THE UNIVERSITY OF OTAGO MEDICAL SCHOOL* 31, 29-31.
- Bittner, R. E., Anderson, L. V., Burkhardt, E., Bashir, R., Vafiadaki, E., Ivanova, S., Raffelsberger, T., Maerk, I., Hoger, H., Jung, M., Karbasiyan, M., Storch, M., Lassmann, H., Moss, J. A., Davison, K., Harrison, R., Bushby, K. M. & Reis, A. (1999). Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet* 23, 141-2.
- Boden, G. (2001). Free fatty acids-the link between obesity and insulin resistance. *Endocr Pract* 7, 44-51.
- Bonow RO, Eckel RH. (2003) Diet, obesity, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348, 2057-2058.
- Bouchard C. (1995). Genetics of Obesity: an update on molecular markers. *Int J Obesity* 19, S10-13.
- Brockmann, G. A. & Bevova, M. R. (2002). Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *Trends Genet* 18, 367-76.
- Buchmann, J., Meyer, C., Neschen, S., Augustin, R., Schmolz, K., Kluge, R., Al-Hasani, H., Jurgens, H., Eulenberg, K., Wehr, R., Dohrmann, C., Joost, H. G. & Schurmann, A. (2007). Ablation of the cholesterol transporter adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1 reduces adipose cell size and protects against diet-induced obesity. *Endocrinology* 148, 1561-73.
- Byrum, R. S., Goulet, J. L., Griffiths, R. J. & Koller, B. H. (1997). Role of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in murine acute inflammatory responses. *J Exp Med* 185, 1065-75.

- Chabowski, A., Coort, S. L., Calles-Escandon, J., Tandon, N. N., Glatz, J. F., Luiken, J. J. & Bonen, A. (2005). The subcellular compartmentation of fatty acid transporters is regulated differently by insulin and by AICAR. *FEBS Lett* 579, 2428-32.
- Chadt, A., Leicht, K., Deshmukh, A., Jiang, L. Q., Scherneck, S., Bernhardt, U., Dreja, T., Vogel, H., Schmolz, K., Kluge, R., Zierath, J. R., Hultschig, C., Hoeben, R. C., Schurmann, A., Joost, H. G. & Al-Hasani, H. (2008). Tbc1d1 mutation in lean mouse strain confers leanness and protects from diet-induced obesity. *Nat Genet* 40, 1354-9.
- Chavez, J. A., Roach, W. G., Keller, S. R., Lane, W. S. & Lienhard, G. E. (2008). Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 283, 9187-95.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E. A., Weng, X., Ellis, S. J., Lakey, N. D., Culpepper, J., Moore, K. J., Breitbart, R. E., Duyk, G. M., Tepper, R. I. & Morgenstern, J. P. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84, 491-5.
- Chen, S., Murphy, J., Toth, R., Campbell, D. G., Morrice, N. A. & Mackintosh, C. (2008). Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factors, insulin and AMPK activators. *Biochem J* 409, 449-59.
- Chen, W. M., Erdos, M. R., Jackson, A. U., Saxena, R., Sanna, S., Silver, K. D., Timpson, N. J., Hansen, T., Orru, M., Grazia Piras, M., Bonnycastle, L. L., Willer, C. J., Lyssenko, V., Shen, H., Kuusisto, J., Ebrahim, S., Sestu, N., Duren, W. L., Spada, M. C., Stringham, H. M., Scott, L. J., Olla, N., Swift, A. J., Najjar, S., Mitchell, B. D., Lawlor, D. A., Smith, G. D., Ben-Shlomo, Y., Andersen, G., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Saramies, J., Valle, T. T., Buchanan, T. A., Shuldiner, A. R., Lakatta, E., Bergman, R. N., Uda, M., Tuomilehto, J., Pedersen, O., Cao, A., Groop, L., Mohlke, K. L., Laakso, M., Schlessinger, D., Collins, F. S., Altshuler, D., Abecasis, G. R., Boehnke, M., Scuteri, A. & Watanabe, R. M. (2008). Variations in the G6PC2/ABCB11 genomic region are associated with fasting glucose levels. *J Clin Invest* 118, 2620-8.
- Chen Y, Hu C, Hsu CK, Zhang Q, Bi C, Asnicar M, Hsiung HM, Fox N, Sliker LJ, Yang DD, Heiman ML, Shi Y. (2002). Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet induced obesity. *Endocrinology* 143, 2469-2477.
- Cho, Y. R., Kim, H. J., Park, S. Y., Ko, H. J., Hong, E. G., Higashimori, T., Zhang, Z., Jung, D. Y., Ola, M. S., Lanoue, K. F., Leiter, E. H. & Kim, J. K. (2007). Hyperglycemia, maturity-onset obesity, and insulin resistance in NONcNZO10/LtJ males, a new mouse model of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E327-36.
- Christoffersen, C., Bollano, E., Lindegaard, M. L., Bartels, E. D., Goetze, J. P., Andersen, C. B. & Nielsen, L. B. (2003). Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 144, 3483-90.

- Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Goumelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lehouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392, 398-401.
- Coleman, D. L. & Eicher, E. M. (1990). Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J Hered* 81, 424-7.
- Comuzzie AG, Allison DB. (1998). The search for human obesity genes. *Science* 280, 1374-1377.
- Cool, D. R. & Loh, Y. P. (1998). Carboxypeptidase E is a sorting receptor for prohormones: binding and kinetic studies. *Mol Cell Endocrinol* 139, 7-13.
- Cool, D. R., Normant, E., Shen, F., Chen, H. C., Pannell, L., Zhang, Y. & Loh, Y. P. (1997). Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell* 88, 73-83.
- Darimont, C., Turini, M., Epitoux, M., Zbinden, I., Richelle, M., Montell, E., Ferrer-Martinez, A. & Mace, K. (2004). beta3-adrenoceptor agonist prevents alterations of muscle diacylglycerol and adipose tissue phospholipids induced by a cafeteria diet. *Nutr Metab (Lond)* 1, 4.
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A. & Trent, J. M. (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14, 457-60.
- Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Korner, A., Jacobson, P., Carlsson, L. M., Kiess, W., Vatin, V., Lecoeur, C., Delplanque, J., Vaillant, E., Pattou, F., Ruiz, J., Weill, J., Levy-Marchal, C., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Le Stunff, C., Bougneres, P., Kovacs, P., Marre, M., Balkau, B., Cauchi, S., Chevre, J. C. & Froguel, P. (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39, 724-6.
- DiPetrillo, K., Wang, X., Stylianou, I. M. & Paigen, B. (2005). Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. *Trends Genet* 21, 683-92.
- Dixon, W. T., Demetrick, D. J., Ohshima, K., Sikora, L. K. & Jerry, L. M. (1990). Biosynthesis, glycosylation and intracellular processing of the neuroglandular antigen, a human melanoma-associated antigen. *Cancer Res* 50, 4557-65.
- Do, R., Bailey, S. D., Desbiens, K., Belisle, A., Montpetit, A., Bouchard, C., Perusse, L., Vohl, M. C. & Engert, J. C. (2008). Genetic variants of FTO influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec Family Study. *Diabetes* 57, 1147-50.

- Donaldson PT. (2004). Genetics of liver disease: immunogenetics and disease pathogenesis. *Gut* 53:599-608.
- Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M. E., Dufour, S., Cline, G. W., Slezak, L. A., Andersen, D. K., Hundal, R. S., Rothman, D. L., Petersen, K. F. & Shulman, G. I. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103, 253-9.
- Du, L. L. & Novick, P. (2001). Yeast rab GTPase-activating protein Gyp1p localizes to the Golgi apparatus and is a negative regulator of Ypt1p. *Mol Biol Cell* 12, 1215-26.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J. J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. & Goud, B. (1998). Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* 279, 580-5.
- Edgar, A. J. (2003). The gene structure and expression of human ABHD1: overlapping polyadenylation signal sequence with Sec12. *BMC Genomics* 4, 18.
- Edgar, A. J. & Polak, J. M. (2002). Cloning and tissue distribution of three murine alpha/beta hydrolase fold protein cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 292, 617-25.
- Farooqi, I. S., Yeo, G. S. & O'Rahilly, S. (2003). Binge eating as a phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med* 349, 606-9; author reply 606-9.
- Fehr C, Shirley RL, Belknap JK, Crabbe JC, Buck KJ. (2002). Congenic mapping of alcohol and pentobarbital withdrawal liability loci to a <1 centimorgan interval of murine chromosome 4: identification of Mpdz as a candidate gene. *J Neurosci* 22:3730-3738.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.
- Festing, M. F. W. (1997). Inbred strains of mice. *Mouse genome* 95, 631-633.
- Fisler, J. S. & Warden, C. H. (1997). Mapping of mouse obesity genes: A generic approach to a complex trait. *J Nutr* 127, 1909S-1916S.
- Fox, C. S., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Pou, K. M., Maurovich-Horvat, P., Liu, C. Y., Vasan, R. S., Murabito, J. M., Meigs, J. B., Cupples, L. A., D'Agostino, R. B., Sr. & O'Donnell, C. J. (2007). Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 116, 39-48.

- Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A. M., Ness, A. R., Ebrahim, S., Lawlor, D. A., Ring, S. M., Ben-Shlomo, Y., Jarvelin, M. R., Sovio, U., Bennett, A. J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R. J., Barroso, I., Wareham, N. J., Karpe, F., Owen, K. R., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Palmer, C. N., Doney, A. S., Morris, A. D., Smith, G. D., Hattersley, A. T. & McCarthy, M. I. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316, 889-94.
- Frazer, K. A., Eskin, E., Kang, H. M., Bogue, M. A., Hinds, D. A., Beilharz, E. J., Gupta, R. V., Montgomery, J., Morenzoni, M. M., Nilsen, G. B., Pethiyagoda, C. L., Stuve, L. L., Johnson, F. M., Daly, M. J., Wade, C. M. & Cox, D. R. (2007). A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature* 448, 1050-3.
- Garulet, M., Perez-Llamas, F., Baraza, J. C., Garcia-Prieto, M. D., Fardy, P. S., Tebar, F. J. & Zamora, S. (2002). Body fat distribution in pre-and post-menopausal women: metabolic and anthropometric variables. *J Nutr Health Aging* 6, 123-6.
- Garnett, S. P., Baur, L. A. & Cowell, C. T. (2008). Waist-to-height ratio: a simple option for determining excess central adiposity in young people. *Int J Obes (Lond)* 32, 1028-30.
- Gemma, A., Takenaka, K., Hosoya, Y., Matuda, K., Seike, M., Kurimoto, F., Ono, Y., Uematsu, K., Takeda, Y., Hibino, S., Yoshimura, A., Shibuya, M. & Kudoh, S. (2001). Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *Eur J Cancer* 37, 1554-61.
- Giesen, K., Plum, L., Kluge, R., Ortlepp, J. & Joost, H. G. (2003). 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, 812-7.
- Gonzalez-Navarro, H., Burks, D. J. & Andres, V. (2007). Murine models to investigate the influence of diabetic metabolism on the development of atherosclerosis and restenosis. *Front Biosci* 12, 4439-55.
- Grosshans, B. L., Ortiz, D. & Novick, P. (2006). Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11821-7.
- Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K. & Friedman, J. M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543-6.
- Han TS, Seidell JC, Currall JE, Morrison CE, Deurenberg P, Lean ME. (1997). The influences of height and age on waist circumference as an index of adiposity in adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21, 83-90.

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-94.
- Heilbronn, L. K., Rood, J., Janderova, L., Albu, J. B., Kelley, D. E., Ravussin, E. & Smith, S. R. (2004). Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1844-8.
- Helgadottir, A., Manolescu, A., Thorleifsson, G., Gretarsdottir, S., Jonsdottir, H., Thorsteinsdottir, U., Samani, N. J., Gudmundsson, G., Grant, S. F., Thorgeirsson, G., Sveinbjornsdottir, S., Valdimarsson, E. M., Matthiasson, S. E., Johannsson, H., Gudmundsdottir, O., Gurney, M. E., Sainz, J., Thorhallsdottir, M., Andresdottir, M., Frigge, M. L., Topol, E. J., Kong, A., Gudnason, V., Hakonarson, H., Gulcher, J. R. & Stefansson, K. (2004). The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet* 36, 233-9.
- Helmert U, Strube H. (2002). Die Entwicklung der Adipositas in Deutschland im Zeitraum von 1985 bis 2002. *Gesundheitswesen* 66, 409-415.
- Henson MS, O'Brien TD. (2006). Feline models of type 2 diabetes mellitus. *Ilar J* 47:234-242.
- Herwig, R., Aanstad, P., Clark, M. & Lehrach, H. (2001). Statistical evaluation of differential expression on cDNA nylon arrays with replicated experiments. *Nucleic Acids Res* 29, E117.
- Hillebrandt S, Bock HH, Matern S, Lammert F. (2001). [Polygene diseases: use of inbred mice for identification of disease-relevant genes]. *Dtsch Med Wochenschr* 126:17-19.
- Hoenig, M. (2006). The cat as a model for human nutrition and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9, 584-8.
- Holloway, J. W., Barton, S. J., Holgate, S. T., Rose-Zerilli, M. J. & Sayers, I. (2008). The role of LTA4H and ALOX5AP polymorphism in asthma and allergy susceptibility. *Allergy*.
- Hotamisligil, G. S. (2003). Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3, S53-5.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131-141.
- Iannaccone PM, Scarpelli DG. (1993). Exploring pathogenetic mechanisms using transgenic animals. *Ann Med* 25:131-138.

- Igel, M., Becker, W., Herberg, L. & Joost, H. G. (1997). Hyperleptinemia, leptin resistance, and polymorphic leptin receptor in the New Zealand obese mouse. *Endocrinology* 138, 4234-9.
- Isken, O. & Maquat, L. E. (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* 21, 1833-56.
- Itani, S. I., Ruderman, N. B., Schmieder, F. & Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 51, 2005-11.
- Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O`Rahilly S. (1997). Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 16, 303-306.
- Jia, G., Yang, C. G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z. & He, C. (2008). Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett.*
- Joost, H. G. (2000). Insulinresistenz und metabolisches Syndrom. *Z Kardiol* 89, 377-382.
- Jürgens HS, Schürmann A, Kluge R, Ortmann S, Klaus S, Joost HG, Tschöp MH. (2006). Hyperphagia, lower body temperature, and reduced running wheel activity precede development of morbid obesity in New Zealand obese mice. *Physiol Genomics* 25:234-241.
- Kaaman, M., Ryden, M., Axelsson, T., Nordstrom, E., Sicard, A., Bouloumie, A., Langin, D., Arner, P. & Dahlman, I. (2006). ALOX5AP expression, but not gene haplotypes, is associated with obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 30, 447-52.
- Kahlem, P., Sultan, M., Herwig, R., Steinfath, M., Balzereit, D., Eppens, B., Saran, N. G., Pletcher, M. T., South, S. T., Stetten, G., Lehrach, H., Reeves, R. H. & Yaspo, M. L. (2004). Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of down syndrome. *Genome Res* 14, 1258-67.
- Kahn BB. (1998). Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 92, 593-596.
- Kamel, A. F., Norgren, S., Strigard, K., Thorne, A., Fakhrai-Rad, H., Galli, J. & Marcus, C. (2004). Age-dependent regulation of lipogenesis in human and rat adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 4601-6.
- Kane, S. & Lienhard, G. E. (2005). Calmodulin binds to the Rab GTPase activating protein required for insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 175-80.

- Kaplan, N. M. (1989). The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 149, 1514-20.
- Kappel CA, Bieberich CJ, Jay G. (1994). Evolving concepts in molecular pathology. *Faseb J* 8:583-592.
- Keightley, P. D., Morris, K. H., Ishikawa, A., Falconer, V. M. & Oliver, F. (1998). Test of candidate gene--quantitative trait locus association applied to fatness in mice. *Heredity* 81 (Pt 6), 630-7.
- Kershaw, E. E. & Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2548-56.
- Kesaniemi YA, Lilja M, Kervinen K, Rantala A. (1992). Multiple metabolic syndrome: aspects of genetic epidemiology and molecular genetics. *Ann Med* 24, 461-464.
- Kim, S. P., Ellmerer, M., Van Citters, G. W. & Bergman, R. N. (2003). Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog. *Diabetes* 52, 2453-60.
- Klaus, S. (2004). Adipose tissue as a regulator of energy balance. *Curr Drug Targets* 5, 241-50.
- Klebig, M. L., Wilkinson, J. E., Geisler, J. G. & Woychik, R. P. (1995). Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4728-32.
- Kluge, R., Giesen, K., Bahrenberg, G., Plum, L., Ortlepp, J. R. & Joost, H. G. (2000). Quantitative trait loci for obesity and insulin resistance (Nob1, Nob2) and their interaction with the leptin receptor allele (LeprA720T/T1044I) in New Zealand obese mice. *Diabetologia* 43, 1565-72.
- Kopelman PG. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-643.
- Kraegen, E. W., Clark, P. W., Jenkins, A. B., Daley, E. A., Chisholm, D. J. & Storlien, L. H. (1991). Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* 40, 1397-403.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19, 155-157.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. (1987).
- MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.

- Larson, D. E., Tataranni, P. A., Ferraro, R. T. & Ravussin, E. (1995). Ad libitum food intake on a "cafeteria diet" in Native American women: relations with body composition and 24-h energy expenditure. *Am J Clin Nutr* 62, 911-7.
- Le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C. S., Simpson, E. R., Korach, K. S., Tsai, M. J. & Mauvais-Jarvis, F. (2006). Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9232-7.
- Lee, D. H., Jin, S. G., Cai, S., Chen, Y., Pfeifer, G. P. & O'Connor, T. R. (2005). Repair of methylation damage in DNA and RNA by mammalian AlkB homologues. *J Biol Chem* 280, 39448-59.
- Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I. & Friedman, J. M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379, 632-5.
- Leiter EH, Reifsnyder PC. (2004). Differential levels of diabetogenic stress in two new mouse models of obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1:S4-11.
- Lexicon Genetics, I. (2005). NIH initiative supporting placement of Lexicon Genetics, Inc. mice into public repositories. *MGI Direct Data Submission*.
- Linsel-Nitschke, P., Gotz, A., Medack, A., Konig, I. R., Bruse, P., Lieb, W., Mayer, B., Stark, K., Hengstenberg, C., Fischer, M., Baessler, A., Ziegler, A., Schunkert, H. & Erdmann, J. (2008). Genetic variation in the arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) is associated with myocardial infarction in the German population. *Clin Sci (Lond)*.
- Liu, Y. J., Liu, X. G., Wang, L., Dina, C., Yan, H., Liu, J. F., Levy, S., Papasian, C. J., Drees, B. M., Hamilton, J. J., Meyre, D., Delplanque, J., Pei, Y. F., Zhang, L., Recker, R. R., Froguel, P. & Deng, H. W. (2008). Genome-wide association scans identified CTNBL1 as a novel gene for obesity. *Hum Mol Genet* 17, 1803-13.
- Lohmusaar, E., Gschwendtner, A., Mueller, J. C., Org, T., Wichmann, E., Hamann, G., Meitinger, T. & Dichgans, M. (2005). ALOX5AP gene and the PDE4D gene in a central European population of stroke patients. *Stroke* 36, 731-6.
- Long, Y. C., Barnes, B. R., Mahlapuu, M., Steiler, T. L., Martinsson, S., Leng, Y., Wallberg-Henriksson, H., Andersson, L. & Zierath, J. R. (2005). Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse white skeletal muscle. *Diabetologia* 48, 2354-64.

- Loos, R. J., Lindgren, C. M., Li, S., Wheeler, E., Zhao, J. H., Prokopenko, I., Inouye, M., Freathy, R. M., Attwood, A. P., Beckmann, J. S., Berndt, S. I., Jacobs, K. B., Chanock, S. J., Hayes, R. B., Bergmann, S., Bennett, A. J., Bingham, S. A., Bochud, M., Brown, M., Cauchi, S., Connell, J. M., Cooper, C., Smith, G. D., Day, I., Dina, C., De, S., Dermitzakis, E. T., Doney, A. S., Elliott, K. S., Elliott, P., Evans, D. M., Sadaf Farooqi, I., Froguel, P., Ghorri, J., Groves, C. J., Gwilliam, R., Hadley, D., Hall, A. S., Hattersley, A. T., Hebebrand, J., Heid, I. M., Lamina, C., Gieger, C., Illig, T., Meitinger, T., Wichmann, H. E., Herrera, B., Hinney, A., Hunt, S. E., Jarvelin, M. R., Johnson, T., Jolley, J. D., Karpe, F., Keniry, A., Khaw, K. T., Luben, R. N., Mangino, M., Marchini, J., McArdle, W. L., McGinnis, R., Meyre, D., Munroe, P. B., Morris, A. D., Ness, A. R., Neville, M. J., Nica, A. C., Ong, K. K., O'Rahilly, S., Owen, K. R., Palmer, C. N., Papadakis, K., Potter, S., Pouta, A., Qi, L., Randall, J. C., Rayner, N. W., Ring, S. M., Sandhu, M. S., Scherag, A., Sims, M. A., Song, K., Soranzo, N., Speliotes, E. K., Syddall, H. E., Teichmann, S. A., Timpson, N. J., Tobias, J. H., Uda, M., Vogel, C. I., Wallace, C., Waterworth, D. M., Weedon, M. N., Willer, C. J., Wraight, Yuan, X., Zeggini, E., Hirschhorn, J. N., Strachan, D. P., Ouwehand, W. H., Caulfield, M. J., et al. (2008). Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* 40, 768-75.
- Louet, J. F., LeMay, C. & Mauvais-Jarvis, F. (2004). Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. *Curr Atheroscler Rep* 6, 180-5.
- Luiken, J. J., Dyck, D. J., Han, X. X., Tandon, N. N., Arumugam, Y., Glatz, J. F. & Bonen, A. (2002). Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E491-5.
- Ma Y, Bertone ER, Stanek EJ, Reed GW, Hebert JR, Cohen NL, Merriam PA, Ockene IS. (2003). Association between eating patterns and obesity in a free-living US adult population. *Am J Epidemiol* 158, 85-92.
- Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. (1997). Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 27, 325-351.
- Marette, A. (2002). Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 377-83.
- Mascie-Taylor, C. G. & Goto, R. (2007). Human variation and body mass index: a review of the universality of BMI cut-offs, gender and urban-rural differences, and secular changes. *J Physiol Anthropol* 26, 109-12.
- Mehrabian, M., Allayee, H., Wong, J., Shi, W., Wang, X. P., Shaposhnik, Z., Funk, C. D. & Lusis, A. J. (2002). Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res* 91, 120-6.
- Mehrabian, M., Schulthess, F. T., Nebohacova, M., Castellani, L. W., Zhou, Z., Hartiala, J., Oberholzer, J., Lusis, A. J., Maedler, K. & Allayee, H. (2008). Identification of ALOX5 as a gene regulating adiposity and pancreatic function. *Diabetologia* 51, 978-88.

- Meyre, D., Farge, M., Lecoeur, C., Proenca, C., Durand, E., Allegaert, F., Tichet, J., Marre, M., Balkau, B., Weill, J., Delplanque, J. & Froguel, P. (2008). R125W coding variant in TBC1D1 confers risk for familial obesity and contributes to linkage on chromosome 4p14 in the French population. *Hum Mol Genet* 17, 1798-802.
- Mishina, Y., Lee, C. H. & He, C. (2004). Interaction of human and bacterial AlkB proteins with DNA as probed through chemical cross-linking studies. *Nucleic Acids Res* 32, 1548-54.
- Moebus, S., Hanisch, J. U., Aidelburger, P., Bramlage, P., Wasem, J. & Jockel, K. H. (2007). Impact of 4 different definitions used for the assessment of the prevalence of the Metabolic Syndrome in primary healthcare: The German Metabolic and Cardiovascular Risk Project (GEMCAS). *Cardiovasc Diabetol* 6, 22.
- Mogensen, M., Sahlin, K., Fernstrom, M., Glintborg, D., Vind, B. F., Beck-Nielsen, H. & Hojlund, K. (2007). Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 56, 1592-9.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Early AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903-908.
- Moritani M, Togawa K, Yaguchi H, Fujita Y, Yamaguchi Y, Inoue H, Kamatani N, Itakura M. (2006). Identification of diabetes susceptibility loci in db mice by combined quantitative trait loci analysis and haplotype mapping. *Genomics* 88:719-730.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-73.
- Mystkowski, P., Shankland, E., Schreyer, S. A., LeBoeuf, R. C., Schwartz, R. S., Cummings, D. E., Kushmerick, M. & Schwartz, M. W. (2000). Validation of whole-body magnetic resonance spectroscopy as a tool to assess murine body composition. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24, 719-24.
- Naggert, J. K., Fricker, L. D., Varlamov, O., Nishina, P. M., Rouille, Y., Steiner, D. F., Carroll, R. J., Paigen, B. J. & Leiter, E. H. (1995). Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet* 10, 135-42.
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A. & Zerial, M. (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol* 1, 376-82.
- Nilsson, E. C., Long, Y. C., Martinsson, S., Glund, S., Garcia-Roves, P., Svensson, L. T., Andersson, L., Zierath, J. R. & Mahlapuu, M. (2006). Opposite transcriptional regulation in skeletal muscle of AMP-activated protein kinase gamma3 R225Q transgenic versus knock-out mice. *J Biol Chem* 281, 7244-52.

- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., McDowell, M. A., Tabak, C. J. & Flegal, K. M. (2006). Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *Jama* 295, 1549-55.
- Okuno, K., Yasutomi, M., Nishimura, N., Arakawa, T., Shiomi, M., Hida, J., Ueda, K. & Minami, K. (2001). Gene expression analysis in colorectal cancer using practical DNA array filter. *Dis Colon Rectum* 44, 295-9.
- Ollmann, M. M., Lamoreux, M. L., Wilson, B. D. & Barsh, G. S. (1998). Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. *Genes Dev* 12, 316-30.
- Ortlepp, J. R., Kluge, R., Giesen, K., Plum, L., Radke, P., Hanrath, P. & Joost, H. G. (2000). A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse. *Eur J Clin Invest* 30, 195-202.
- Oswal, A. & Yeo, G. S. (2007). The leptin melanocortin pathway and the control of body weight: lessons from human and murine genetics. *Obes Rev* 8, 293-306.
- Paigen, K., Szatkiewicz, J. P., Sawyer, K., Leahy, N., Parvanov, E. D., Ng, S. H., Graber, J. H., Broman, K. W. & Petkov, P. M. (2008). The recombinational anatomy of a mouse chromosome. *PLoS Genet* 4, e1000119.
- Pan, D. A., Lillioja, S., Kriketos, A. D., Milner, M. R., Baur, L. A., Bogardus, C., Jenkins, A. B. & Storlien, L. H. (1997). Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 46, 983-8.
- Pan, H. J., Agate, D. S., King, B. L., Wu, M. K., Roderick, S. L., Leiter, E. H. & Cohen, D. E. (2006a). A polymorphism in New Zealand inbred mouse strains that inactivates phosphatidylcholine transfer protein. *FEBS Lett* 580, 5953-8.
- Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M. & Lambright, D. G. (2006b). TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* 442, 303-6.
- Petkov, P. M., Ding, Y., Cassell, M. A., Zhang, W., Wagner, G., Sargent, E. E., Asquith, S., Crew, V., Johnson, K. A., Robinson, P., Scott, V. E. & Wiles, M. V. (2004). An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. *Genome Res* 14, 1806-11.
- Petkov, P. M., Graber, J. H., Churchill, G. A., DiPetrillo, K., King, B. L. & Paigen, K. (2005). Evidence of a large-scale functional organization of mammalian chromosomes. *PLoS Genet* 1, e33.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pfeffer, S. (2005). Filling the Rab GAP. *Nat Cell Biol* 7, 856-7.

- Phillips, D. I., Caddy, S., Ilic, V., Fielding, B. A., Frayn, K. N., Borthwick, A. C. & Taylor, R. (1996). Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects. *Metabolism* 45, 947-50.
- Pittler, S. J. & Baehr, W. (1991). Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene of the rd mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8322-6.
- Pletcher, M. T., McClurg, P., Batalov, S., Su, A. I., Barnes, S. W., Lagler, E., Korstanje, R., Wang, X., Nusskern, D., Bogue, M. A., Mural, R. J., Paigen, B. & Wiltshire, T. (2004). Use of a dense single nucleotide polymorphism map for in silico mapping in the mouse. *PLoS Biol* 2, e393.
- Plum, L., Giesen, K., Kluge, R., Junger, E., Linnartz, K., Schurmann, A., Becker, W. & Joost, H. G. (2002). 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, 823-30.
- Rajala, M. W., Qi, Y., Patel, H. R., Takahashi, N., Banerjee, R., Pajvani, U. B., Sinha, M. K., Gingerich, R. L., Scherer, P. E. & Ahima, R. S. (2004). Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 53, 1671-9.
- Rak, A., Fedorov, R., Alexandrov, K., Albert, S., Goody, R. S., Gallwitz, D. & Scheidig, A. J. (2000). Crystal structure of the GAP domain of Gyp1p: first insights into interaction with Ypt/Rab proteins. *Embo J* 19, 5105-13.
- Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y. C., Weisnagel, S. J., Argyropoulos, G., Walts, B., Perusse, L. & Bouchard, C. (2006). The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14, 529-644.
- Razak, F., Anand, S. S., Shannon, H., Vuksan, V., Davis, B., Jacobs, R., Teo, K. K., McQueen, M. & Yusuf, S. (2007). Defining obesity cut points in a multiethnic population. *Circulation* 115, 2111-8.
- Reaven GM: Banting lecture 1988. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37 : 1595-1607.
- Reifsnyder, P. C., Churchill, G. & Leiter, E. H. (2000). Maternal environment and genotype interact to establish diabetes in mice. *Genome Res* 10, 1568-78.
- Reifsnyder, P. C. & Leiter, E. H. (2002). Deconstructing and reconstructing obesity-induced diabetes (diabetes) in mice. *Diabetes* 51, 825-32.
- Reuveni, E., Ramensky, V. E. & Gross, C. (2007). Mouse SNP Miner: an annotated database of mouse functional single nucleotide polymorphisms. *BMC Genomics* 8, 24.

- Rio Frio, T., Wade, N. M., Ransijn, A., Berson, E. L., Beckmann, J. S. & Rivolta, C. (2008). Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *J Clin Invest* 118, 1519-31.
- Roach, W. G., Chavez, J. A., Miinea, C. P. & Lienhard, G. E. (2007). Substrate specificity and effect on GLUT4 translocation of the Rab GTPase-activating protein Tbc1d1. *Biochem J* 403, 353-8.
- Ross R, Shaw KD, Rissanen J, Martel Y, de Guise J, Avruch L. (1994). Sex differences in lean and adipose tissue distribution by magnetic resonance imaging: anthropometric relationships. *Am J Clin Nutr* 59, 1277-1285.
- Rössner S. (2002) Obesity: the disease of the twenty-first century. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, S2-S4.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-86.
- Russell, J. C., Shillabeer, G., Bar-Tana, J., Lau, D. C., Richardson, M., Wenzel, L. M., Graham, S. E. & Dolphin, P. J. (1998). Development of insulin resistance in the JCR:LA-cp rat: role of triacylglycerols and effects of MEDICA 16. *Diabetes* 47, 770-8.
- Saiki, R. K., Walsh, P. S., Levenson, C. H. & Erlich, H. A. (1989). Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6230-4.
- Samec, S., Seydoux, J. & Dulloo, A. G. (1998). Interorgan signaling between adipose tissue metabolism and skeletal muscle uncoupling protein homologs: is there a role for circulating free fatty acids? *Diabetes* 47, 1693-8.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C. P., Asara, J. M., Lane, W. S., Garner, C. W. & Lienhard, G. E. (2003). Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 278, 14599-602.
- Sano, H., Roach, W. G., Peck, G. R., Fukuda, M. & Lienhard, G. E. (2008). Rab10 in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Biochem J* 411, 89-95.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-70.

- Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W. M., Uda, M., Albai, G., Strait, J., Najjar, S., Nagaraja, R., Orru, M., Usala, G., Dei, M., Lai, S., Maschio, A., Busonero, F., Mulas, A., Ehret, G. B., Fink, A. A., Weder, A. B., Cooper, R. S., Galan, P., Chakravarti, A., Schlessinger, D., Cao, A., Lakatta, E. & Abecasis, G. R. (2007). Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 3, e115.
- Silha, J. V., Krsek, M., Skrha, J. V., Sucharda, P., Nyomba, B. L. & Murphy, L. J. (2003). Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol* 149, 331-5.
- Stein CJ, Colditz GA. (2004). The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2522-2525.
- Stenmark, H. & Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2,
- Stone, S., Abkevich, V., Russell, D. L., Riley, R., Timms, K., Tran, T., Trem, D., Frank, D., Jammulapati, S., Neff, C. D., Iliev, D., Gress, R., He, G., Frech, G. C., Adams, T. D., Skolnick, M. H., Lanchbury, J. S., Gutin, A., Hunt, S. C. & Shattuck, D. (2006). TBC1D1 is a candidate for a severe obesity gene and evidence for a gene/gene interaction in obesity predisposition. *Hum Mol Genet* 15, 2709-20.
- Stunkard AJ, Sørensen TI, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull WJ, Schulsinger F. (1986). An adoption study of human obesity. *N Engl J Med* 314, 193-198.
- Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. (1990). The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 322, 1483-1487.
- Stutzmann, F., Tan, K., Vatin, V., Dina, C., Jouret, B., Tichet, J., Balkau, B., Potoczna, N., Horber, F., O'Rahilly, S., Farooqi, I. S., Froguel, P. & Meyre, D. (2008). Prevalence of MC4R deficiency in European population and their age-dependant penetrance in multi-generational pedigrees. *Diabetes*.
- Syme, C., Abrahamowicz, M., Leonard, G. T., Perron, M., Pitiot, A., Qiu, X., Richer, L., Totman, J., Veillette, S., Xiao, Y., Gaudet, D., Paus, T. & Pausova, Z. (2008). Intra-abdominal adiposity and individual components of the metabolic syndrome in adolescence: sex differences and underlying mechanisms. *Arch Pediatr Adolesc Med* 162, 453-61.
- Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Wool, E. A., Monroe, C. A. & Tepper, R. I. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263-71.
- Taylor, B. A., Wnek, C., Schroeder, D. & Phillips, S. J. (2001). Multiple obesity QTLs identified in an intercross between the NZO (New Zealand obese) and the SM (small) mouse strains. *Mamm Genome* 12, 95-103.

- Taylor, E. B., An, D., Kramer, H. F., Yu, H., Fujii, N. L., Roeckl, K. S., Bowles, N., Hirshman, M. F., Xie, J., Feener, E. P. & Goodyear, L. J. (2008). Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem* 283, 9787-96.
- Torlinska, T., Mackowiak, P., Nogowski, L., Hryniewiecki, T., Witmanowski, H., Perz, M., E, M. d. & Nowak, K. W. (2000). Age dependent changes of insulin receptors in rat tissues. *J Physiol Pharmacol* 51, 871-81.
- Tsigos C, Kyrou I, Raptis SA. (2002). Monogenic forms of obesity and diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15, 241-253.
- Tsunoda, M., Kobayashi, N., Ide, T., Utsumi, M., Nagasawa, M. & Murakami, K. (2008). A novel PPARalpha agonist ameliorates insulin resistance in dogs fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E833-40.
- Uhde-Stone, C., Zinn, K. E., Ramirez-Yanez, M., Li, A., Vance, C. P. & Allan, D. L. (2003). Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Physiol* 131, 1064-79.
- Verheijen, M. H., Chrast, R., Burrola, P. & Lemke, G. (2003). Local regulation of fat metabolism in peripheral nerves. *Genes Dev* 17, 2450-64.
- Wabitsch M, Kunze D, Keller E, Kiess W, Kromeyer-Hauschild K. (2002). Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. Deutliche und anhaltende Zunahme der Prävalenz-Aufruf zum Handeln. *Fortschritte der Medizin* 120, 99-106.
- Wardle, J., Carnell, S., Haworth, C. M., Farooqi, I. S., O'Rahilly, S. & Plomin, R. (2008). Obesity associated genetic variation in FTO is associated with diminished satiety. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 3640-3.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. & Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-808.
- Weller, A. H., Magliato, S. A., Bell, K. P. & Rosenberg, N. L. (1997). Spontaneous myopathy in the SJL/J mouse: pathology and strength loss. *Muscle Nerve* 20, 72-82.
- White, R. A., Pasztor, L. M., Richardson, P. M. & Zon, L. I. (2000). The gene encoding TBC1D1 with homology to the tre-2/USP6 oncogene, BUB2, and cdc16 maps to mouse chromosome 5 and human chromosome 4. *Cytogenet Cell Genet* 89, 272-5.
- WHO. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. *WHO Technical Report Series* 894.
- WHO. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *WHO Technical Report Series* 916.

- Wuschke, S., Dahm, S., Schmidt, C., Joost, H. G. & Al-Hasani, H. (2007). A meta-analysis of quantitative trait loci associated with body weight and adiposity in mice. *Int J Obes (Lond)* 31, 829-41.
- Yalcin, B., Fullerton, J., Miller, S., Keays, D. A., Brady, S., Bhomra, A., Jefferson, A., Volpi, E., Copley, R. R., Flint, J. & Mott, R. (2004). Unexpected complexity in the haplotypes of commonly used inbred strains of laboratory mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9734-9.
- Yen, T. T., Gill, A. M., Frigeri, L. G., Barsh, G. S. & Wolff, G. L. (1994). Obesity, diabetes, and neoplasia in yellow *A(vy)/-* mice: ectopic expression of the *agouti* gene. *Faseb J* 8, 479-88.
- Zabena, C., Gonzalez-Sanchez, J. L., Martinez-Larrad, M. T., Torres-Garcia, A., Alvarez-Fernandez-Represa, J., Corbaton-Anchuelo, A., Perez-Barba, M. & Serrano-Rios, M. (2008). The FTO Obesity Gene. Genotyping and Gene Expression Analysis in Morbidly Obese Patients. *Obes Surg*.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-32.
- Zhou, Q. L., Jiang, Z. Y., Holik, J., Chawla, A., Hagan, G. N., Leszyk, J. & Czech, M. P. (2008). Akt substrate TBC1D1 regulates GLUT1 expression through the mTOR pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 411, 647-55.

7 ANHANG

Tabelle A1: Übersicht über die Gene auf dem Macroarray

Name	Entrez Gene ID	Typ	Chr.	Pos. (Bp)	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	Größe PCR-Produkt (bp)	Primer for (5'→3')	Primer rev (5'→3')
<i>Sic30a3</i>	22784	nob	5	31362681	1E17	280	C	379	GACATGGAGCCTTCTCTGG	AAAGCCAGAGGGAAAAAGAGG
<i>Dnajc5g</i>	231098	nob	5	31384900	1H20	1A10	P	224	M13 for	M13 rev
<i>Trim54</i>	58522	nob	5	31393292	1P23	1E7	P	371	M13 for	M13 rev
<i>Ucn</i>	22226	nob	5	31414569	1N10	177	G	402	CGGCACCATGATACAGAGG	GCTTTCGTGACCCCATACG
<i>Mpv17</i>	17527	nob	5	31417896	1O10	178	C	376	GACAGCTGGATCACTGATGG	GAAGTTGGCTAACTGCACAGC
<i>Gf3c2</i>	71752	nob	5	31432531	1C15	246	C	429	ATGTCAAAGGCCTCAGAAACG	CAGAAAGGGTCTCAAAGTCC
<i>Eif2b4</i>	13667	nob	5	31464102	1D24	1F10	C	448	M13 for	M13 rev
<i>Snx17</i>	266781	nob	5	31475236	1O24	1G1	P	267	M13 for	M13 rev
<i>Zfp513</i>	101023	nob	5	31475548	1P10	179	G	473	ATACGCCCTCTGCTCATCTGG	GAGCCCCAGGTAAAAAGAACC
<i>Ppm1g</i>	14208	nob	5	31479248	1E21	1B11	P	367	M13 for	M13 rev
<i>Nr1bp</i>	192292	nob	5	31519486	2O2	2D4	P	393	T3	T7
<i>Ift172</i>	67661	nob	5	31567695	1P20	1A7	P	242	M13 for	M13 rev
<i>Fndc4</i>	64339	nob	5	31569466	1C21	1B1	P	226	M13 for	M13 rev
<i>Gckr</i>	231103	nob	5	31574161	1A11	180	C	454	TCGATTATGAAGGGAGCTACG	ACTGAGTCTGTCTCTGCAACG
<i>Zfp512</i>	269639	nob	5	31756548	1K20	1A2	P	298	M13 for	M13 rev
<i>4930548HZ4Rik</i>	67656	nob	5	31762439	1P22	1D3	P	306	M13 for	M13 rev
<i>Xab1</i>	74254	nob	5	31771342	1H22	1C7	P	459	M13 for	M13 rev
<i>Sic4a1ap</i>	20534	nob	5	31812716	1N24	1F9	P	342	M13 for	M13 rev
<i>Mir133</i>	66845	nob	5	31890565	2B2	2E1	P	389	T3	T7
<i>Rbks</i>	71336	nob	5	31901019	1A21	1A8	P	231	M13 for	M13 rev
<i>Bre</i>	107976	nob	5	31974264	2H3	2C11	P	611	T3	T7
<i>Fosl2</i>	14284	nob	5	32413221	1B11	181	G	468	AGCTCGCTTCTCTCTGATCC	TGACATGTTCCCATGACTGG
<i>Pib1</i>	75156	nob	5	32509290	1A16	260	G	368	CTGGTCAACCTTGTGGACTTC	CCTGGCTCAGGTGTTCTGTC
<i>Ppp1cb</i>	19046	nob	5	32735423	1J24	1F5	P	430	M13 for	M13 rev
<i>yes1</i>	22612	nob	5	32887813	1C11	182	G	393	AGAAAGACTGGGTCTCTTTCG	GGCTGCTTTTAAACAACCTTCC
<i>Pisld</i>	320951	nob	5	33102483	1M16	272	G	403	CACATGGCCTTCATAAAGTCC	CATGGCATCCCAAGATCG
<i>C330019G07Rik</i>	215476	nob	5	33106063	1I23	1E11	P	365	M13 for	M13 rev
<i>Depdc5</i>	277854	nob	5	33300725	1F22	1C5	P	266	M13 for	M13 rev
<i>Ywhah</i>	22629	nob	5	33335699	2G1	2C12	P	520	T3	T7
<i>Sic5a1</i>	20537	nob	5	33478860	1E15	248	G	430	GACATCTGCCCTTCCTGATGC	AAGCCATGCATTGACACTCC
<i>Spon2</i>	100689	nob	5	33530373	1J23	1E12	P	292	M13 for	M13 rev
<i>Ctbp1</i>	13016	nob	5	33564587	1L20	1A3	P	404	M13 for	M13 rev
<i>Maea</i>	59003	nob	5	33689685	1B17	277	C	417	AGCATCTGCTACGGCTGTGG	ACTGCTGGATCAGCATTCG

Tabelle A1: Übersicht über die Gene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Chr.	Pos. (Bp)	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	Größe PCR-Produkt (bp)	Primer for (5' → 3')	Primer rev (5' → 3')
4933407H78Rik	71101	nob	5	33695552	1D11	183	G	386	TGGACCAGGGTACTTCAAGG	TCTTGACTGGGGAGCTAAGG
2410018C17Rik	74504	nob	5	33917207	1G22	1C6	P	281	M13 for	M13 rev
Silp	20492	nob	5	33965518	2H2	2A7	P	537	pME for	pME rev
0610039G24Rik	68366	nob	5	33970996	1E11	184	G	469	CCTCCGAGCTGTTTGTAAAGG	GTGAACACGAAAGCACACTGC
Tacc3	21335	nob	5	33988355	1I21	1B4	P	263	M13 for	M13 rev
Fgfr3	14184	nob	5	34039254	1F11	185	C	488	AGAGAGACCCTGAAAAAGC	TGTAGACCCCTGATCTTCG
Letm1	56384	nob	5	34057347	1F15	249	G	428	AGAGAAAGCCCAAGGAAAGG	CAGATCCTGATCCAGGAAGG
Wfsc2h	24116	nob	5	34214772	1L24	1F7	P	359	M13 for	M13 rev
Gm1673	381633	nob	5	34300511	1H17	283	C	303	GCTCAGGTCCTTGCTGTCG	GCAGGCATTTATTGACAAGG
BC034068	269642	nob	5	34318459	1O20	1A6	P	318	M13 for	M13 rev
Poln	272158	nob	5	34324042	1G15	250	G	403	GGATCCATTGAGCTCTGTCC	GCTTGAGAGCATCCATCAGC
BC023882	231123	nob	5	34470736	2J2	2D1	P	629	T3	T7
Mxd4	17122	nob	5	34490743	2M2	2D12	P	430	T3	T7
Zfyve28	231125	nob	5	34511731	1H15	251	G	470	GCCATCTACAGCATTTTGC	TGCATCTAGCCTGTCTAGG
BC037112	231128	nob	5	34760178	1I15	252	G	418	ATGCTGTGGCCTGATACCC	GCAAGGGGTCTACACAAGG
Trip2	231130	nob	5	34817525	1L23	1E3	P	401	M13 for	M13 rev
Sh3bp2	24055	nob	5	34842662	2C1	1G5	P	351	M13 for	M13 rev
Acid1	11518	nob	5	34926150	1N16	273	G	440	AGTGCTAACCCAGTGTGTGC	TACACAGGGTTGCTCACTGC
0610009O03Rik	68294	nob	5	34950502	2P1	2D6	P	382	T3	T7
2610033H07Rik	75416	nob	5	34955389	1I20	1A11	P	235	M13 for	M13 rev
Gprk2l	14772	nob	5	34977235	1A23	1D4	P	328	M13 for	M13 rev
Hdh	15194	nob	5	35078646	1H11	187	G	413	TGCACCAGGAAGTCCAACC	ACCATCTGGCAAGAGCTAGG
A930005I04Rik	403174	nob	5	35243493	1E16	264	G	426	GGAGACCAGGCATGACTACC	GGGAGAAAGCATAAGCACAGC
Rgs12	71729	nob	5	35283064	1D22	1C3	P	371	M13 for	M13 rev
Hgfac	54426	nob	5	35358416	1N22	1D12	P	329	M13 for	M13 rev
A930013K19	231134	nob	5	35397357	1I11	188	G	411	GGAACGGTTACCAGAGTTGG	TGTCAGATGCTGAGGCTACC
Lrpap1	16976	nob	5	35408354	1O23	1E6	P	358	M13 for	M13 rev
Adra2c	11553	nob	5	35598305	1J11	189	G	460	TCITTCGAAGGAGGAGAAAGG	TAACCAGAGATTGCCTGTGC
Hmx1	15371	nob	5	35705968	1J21	1B5	P	236	M13 for	M13 rev
A930033C23Rik	77965	nob	5	35713678	1K11	190	G	464	TGGTCTGTTTAGCGGTCTCC	CACCCAATCTGAGTCTCACC
Cpz.Hmx1	242939	nob	5	35819074	1B24	1E9	P	309	M13 for	M13 rev
2310079F23Rik	78890	nob	5	35873856	2A1	1G12	P	448	M13 for	M13 rev
4931431C16Rik	74364	nob	5	35898863	1J15	253	G	499	CGGAAAACAGAGAAGCACTCC	AACCCACTTCCCAAAAAGAGC
Acox3	80911	nob	5	35928094	1C23	1D6	P	231	M13 for	M13 rev
Htra3	78558	nob	5	35978419	1J14	237	G	438	CTGAAGCTCGGCTGAGAGAG	CATAAGTATGCCCGTCTGTGC
Sh3tc1	231147	nob	5	36014028	2B1	1G3	P	282	M13 for	M13 rev
Ablim2	231148	nob	5	36173987	1K15	254	G	432	CCTGTGGAAGAGGAATGACC	ACGTCCCAGACACTCTGTGC
2600003E23Rik	70292	nob	5	36318580	2K2	2D10	P	422	T3	T7

Tabelle A1: Übersicht über die Gene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Chr.	Pos. (Bp)	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	Größe PCR-Produkt (bp)	Primer for (5'→3')	Primer rev (5'→3')
<i>Sorcs2</i>	81840	nob	5	36333990	1E22	1C4	P	451	M13 for	M13 rev
<i>2310020A21Rik</i>	76943	nob	5	36520915	1L18	305	G	442	ACAGGAGTCTGCAGGAAGG	GCCCTGGTTTTCTCATCC
<i>Gpnl1</i>	17713	nob	5	36782277	1B21	1A9	P	195	M13 for	M13 rev
<i>AA474455</i>	231151	nob	5	36790764	1M18	306	G	421	AGCTGGGGCTCAAACACTACG	GGAAGGGGGCTTTTAGAGG
<i>4921513E08Rik</i>	66717	nob	5	36801686	1D21	1B10	P	251	M13 for	M13 rev
<i>Tbc1d14</i>	100855	nob	5	36810108	2P2	2D5	P	455	T3	T7
<i>D5Erttd579e</i>	320661	nob	5	36938344	1C16	262	G	413	ACACTCCCTGTGTGATTGC	CACGGTGTTCCTGTGTTCC
<i>Mrfap1</i>	67568	nob	5	37083115	1M20	1A4	P	214	M13 for	M13 rev
<i>Man2b2</i>	17160	nob	5	37095061	1C17	278	C	455	CTCGCTGGAGAACTGCTCTG	AGAGCCACCCCACTCCTTG
<i>Ppp2r2c</i>	269643	nob	5	37242013	1C22	1C2	P	494	M13 for	M13 rev
<i>Wfs1</i>	22393	nob	5	37254352	2I2	2C9	P	450	T3	T7
<i>Gababrbp</i>	76071	nob	5	37316564	1L16	271	C	491	TTCGGAAGCTAGAGGACAGG	TGTCCTGTCCGGTGTGTAGG
<i>Crmpl</i>	12933	nob	5	37534037	1A17	276	G	251	CGCCCTGTAGCTGTTCTAGG	GTGGAGCTCTGTGACCTTCC
<i>Evc</i>	59056	nob	5	37587390	1M15	256	G	461	AGGATGTGTGAGTCCCAAGG	AGTGTGTGCCACCTACAACC
<i>Evc2</i>	68525	nob	5	37674954	1A22	1C11	P	264	M13 for	M13 rev
<i>Stk32</i>	64293	nob	5	37735073	1F17	281	G	411	TCTGATTTCTGTGGACCAAGG	CTCTCAATTCACAAGCTCATGC
<i>Cytl1</i>	231162	nob	5	38023767	1N15	257	G	365	TGAGGGTCTACCTCTGAGC	GGTTTTCATCACCCCTTCAGC
<i>Msx1.W98246</i>	17701	nob	5	38108809	2M1	2B2	P	485	T3	T7
<i>Stx18</i>	71116	nob	5	38327499	1J20	1A12	P	276	M13 for	M13 rev
<i>Nsg1</i>	18196	nob	5	38425274	1F24	1F12	P	317	M13 for	M13 rev
<i>Zfp509</i>	75079	nob	5	38487954	1L14	239	G	479	GACAGACTGAGCCTGGAACC	CTGTCCCTCACCCCTAGACTGC
<i>Lyar</i>	17089	nob	5	38508788	1H24	1F3	P	323	M13 for	M13 rev
<i>2810021O14Rik</i>	66309	nob	5	38548390	1O15	258	G	313	GCTGACGTGAAGGAGAAGC	GACAAACGATTCTGTGATGC
<i>Otop1</i>	21906	nob	5	38591779	1L11	191	G	435	ACGGTGTGCTGCTTATGG	TGCTGCACACACAGATTTCC
<i>Wdr1</i>	22388	nob	5	38815063	1C24	1F1	P	357	M13 for	M13 rev
<i>682042L24Rik</i>	100515	nob	5	38960197	1O22	1D2	P	507	M13 for	M13 rev
<i>Clnk</i>	27278	nob	5	38994710	1N11	193	C	471	CCTGATGAGAAGGATGTCTGG	GAGCCAGGAATGAGACAAGG
<i>Hs3st1</i>	15476	nob	5	39902183	1I4	58	G	471	TAATCAAGAGGGAGCCCTTGC	TTTGGCCGAAGTGAATAGG
<i>Pdlim1</i>	54132	nob	5	40324844	1D15	247	C	478	CAGCAGCATGACACACTTGG	CAGAACCCAGGAAGGATGTGG
<i>Rab28</i>	100972	nob	5	41913245	1O11	194	C	423	AGTGATTCCTCCCTGGCTTCC	ACCAAGAGGATCCCTGTGC
<i>Bapx1</i>	12020	nob	5	42049412	1P11	195	G	548	CGGGCTGTAGGAGAAGAGC	GCTGAGTCTGAGTCCCAACC
<i>Cpeb2</i>	231207	nob	5	43577291	2F1	1H1	P	378	M13 for	M13 rev
<i>C1qtnf7</i>	109323	nob	5	43803805	2I1	2C6	P	516	T3	T7
<i>5730509K17Rik</i>	231214	nob	5	44018101	1B12	197	C	427	TCCCCTTTTGCCTGATAGC	CTGGATAGGCCAGGATATGG
<i>Fbx15</i>	242960	nob	5	44032861	2A2	2D7	P	426	T3	T7
<i>Bst1</i>	12182	nob	5	44107154	2J1	2C7	P	380	T3	T7
<i>Cd38</i>	12494	nob	5	44199364	2O1	2B4	P	274	T3	T7
<i>Fgfbp1</i>	14181	nob	5	44267109	1P15	259	G	363	TGGCAAGTTTGTACCAAAAG	TCTTGGACCTTGTGTGCTC

Tabelle A1: Übersicht über die Gene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Chr.	Pos. (Bp)	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	Größe PCR-Produkt (bp)	Primer for (5' → 3')	Primer rev (5' → 3')
<i>Prom1</i>	19126	nob	5	44281862	1M23	1E4	P	361	M13 for	M13 rev
<i>4932414K18Rik</i>	231225	nob	5	44463411	1G24	1F2	P	478	M13 for	M13 rev
<i>Ldb2</i>	16826	nob	5	44760390	1C12	198	G	436	CAGGCTCCAGTAAAGATGG	CATCTGTAGTTGGGGTGG
<i>4930431F12Rik</i>	75783	nob	5	45256036	1B16	261	G	402	TCTTCTGGGTTCAATTTGG	CACCTCCTGTGCAAAAATCC
<i>4930435H24Rik</i>	73975	nob	5	45398874	1G9	154	C	496	GCAAGCTGCTTACCTTCTGG	AGGGCTCAGGTTTTGGTAGG
<i>Qqpr</i>	110391	nob	5	45722300	1B23	1D5	P	353	M13 for	M13 rev
<i>lap3</i>	66988	nob	5	45781629	1O6	101	G	477	CCACGAGGACTCTGATTGAG	GCATTTCCAAGACAGGGTTTC
<i>Med28</i>	66999	nob	5	45808549	1I9	156	G	350	AGTGAACCTGCAGCGGAAGG	CAGGGGATCATAGATTCAAAG
<i>9630031F12Rik</i>	58227	nob	5	45817952	1J9	157	G	444	ACCTACCAGGAATGGACTGC	TCTGTTGATAGGCCACTTGC
<i>9630001P10Rik</i>	319251	nob	5	45927629	1K9	158	G	486	TTTGAGACCCCTCTCCTAGC	GGAGTATGCAGAAGGCATGG
<i>5730507H05Rik</i>	54392	nob	5	45958179	1L9	159	C	475	ATCTTCTCAAGGCTGGTTGC	AATAGCCAGCAGTCGTTTCC
<i>A830039H10Rik</i>	209707	nob	5	45987561	1M9	160	G	435	AGGTGTTTCCCTGGGTATGG	AAAGCCCTGCTGTTTTCAGG
<i>Sltf2</i>	20563	nob	5	48273041	1N9	161	G	488	AAGAAATGGGTGGAGTGC	CAGTTTCAGTGGCATCAATGG
<i>4933428G09Rik</i>	66768	nob	5	48660591	1P8	144	G	404	GAATAAGGGAGGCCACAAAAG	CCACATTCGGGCTAATAGTTC
<i>Kcnip4</i>	80334	nob	5	48677749	2G3	2C10	P	434	T3	T7
<i>Gpr125</i>	70693	nob	5	50275628	1G7	113	G	409	GCGCAAAATAGAGCTCAAGG	ATTAGTGGCGCTTGAGTTGG
<i>Ppargc1_e8.2</i>	19017	nob	5	51742494	1B1	K2	G	641	ACCAAGATAACCCTTTCAAG	TCACCTTTCATCTTCACTGTC
<i>Dhx15</i>	13204	nob	5	52438468	1F9	153	G	365	CAAGTTGTGCTTTCATGTTGG	TGAAGTCAGTGCCTCTGTATGG
<i>Sod3</i>	20657	nob	5	52652068	1G1	3	G	460	AGTGTGGAGATCTGGATGG	CTGGTTGCCACCTTTACCC
<i>Lgi2</i>	246316	nob	5	52821764	1I1	5	G	455	ATCGACGGGAAGTCTCAC	TTCCTTTGAAAACCTGGATGC
<i>D5Ertfd135e</i>	211006	nob	5	52928044	1P9	163	G	478	CTTTTCGAGGCTTCATGTCC	CTCTGAATGCTGACGAATGG
<i>Pl4k2b-pending</i>	67073	nob	5	53029855	1K6	96	C	404	GGCTAGCATTTCCCTTTAAGC	GGAGGAGAAGAACGGTTTCC
<i>Zcchc4</i>	78796	nob	5	53071302	1A10	164	G	445	CCTTTGATGCCATTTTCTCC	TGATTTGGCCACATTCATAGC
<i>Anapc4</i>	52206	nob	5	53122330	1P6	102	G	307	CAAACCTCCGGCATGTGAG	ACACAGACAACCTCAGTGTGACC
<i>Slc34a2</i>	20531	nob	5	53326329	1C1	K3	G	754	CTTTGACAATGCAGCTATGAGC	CAGAGCCCTACGTACAGAAAAC
<i>2310045A20Rik</i>	231238	nob	5	53395324	2D3	2B8	P	324	T3	T7
<i>1810013D10Rik</i>	66278	nob	5	53555479	1K19	321	G	565	TGGACGCTTTTATCCTGTGC	TTAATACCTGCAGCCTCACG
<i>Rbpsuh</i>	19664	nob	5	53878593	1F1	2	G	417	CCCTGCACCTTGGTTATCC	CATCTTACAGGTGGCCCTCC
<i>Cckar</i>	12425	nob	5	53986732	1A1	K1	G	460	GCAGCCGATAGGATAGC	GATGCCCTTATGGTCCCTCC
<i>Tbc1d19</i>	67249	nob	5	54097906	1A9	145	G	351	GCAGTTCTGGCTGACCTTTC	CGAGCCTGTACCAGTTAGG
<i>Stim2</i>	116873	nob	5	54408463	1E1	K5	G	874	ACACCTGTGCTCCTCAGC	CCAGGGCTTTCACCTGTGATT
<i>4932441J04Rik</i>	319216	nob	5	58004376	1N7	122	G	430	GAGAACTCCCAATCTCAGC	ACAAAAGCAGGCATCTCC
<i>Fcdh7</i>	54216	nob	5	58009938	1D1	K4	G	742	TTCTCTGACAAAATCAGCCC	TGGCAAGAACTGTCTGTCTAGC
<i>G6pd2</i>	14380	nob	5	62097121	1M1	12	G	465	GATCCTTGGCCAGTATGTGG	TACGGACAAAAGTGCATCTGG
<i>Centd1</i>	212285	nob	5	63054331	1P2	31	G	481	ATCACAATGGGGTCTTTTGC	TTCATAGCATGGTGCCTCC
<i>3110047P20Rik</i>	319807	nob	5	63925493	1A3	32	G	413	TGAAATCGTATTGCAGAGG	CTCAGCACGAATATGCATCG
<i>0610040J01Rik</i>	76261	nob	5	64136957	1N1	13	G	435	GAGGGAGCTTCAGTACACAGG	AGCTCTGGCACACAGTAGGC
<i>AA536743</i>	100532	nob	5	64188208	1C3	34	G	496	CATACCCAGGCCAGCTACTCC	AAACAGCGGGAAGTCTCAAG

Tabelle A1: Übersicht über die Gene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Chr.	Pos. (Bp)	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	Größe PCR-Produkt (bp)	Primer for (5' → 3')	Primer rev (5' → 3')
<i>pgrm1</i>	66681	nob	5	64378440	1D3	35	G	488	CCGAGCATCTGAAAAAGG	CACAACTTAGGAACCATCTTGG
<i>Tbc1d1</i>	57915	nob	5	64452837	1O1	14	G	410	CTGAGATCATAGCTCCATCC	CATGCTGTGGGCTGAACC
<i>Gm1683</i>	381697	nob	5	64874363	1K17	286	C	457	AAGGAGAAGTGTCTGGGAAGG	GGTGTGGATCCTTTGAAGC
<i>Klf3</i>	16599	nob	5	65082714	1L1	8	G	417	GGGGTCATTTACTCCACACC	GTCCATCTCTCCGACAAGG
<i>Tlr1</i>	21897	nob	5	65203800	1P1	15	G	442	CTCTCATTGTCCAAGCTGAGG	TAGTGTGACGGGACACATCC
<i>Tlr6</i>	21899	nob	5	65232113	1A2	16	G	446	CCAAGACAGAAAAACCCATCG	GGAAAGTCAGCTCGTCAGG
<i>9130005N14Rik</i>	68303	nob	5	65320723	1F3	37	G	415	ACTGCAGGCTCCCCACATCC	GCCATGCTTGAGAAAAATAGGG
<i>Klh5</i>	71778	nob	5	65435204	1B8	135	G	426	CAGTACGGTCAAGCCACAGC	CAGTGACATCCTATCACAGTCC
<i>Wdr19</i>	213081	nob	5	65538039	1I2	24	G	239	CTAAATGACCGCACTTCGTG	AAGGCTTTGATCGGTAGGAAG
<i>Recc1</i>	19687	nob	5	65540987	1B2	17	G	476	GGCCTTAGAGGAACAATGC	TCTGACCCAGCCTACACTCC
<i>Klb</i>	83379	nob	5	65627541	1J2	25	G	485	TTCAAGTGGAAAGGGAGTTGG	ATGCATACCTGTGCCAAACC
<i>Ugdh</i>	22235	nob	5	65709241	1K2	26	G	444	TTGGCAAAAAGGTGCTTCC	GAGAACGAGACTGCCTTCC
<i>1110003E01Rik</i>	68552	nob	5	65725956	1G3	39	G	476	GGACTAACGTCCTGGTGG	AAATGCTCACTGTCCCAAGG
<i>Hip2</i>	53323	nob	5	65834066	1L2	27	G	213	CGCAGTAATAGTGGCCTTGTC	TTTTTGAGTCTCCAATGGT
<i>9030416H16Rik</i>	71521	nob	5	65901877	1N8	141	C	449	CTGTGAAGGAAAGGAGAGC	AACTTCATTTGGGAGACTGG
<i>B3bp</i>	333789	nob	5	66106187	1C9	148	G	439	TTTTCTATGGCTGGACCTG	GGATTTGAAGTCTGTTGTC
<i>RhoH</i>	74734	nob	5	66142337	1J3	42	G	425	TGCTGAGCTCAATCAAGTGC	ATCCTGGCAAGTCTCTTCC
<i>Chima9</i>	231252	nob	5	66246258	1K1	7	G	421	TGTACCTATTTCCCTTCCG	CAGAGGGACGTTTTCTGAGG
<i>4921525L17Rik</i>	70918	nob	5	66540293	1L3	44	G	317	ACATCAGGGGCAACAATGC	AAAGCCAACTCATAGGACAAGC
<i>Appb2</i>	11787	nob	5	66580347	1J8	136	G	435	GTCACGACCAATGTGAAACG	GGACAGCAAAATGAACCTGG
<i>Uchl1</i>	22223	nob	5	66955373	1E2	20	G	302	CTTCTCTGCCGTGGCTCTC	GGACTAGACAAAACCcATCCAG
<i>3732412D22Rik</i>	77569	nob	5	67027210	1K16	270	G	415	ATAAGGGGCTTGATGTGAGG	TGCATTCCTTTCCGTGCTGG
<i>Phox2b</i>	18935	nob	5	67373527	1N2	29	G	354	GTAAGGAGGCCAGTGTGGAG	TACGGACTGCTCTGGTGGTC
<i>Tmem33</i>	67878	nob	5	67539831	1N3	47	G	327	AGAGCATCGCCTTATCAGC	TTTCATGATGTAGGCACAGC
<i>Slc30a9</i>	109108	nob	5	67586090	1O3	48	G	448	CAGTGTGCATGGGTAAACACC	GACCCTGTGCACATCAAGC
<i>9430027B09Rik</i>	77272	nob	5	67660313	1P3	49	G	444	GATCTCCCCTGCCGTTTAGG	CACGGACTGTGCATCTTGG
<i>D830007B15Rik</i>	330096	nob	5	67892372	1O19	325	G	578	CTGTGAATAGGCCACACAGG	CCCAGGTGGTAGTGAACC
<i>Afp8a1</i>	11980	nob	5	67898289	1C5	70	C	446	TTGTTGAAATGGCCTCTTCC	CTTGAGATTCGCCCTCAAGC
<i>Kctd8</i>	243043	nob	5	69389582	1B4	51	G	492	AGGTCACCAAGCAGAACTCG	TCTTGTGCTCTCGTACTGG
<i>Yip7</i>	75581	nob	5	69795803	1M6	99	C	477	ATAATCAGGAGCCGAGTTGC	CCACACAGCCCATATGACACC
<i>AA407526</i>	231279	nob	5	69838682	1C4	52	G	254	CCCAGAAAATGAAACTTCTG	GCATCATTTGGGAAGGTTGAG
<i>Gnpda2</i>	67980	nob	5	69854130	1E9	152	C	457	GCCAAAGTACATCTGCAATCG	CATTTGCCAAAAATGGTGTCC
<i>Gabrg1</i>	14405	nob	5	71030913	1B10	165	G	476	TGCACGTGGTTCATACAAGC	TACGCCCTAACGGATTGTCC
<i>Gabra2</i>	14395	nob	5	71365820	1H1	4	G	485	CAGCTGAAGCCCAAGAAAAACC	TTTTCCcaAAGTGTGacaTGG
<i>4930503B16Rik</i>	78174	nob	5	71721956	1L22	1D10	P	211	M13 for	M13 rev
<i>Gabra4</i>	14397	nob	5	71850517	1C10	166	G	406	CAGAAATCGGATGTCAAAAGC	AAATGCTCCAAATGTGACTGG
<i>Commδ8</i>	27784	nob	5	72438380	1B22	1C12	P	359	M13 for	M13 rev
<i>Corin</i>	53419	nob	5	72579126	1B5	69	G	410	CTCCAAAAAGAAATCCCAAGG	TGGGCTTAAAGCAGAAAACTGG

Tabelle A1: Übersicht über die Gene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Chr.	Pos. (Bp)	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	Größe PCR-Produkt (bp)	Primer for (5' → 3')	Primer rev (5' → 3')
<i>nfx1</i>	100978	nob	5	72831797	1E10	168	G	406	CATTTGGTGGTGCTGACG	TGGTTTTATTAGCTGCTTCG
<i>Zar1</i>	317755	nob	5	72860219	1A7	103	G	488	GTACGTCGACAGCCACCAG	CCACACTGTTCCGGTCCTC
<i>Cncg</i>	12788	nob	5	72882830	1F10	169	G	479	GATGACGAGAAACTCAAGC	CCCTGGGTACATTTGATTCC
<i>3830408G10Rik</i>	70701	nob	5	72949503	1B8	126	G	446	CCCTAAAAGGTGGGTCAATCC	GTTACCCAAAAGTGGGTACGG
<i>Txk</i>	22165	nob	5	72975424	2F3	2C1	P	499	T3	T7
<i>Tec</i>	21682	nob	5	73061514	2D2	2A1	P	705	pME for	pME rev
<i>5033405K12Rik</i>	75991	nob	5	73227633	1K21	1B6	P	315	M13 for	M13 rev
<i>E130304D01</i>	231290	nob	5	73286039	1C8	127	G	492	GACAACCTCACCCCTGTCTCC	GAGATTTCCACCAGGACAGC
<i>2510002A14Rik</i>	72313	nob	5	73299325	1D8	129	G	439	CTAGTTGGTGACCCGACAGG	CCAGTGTGTGTTTTGGAGAGC
<i>9030227G01Rik</i>	320336	nob	5	73378646	2B3	2B6	P	454	T3	T7
<i>Ociad1</i>	68095	nob	5	73571937	1J22	1C9	P	463	M13 for	M13 rev
<i>Ociad2</i>	433904	nob	5	73602399	1G10	170	C	454	AGTGCCACTCATGGGAACC	GGAAGCAGATGGTTGTGACC
<i>C130090K23Rik</i>	231293	nob	5	73685362	1B9	146	C	429	GTGGTCAGGAAGTGGATTGC	GAACCCGATAGCATCAGTCC
<i>BC031901</i>	231296	nob	5	73885777	1D17	279	G	424	CATTAGGGAAGTGGCCACAC	CTGCGCTTACATTTCTCTG
<i>Sgcb</i>	24051	nob	5	73912245	1H10	171	G	476	AGGACAAAAGGCTGAAAGTGG	CTCGCTGACCTTCAGTTTCC
<i>Spata18</i>	73472	nob	5	73930555	1L21	1B7	P	202	M13 for	M13 rev
<i>Usp46</i>	69727	nob	5	74307988	1I10	172	G	422	TGAATGGGCTTTGGTTTTCC	TGCATTGCCCTCTAACCAAGG
<i>Ras111b</i>	68939	nob	5	74476992	1F8	132	G	445	GGTTCAGAAAAGAGCAGTGG	GTGCCCATCTTGTGTCAGG
<i>Scfd2</i>	212986	nob	5	74487111	1F21	1B12	P	276	M13 for	M13 rev
<i>Flp1f1</i>	66899	nob	5	74817213	2I3	2E5	P	432	T3	T7
<i>Lnx1</i>	16924	nob	5	74874166	1J10	173	G	475	AAAAGTCAGCAGCCCCCTGTG	TGTTCTGAGCCAGAAAATAGTGC
<i>Chic2</i>	74277	nob	5	75287126	2N2	2D3	P	324	T3	T7
<i>Gsh2</i>	14843	nob	5	75357297	1B7	104	G	434	TAGTCCATTGCCCTCATTC	CAAAGGGACTCCAGAGACC
<i>Pdgfra</i>	18595	nob	5	75464900	1K14	238	G	419	CATCCGAACTGTCAAAGTGG	CCAACTTCATGGTGTGATGC
<i>Kit</i>	16590	nob	5	75880795	2H1	2C5	P	319	T3	T7
<i>Kdr</i>	16542	nob	5	76214523	1K10	174	G	447	TATAATGTGCCCTGCTGTGG	ACACGTAAGAGTCCGGAAGG
<i>Srd5a2l</i>	57357	nob	5	77229731	1L10	175	G	405	TTGGCTCCACAACCTTAACC	GAAAGCAGTTTGGAGACACC
<i>Tpar1</i>	21982	nob	5	77258222	1C7	105	G	400	GGAGGCATCGTATTTTTGG	CAGTGACCAAGGAGAAAACG
<i>Clock</i>	12753	nob	5	77284133	1D7	106	G	391	AGTAGGAACCCCTCCACATGC	TTCCCAATAAACCTGCTACGG
<i>Pdcl2</i>	79455	nob	5	77387193	1E7	108	G	371	GGCATTGCAGATATGATGG	CCTTCCATGTGCTTTTTGG
<i>Nmu</i>	56183	nob	5	77408269	1D9	151	C	409	CATCTCTCTGCTGACTGC	TTACTTTGACCACCAGGAAAGG
<i>Exoc1</i>	69940	nob	5	77604097	1L19	322	G	568	CAC TTCGAGGGGTTGATAGC	AGGCTGGTGGCTGATTACC
<i>2810407P21Rik</i>	69940	nob	5	77604097	1E12	200	G	478	ATCGCACAGTCCCACTAAAGC	AGGCTGGTGGCTGATTACC
<i>Cep4</i>	381644	nob	5	77705435	1F16	265	G	419	TTGTGGCTCCAAATCCATC	ATTGCAAAAGGGAACATCCCTG
<i>A730089K16Rik</i>	320411	nob	5	77730530	2A3	2B5	P	321	T3	T7
<i>A230062G08Rik</i>	231326	nob	5	77950714	1K23	1E2	P	374	M13 for	M13 rev
<i>Ppat</i>	231327	nob	5	77988048	2L2	2D11	P	1348	T3	T7
<i>Paics</i>	67054	nob	5	78041965	1A24	1E8	P	292	M13 for	M13 rev

Tabelle A1: Übersicht über die Gene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Chr.	Pos. (Bp)	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	Größe PCR-Produkt (bp)	Primer for (5' → 3')	Primer rev (5' → 3')
<i>Srp72</i>	66661	nob	5	78049477	1N23	1E5	P	403	M13 for	M13 rev
<i>1700023E05Rik</i>	71868	nob	5	78090833	1J19	320	G	252	GTCCTTAAAGTCAAGCCCTTCTGC	TGGTAAAGACAAGATCACACACG
<i>Hod</i>	74318	nob	5	78161762	1F19	316	G	206	CAGGGCTGAGTGAAAAAGTCC	AAATAGCCTGCTGGCTGACG
<i>Spink2</i>	69982	nob	5	78279880	1N20	1A5	P	331	M13 for	M13 rev
<i>Rest</i>	19712	nob	5	78340275	1G21	1B2	P	185	M13 for	M13 rev
<i>2610024G14Rik</i>	56412	nob	5	78368943	1M14	240	G	433	CAGTACCTGGAGCTTGTGAGC	GGTAGACATCACCCACGGTAGC
<i>Polr2b</i>	231329	nob	5	78395836	1F12	201	C	464	CCAGTGGAGAAGTTGAAGAGC	AGAAATCTCCAGGCATGAGC
<i>Igfbp7</i>	29817	nob	5	78482319	1G12	202	C	403	CAAGGTCTTCCATAGTGAGC	CTACAGAGGCTCATGGATTCC
<i>Lphn3</i>	319387	nob	5	82099246	1M21	1B8	P	311	M13 for	M13 rev
<i>Srd5a2l2</i>	243078	nob	5	84352682	1H12	203	C	428	GACTTGGGTGAGCAAGTCCG	CCTGTGTGATTTGGATGAGC
<i>Epha5</i>	13839	nob	5	85141516	1E23	1D8	P	308	M13 for	M13 rev
<i>Cenpc1</i>	12617	nob	5	87086611	1P16	275	G	423	AACACTGCACGTGCTTCAAGG	AGCTGGCTTCTGTTTCTTGG
<i>Al586015</i>	56792	nob	5	87146306	2L1	2B12	P	189	T3	T7
<i>5730469D23Rik</i>	231380	nob	5	87183680	2C2	2E2	P	420	T3	T7
<i>Gnrhr</i>	14715	nob	5	87259479	1I12	204	G	317	CTGGGTGAGAACGGTAAAG	TCTAACCTTAAACCCTGCCTTG
<i>Trmprss11d</i>	231382	nob	5	87377421	1G16	266	G	480	AGCTGGGATATCAGTGTGG	ACTTGGATGGTTCAGTTC
<i>Trmprss11a</i>	194597	nob	5	87484968	1N17	289	C	420	CTTCAGCGAAGCAACATCC	ATACACGTGTCGCTTCTTGC
<i>9930032O22Rik</i>	320454	nob	5	87560427	1J12	205	G	311	GGATGGGAGTCAGTGTAAATG	CAGATATACCTGCCACAGTACA
<i>Trmprss11f</i>	243083	nob	5	87595786	1K12	206	G	381	CATACGTTACCAGCTCATTCG	AACTTACTGTGTGGGATGC
<i>A030012E10</i>	243084	nob	5	87780187	1M19	323	G	597	CAGATGCAGCAACAGACTGC	GCTGAAAAGTTCTGGCAGAGG
<i>Ugt2b34</i>	100727	nob	5	87964322	2F2	2A4	P	777	pME for	pMe rev
<i>Ugt2b1</i>	71773	nob	5	87991184	1M12	208	G	439	GCGTTCAGGTACAGAACATTTG	TGTGGGGATATTTCAGATACG
<i>Ugt2b35</i>	243085	nob	5	88075421	1N12	209	G	473	ACTGTGGTGTAGGGGTTGG	CAGGTTTTCCCGTGTAGTGG
<i>Ugt2b5</i>	22238	nob	5	88214879	1O12	210	G	436	GTTGGAAAGTGTGGTGTGG	GGAATCTGGAGCAGTTTCAGC
<i>Ugt2b38</i>	100559	nob	5	88484502	1G23	1E1	P	273	M13 for	M13 rev
<i>Sult1b1</i>	56362	nob	5	88589239	1D19	314	G	568	CACAAATGACCCAAACTGAGC	ATGCAGACCATTTTGC AACCC
<i>Sult1e1</i>	53315	nob	5	88629190	1N14	241	G	341	TCCCTTTACATTTGACTTCAGG	TGAGACAATCAGCATGAAATGG
<i>Csna</i>	20860	nob	5	88650498	1P12	211	C	402	CCGGATCATTTCACTTCTTCC	GATGCTGGAAGGACCTTGG
<i>Csnb</i>	12990	nob	5	88740784	1A13	212	C	402	TGTAGTGGATCAGGCACTGG	GCTTAAAGGAAGGATGCTATGC
<i>Csng</i>	12993	nob	5	88767186	1P24	1G11	P	640	M13 for	M13 rev
<i>4930432K09Rik</i>	73779	nob	5	88849142	1B13	213	C	433	GGCAAAGCACGAAATAAAGG	AAGAGCTTGGGAAAGTTGG
<i>2310011G06Rik</i>	69592	nob	5	88900257	1C13	214	G	445	CAACAAGGAAACACCATCACCC	GTGCACCAAACTGGACTGG
<i>Csnk</i>	12994	nob	5	88960255	1D13	215	G	464	TGTCCTTCCAGAAACACAGC	AAATATCCTCAGCCTGCTTGG
<i>4931407G18Rik</i>	70977	nob	5	89000187	1E13	216	G	455	GCCGTGGTGAGAAAGAAATGAC	TGCTGCAGTTGAGGACACTG
<i>Smr2</i>	20600	nob	5	89054005	1O21	1C1	P	242	M13 for	M13 rev
<i>Muc10</i>	17830	nob	5	89161116	1H13	219	G	352	GTGCCAAAAGAGGCTTTCAGAG	ATTGGGGGCAGTAGCAGTAG
<i>5430427O21Rik</i>	71421	nob	5	89391857	1E19	315	G	412	AACCATACCGACCAAAACAAC	CTGCTGAAAGAACCTCCAAAAC
			5	89450668	1113	220	C	418	ACTGAATGGACAGCAACAGC	CAACTGTGATGCGGGTTTTCAGC

Tabelle A1: Übersicht über die Gene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Chr.	Pos. (Bp)	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	Größe PCR-Produkt (bp)	Primer for (5' → 3')	Primer rev (5' → 3')
<i>Ambn</i>	11698	nob	5	89530551	1J13	221	G	428	CGTCTCCTTTTACAAAATGG	TGCTCTTAACACCTTCACTGC
<i>Enam</i>	13801	nob	5	89562535	1K13	222	G	439	TGGAGATGGTGTGCCTACTG	AGGACTTTCAGTGGGTGTGG
<i>Igj</i>	16069	nob	5	89595073	2K1	2C8	P	568	T3	T7
<i>Criz1</i>	65961	nob	5	89628990	1I22	1C8	P	265	M13 for	M13 rev
<i>D5Bwg0860e</i>	52822	nob	5	89715148	2E1	1G7	P	426	M13 for	M13 rev
<i>Grsf1</i>	231413	nob	5	89733689	1M22	1D11	P	284	M13 for	M13 rev
<i>Mobkl1a</i>	68473	nob	5	89795458	1J16	269	G	200	TCTCTTCC TGCCCGTCTCA	AAGTCAAGAAGGAGATCACT
<i>Dck</i>	13178	nob	5	89839507	1P21	1C10	P	306	M13 for	M13 rev
<i>Slc4a4</i>	54403	nob	5	90102386	2E2	2A2	P	571	pME for	pME rev
<i>Gc</i>	14473	nob	5	90492767	1K22	1D1	P	208	M13 for	M13 rev
<i>Gpr74</i>	104443	nob	5	90602627	1L13	223	G	417	TCAAGACAGCCCTTTGTCCAG	AGAGCATCATCAGGGTCCAC
<i>BC038311</i>	231430	nob	5	91289883	1N19	324	G	406	TGTGCTCCAGCCCTCATGG	CAGTTGGGTAGAGATCACACAGG
<i>Ankrd17</i>	81702	nob	5	91328998	1G20	1A1	P	536	M13 for	M13 rev
<i>Afp.albumin1</i>	11576	nob	5	91583627	1D23	1D7	P	440	M13 for	M13 rev
<i>Afm.albumin1</i>	280662	nob	5	91594242	1F23	1D9	P	395	M13 for	M13 rev
<i>Rassf6</i>	73246	nob	5	91678283	1M13	224	G	444	AGGCAGCTAAAACGGAGACC	TCAGTTCCAGATCGGTGATGG
<i>Cxcl5</i>	20311	nob	5	91834577	2E3	2B9	P	436	T3	T7
<i>Cxcl7</i>	57349	nob	5	91843717	1N13	225	C	458	AGCTCAGCCTCAGTTGTTT	AACCCCTCAACCCCTTCTCTGAG
<i>Cxcl4</i>	56744	nob	5	91847641	1M24	1F8	P	356	M13 for	M13 rev
<i>Gm1960</i>	330122	nob	5	91862817	1H16	267	G	312	AAGAGGAAGCCCTCACC	GCCAGGCCAAGGAATACTGC
<i>Cxcl1</i>	14825	nob	5	91968016	1G19	317	G	216	CACTAAGTGTCAACCCTGTGC	CAAAAATGTCCAAGGGAAAGC
<i>Cxcl2</i>	20310	nob	5	91979098	1H19	318	G	199	GCAAGGCTAAGTACTGACTGGA	TAAACATAACAACATCAGG
<i>Epgn</i>	71920	nob	5	92102716	1I16	268	C	400	CTCGATGGACCTAAATAGCAAAG	CGAACTTCAGTTCAAGCGGATG
<i>Ereg</i>	13874	nob	5	92149821	1P13	227	G	480	GCTGGGAATAAAAGTCAGAGC	GGGGTGAACCCAGATGAAAAGC
<i>Areg</i>	11839	nob	5	92214798	1A14	228	C	441	CATGCACTGCCCAAGTTTCAG	CATCTGGAACCATCCGAAAG
<i>Btc</i>	12223	nob	5	92432460	1B14	229	G	484	TATGGACCCAGAGTCAAAGC	CCACAAGAGTGGGAAAATGG
<i>9130213B05Rik</i>	231440	nob	5	92592884	1H21	1B3	P	473	M13 for	M13 rev
<i>Rchy1</i>	68098	nob	5	93024749	1K24	1F6	P	345	M13 for	M13 rev
<i>Thap6</i>	381650	nob	5	93044757	1A18	292	C	426	CGAGCTGGAGAATAACCAAGG	GCTGTCAACTGACCACAAAACC
<i>Cdkl2</i>	53886	nob	5	93097508	2C3	2B7	P	517	T3	T7
<i>E430034L04Rik</i>	23881	nob	5	93127355	1C14	230	C	427	CCGGAGAATAATTCGCTATCC	TTTCTGTGTCA TGCCACCTC
<i>Vdp-pending</i>	56041	nob	5	93213137	1H23	1E10	C	419	M13 for	M13 rev
<i>U90926</i>	57425	nob	5	93285094	1D14	231	C	403	GATACTCCGTCCTTCTCTGGTC	AGGGAGGAGTCACTGTGGTG
<i>Ppef2</i>	19023	nob	5	93301465	1E14	232	G	364	CAGACTTGGAAAGCTCTTCAGC	CATCTCTCCAGTCCAAAACAGG
<i>Asah1</i>	67111	nob	5	93351344	2G2	2A5	P	876	pME for	pME rev
<i>Sdad1</i>	231452	nob	5	93359201	1I24	1F4	P	488	M13 for	M13 rev
<i>Art3</i>	109979	nob	5	93407779	1G14	234	G	422	AGGCTCAAGAGCAGACTTCC	CTGAAGGACAAGGTCGTTGC

Tabelle A1: Übersicht über die Gene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Chr.	Pos. (Bp)	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	Größe PCR-Produkt (bp)	Primer for (5'→3')	Primer rev (5'→3')
<i>Cxcl10</i>	15945	nob	5	93421838	2N1	2B3	P	252	T3	T7
<i>Cxcl11</i>	56066	nob	5	93434896	1F14	233	G	491	CAAAATACACGAGGCACACG	GCATCTCAATGTCACAGAGC
<i>Nup54</i>	269113	nob	5	93510323	1H14	235	G	443	ACAACAGGAAGGCCTTAGCC	CGCTCTGTGCTATGGAGAGG
<i>Scarb2</i>	12492	nob	5	93516513	1114	236	G	350	CAGCCGGAGAAACCAAG	TCGATCGTCTGGTCTACCG
<i>Slc24a6</i>	170756	ce	5	120771808	1K4	60	G	456	GGTGAGAAAGGCTCCTGACTGC	CCTTGAGGTAGCCACAGAGC
<i>chkb</i>	12651	ce	15	89257665	1F20	336	G	448	AGAGACTGATAGGGGATCG	ACTCCCGGCACCACTGATAG
<i>clk1</i>	12747	ce	1	58368549	1L6	97	C	491	ACTGTGAAGCTGCTCAATCG	GACATCACATGGCTGTGACC
<i>Cntn1</i>	12805	ce	15	91956371	1B6	87	G	451	GACCTGGCTGTTTTATCC	CAGGAAACCAACATATAGGC
<i>Fmo3</i>	14262	ce	1	164821165	1G4	56	G	494	CAAAGCCCAATCCTCTATGG	AGGGACTTATGCCCACTGC
<i>Kcnk1</i>	16525	ce	8	128881259	1O5	83	G	421	CAATCATTTGCCGACAGC	GTCGGTCTACACCCTTGC
<i>Lrp1</i>	16971	ce	10	127024077	1A5	68	G	469	TTCCCAACCCAGTGTATGC	CGTTGAGTGTCTTGACAGG
<i>Mep1b</i>	17288	ce	18	21215353	1H6	93	G	383	TTTCGATGGTGTGAAAG	GTCACTGGTGGTCTGTGG
<i>Pax8</i>	18510	ce	2	24297574	1F5	73	G	486	GCTCTACATCAAGGCCAAGC	TGTAGCCAGAAAGGACTTGC
<i>Plk3c2a</i>	18704	ce	7	116209200	1L5	80	G	401	ACTCCGACTTCTGAGCTTTGG	TTTGTCTTTGCGTTTCAGC
<i>Pim1</i>	18712	ce	17	29217823	1B3	33	G	303	GACTTCTGGGGCTATTAG	CGTGTAGACTGTCTCTTGAGC
<i>Pknox1</i>	18771	ce	17	31312405	1F6	91	G	459	GACTCTTCACTGTTGCACAGC	ATCCAATAATCCAGCAAGG
<i>Ppara</i>	19013	ce	15	85563541	1A6	85	G	404	GACATGGAGACCTTGTGTATGG	AGGGAATGTCACCTGTCTATCC
<i>Ptp4a1</i>	19243	ce	1	30894290	1D4	53	G	455	AGTCTACTGCAGCTCCACAGG	ATGGCTAAGCAAACTGACG
<i>Rapsn</i>	19400	ce	2	90836477	1G5	74	G	305	GCCTGCTTAGCTTTTTGC	TCCTCCGAGTGAGCTGTTACC
<i>Rpia</i>	19895	ce	6	70721733	1H9	155	G	438	CTAAGCTGTGCAGGTCTCC	GATCCAAATGGCACAGTAACG
<i>Slc7a5</i>	20539	ce	8	124802592	1N5	82	G	439	AATCCACTGTCCCTCAAACG	CAGTGGAAACAGGTGATGTC
<i>Scarb1</i>	20778	ce	5	125630052	1J1	6	G	447	CTACACCCCGCTTCTTGAGG	GAAAAAGCCGACAGATACAGC
<i>Tyr</i>	22173	ce	7	87369171	1K5	79	G	495	GAAACAGAGTGGGACTGAAAGG	AAAAGCTGGCAGATGTTCTCC
<i>Nr5a2</i>	26424	ce	1	138776858	1E4	54	G	432	TGCCAAAAGAGCCCTAAGTCC	TTGAGTTGTTACAGCGTCACC
<i>Pdss1</i>	56075	ce	2	22747278	1E5	72	G	356	TGCAGCAAAACAACCTACCTC	ACCATCAGGATACCTCGATTAG
<i>Osbp1a</i>	64291	ce	18	13084888	1C6	88	G	458	GCCAGTGAGAAGCTGTTGG	TTGCCACTGGAAGTTGAGG
<i>Zfand6</i>	65098	ce	7	84555535	1M8	139	C	450	TTCCATTGCAGTTTCTGTGG	TCAGCTTTTCTTTCCCTTGC
<i>Zmat2</i>	66492	ce	18	36919896	1J6	95	G	491	GCTGTGATGGGTTTCTCTGG	GAGGAAGAGCTGGGTCAAGG
<i>Hddc3</i>	68695	ce	7	80216649	1N4	63	G	416	ATGGTCAGAAACCCGAGTCC	AACCACGGACGCTTATTCC
<i>March8</i>	71779	ce	6	116303741	1M4	62	G	449	GACTCAGTGCAGGAGACTGG	GTGTCTGAAAGCCAGAAAGG
<i>Isyna1</i>	71780	ce	8	73523469	1P4	65	G	250	CCACATGCTATTAGAGCACAAAG	GGCAAGGCCTGAAGTACTATG
<i>P116</i>	74116	ce	17	29046244	1E6	90	G	489	TGTAAGTGAAGTCCCTTGG	GCATTACCCGAAAGCACTAGG
<i>8430415E04Rik</i>	74521	ce	12	103933614	1P5	84	G	401	GCTTGGTGAAGGAGACAAAG	GAAAACAGTGCCTTCTCCCTTCC
<i>Setmar</i>	74729	ce	6	108030821	1L4	61	G	402	TATGCTGGGGAGGTGTTAGG	GTCATAGGCGAGGAAAGTGG
<i>Trim44</i>	80985	ce	2	102201738	1H5	75	G	476	ATGCCAGAAAGTTCCCTCAGC	CCCAATGACTGGACACAGG
<i>Lass1</i>	93898	ce	8	73244775	1M5	81	G	488	CAGTCGCTTTGACCTGTCC	GCAGAAAGTTGGTAGGAAGC
<i>Prg4</i>	96875	ce	1	64325891	1F4	55	G	436	AAGAAACCCCAATCCAGAACCC	GCTCCTTGGGAGTGGTAGG
<i>Bmp2k</i>	140780	ce	5	97237990	1J4	59	G	458	AGGAACCCAGAGTTTGTCCAGC	CGTGCACCTTCTAACAAATGC

Tabelle A1: Übersicht über die Gene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Chr.	Pos. (Bp)	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	Größe PCR-Produkt (bp)	Primer for (5'→3')	Primer rev (5'→3')
<i>Tfkb2</i>	140810	ce	2	120542044	1K8	137	C	443	CATGTTGGTGGAGTTTGTGG	CAACAGGATTCCATTCTCC
<i>Stard5</i>	170460	ce	7	83508201	1L8	138	C	440	GCTACCCATGTGGAACATCC	TGGTTAGCTCCTTCCACACC
<i>March2</i>	224703	ce	17	33325384	1G6	92	G	437	GGATCCACATCACTCCTTGC	CCAGCTAGGTGCAGAGTAACG
<i>Lims2</i>	225341	ce	18	32074516	1I6	94	G	474	CCTGCCTGCAGTACCTTAGC	GAAAGCAGTAGGGCTCTCG
<i>Frag1</i>	233575	ce	7	102096894	1O4	64	G	316	CTGTTGTCTTAACCAACATGG	ACCAAGTGGTGGAGCTTTCC
<i>Pkmy1</i>	268930	ce	17	23454062	1D6	89	G	455	GTGCGCTCTAAGGAAGATGG	AGTTCTGGGGCCATGTAGC
<i>scd1</i>	20249	con	19	44460863	1D5	71	G	461	CTTACCACGTTCTTCATCG	GCATCAAAACACAGCATGTTCC
<i>pck1</i>	18534	con	2	172796011	1O14	242	G	449	GTGCTGGAGTGGATGTTCC	CCCCTCCCAATCTTATTTGC
<i>pcx</i>	18563	con	19	4594345	1P14	243	G	455	TGGAGACTGTGGTGACTTCG	CCCAGGACCTGTGAATTAGG
<i>fasn</i>	14104	con	11	120640331	1A15	244	G	468	ACCAGAGATGCTCCGATCC	AACCAGCCCTCTCCATATCC
<i>acacb</i>	100705	con	5	114426516	1B15	245	C	311	AGCTGAACCACGACACAC	CGTGGTAGACAGCAGCTGAG
<i>Crat</i>	12908	con	2	30237756	1I18	302	C	497	GGAAATCCTCACTGCAATCC	GATGCTGAGGTTCTGTTGG
<i>cpt2</i>	12896	con	4	107421465	1J18	303	G	467	ACCGCTGGTTTGATAAGTCC	TGGCGAATAGTCTCTGTGC
<i>cpt1b</i>	12895	con	15	89253113	1K18	304	G	478	TCCAAGACAGACAGCTGAGG	CACATGAGAGGTTGGACAGC
<i>Srebf1</i>	20787	con	11	60036798	1B19	312	G	520	TATCTGCCCTGCCCTTCC	GCAGACATCTGCCATCCC
<i>Adipoor1</i>	72674	con	1	136231877	1C19	313	G	409	GCCTAGAAGGTGGCTGTACC	AAGTAAGGACGGGGGTAAGG
<i>acaca</i>	107476	con	11	84011658	1D20	334	C	247	ATGGGCTGCTTCTGTGACTC	CCTTTTGTGCAACTAGGAACG
<i>canx</i>	12330	con	11	50169013	1E20	335	C	411	GGAACTGCAGCTGTTGAGG	CTGAACAATGAGAGGCTTGG
<i>Gapdh</i>	407972	con	6	125131222	2A4	G	G	453	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCCACCACCCTGTTGCTGTA
<i>Slc4a2</i>	20535	con	5	23935383	2B4	10	G	387	CTGCCTAAAACCCGAGAACCC	TCTGGGGCTAAGAACATCC
<i>Slc4a4</i>	54403	con	5	90009307	2C4	11	G	470	CCCCTGTGTGATTCTTTTGG	GGGGAAACAAGAAAGTGTGG
<i>Arf1</i>	11840	con	11	59044380	2D4	66	G	469	CTCTACGCCACAGGAACCTGG	CCAACCCCAAAATGGATACC
<i>H3f3a</i>	15078	con	1	182650277	2E4	67	G	461	ACTGGAGGGGTGAAGAAACC	GTCCCCATATGTTTCCACTCG

Abkürzungen: ID – Identifikationsnummer; nob – *Nob1*-Gen; ce – *C. elegans*-Gen; con – Kontroll-Gen; Chr. – Chromosom; Pos. (Bp) – Position auf Chromosom 5 in Basenpaaren (basierend auf NCBI Build 36.1, 2007); PCR – Polymerase-Kettenreaktion; G – genomische DNA; C – cDNA; P – Plasmid-DNA; bp – Basenpaare; for – in Leserichtung; rev - komplementär

Tabelle A2: Übersicht über die RZPD-Kontrollgene auf dem Macroarray

Name	Entrez Gene ID	Typ	Pos_Chrom.	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	PCR Primer
<i>Pcdh11x</i>	245578	uni	X x e1	3B01	RK 001	P	M13 forward/reverse
<i>Ppig</i>	228005	uni	2 C2	3C01	RK 002	P	M13 forward/reverse
<i>Slc7a6os</i>	66432	uni	8 D3	3D01	RK 003	P	M13 forward/reverse
<i>Zfp185</i>	22673	uni	X x 28.95 cM	3E01	RK 004	P	M13 forward/reverse
<i>Rnf17</i>	30054	uni	14 c1	3G01	RK 005	P	M13 forward/reverse
<i>Ntn2l</i>	18209	uni	17 A3.3	3H01	RK 006	P	M13 forward/reverse
<i>Og9x</i>	18292	uni	11 45.0 cM	3J01	RK 007	P	M13 forward/reverse
<i>Nlgn1</i>	192167	uni	3 a3	3L01	RK 010	P	M13 forward/reverse
<i>Chek1</i>	12649	uni	9 a5.3	3N01	RK 011	P	M13 forward/reverse
<i>C330003B14Rik</i>	105594	uni	14 a3	3O01	RK 012	P	M13 forward/reverse
<i>AA407452</i>	57867	uni	6	3P01	RK 013	P	M13 forward/reverse
<i>Cnih4</i>	98417	uni	1 h4	3B02	RK 014	P	M13 forward/reverse
<i>Tlr8</i>	170744	uni	X x f5	3C02	RK 016	P	M13 forward/reverse
<i>Vwf</i>	22371	uni	6 60.8 cM	3E02	RK 017	P	M13 forward/reverse
<i>A630082K20Rik</i>	338523	uni	6	3F02	RK 018	P	M13 forward/reverse
<i>Gpr150</i>	238725	uni	13 C1	3G02	RK 019	P	M13 forward/reverse
<i>Zfp654</i>	72020	uni	16 C1.3	3I02	RK 020	P	M13 forward/reverse
<i>D130020L05Rik</i>	319760	uni	12	3J02	RK 021	P	M13 forward/reverse
<i>Ppil5</i>	69706	uni	12 C3	3L02	RK 022	P	M13 forward/reverse
<i>4930471M09Rik</i>	75787	uni	6	3M02	RK 024	P	M13 forward/reverse
<i>Srd5a1</i>	78925	uni	13 39.0 cM	3N02	RK 025	P	M13 forward/reverse
<i>Pde10a</i>	23984	uni	17 a1	3P02	RK 026	P	M13 forward/reverse
<i>BC027231</i>	212547	uni	16 b4	3A03	RK 028	P	M13 forward/reverse
<i>Pag</i>	94212	uni	3 A1	3C03	RK 030	P	M13 forward/reverse
<i>2610304G08Rik</i>	70470	uni	2 h2	3D03	RK 031	P	M13 forward/reverse
<i>2310057B04Rik</i>	69690	uni	13	3F03	RK 032	P	M13 forward/reverse
<i>LOC545428</i>	545428	uni	2 C3	3G03	RK 033	P	M13 forward/reverse
<i>Mrp63</i>	67840	uni	14 c2	3H03	RK 034	P	M13 forward/reverse
<i>Ppp2r5c</i>	26931	uni	12 57.0 cM	3J03	RK 035	P	M13 forward/reverse
<i>Dmt2</i>	110333	uni	10 50.0 cM	3K03	RK 036	P	M13 forward/reverse
<i>Adrm1</i>	56436	uni	2 h4	3L03	RK 042	P	M13 forward/reverse
<i>Hoxb9</i>	15417	uni	11 56.0 cM	3O03	RK 044	P	M13 forward/reverse
<i>Tac4</i>	93670	uni	11 d	3P03	RK 045	P	M13 forward/reverse
<i>Adcyap1</i>	11516	uni	17 e5	3B04	RK 047	P	M13 forward/reverse
<i>Tmem77</i>	67171	uni	3 F3	3C04	RK 048	P	M13 forward/reverse
<i>Ptdss2</i>	27388	uni	7 f4	3E04	RK 051	P	M13 forward/reverse
<i>Rnmtl1</i>	67390	uni	11 B5	3G04	RK 063	P	M13 forward/reverse
<i>Hrmt1l6</i>	99890	uni	3 F3	3J04	RK 071	P	M13 forward/reverse
<i>Pcdh19</i>	279653	uni	X E3	3L04	RK 077	P	M13 forward/reverse
<i>Trub1</i>	72133	uni	19 D2	3M04	RK 081	P	M13 forward/T7
<i>2310058N22Rik</i>	71921	uni	12	3N04	RK 082	P	M13 forward/T7
<i>Ctla4</i>	12477	uni	1 30.1 cM	3P04	RK 083	P	M13 forward/T7
<i>5830448L21Rik</i>	76057	uni	6	3A05	RK 084	P	M13 forward/T7
<i>Usp49</i>	224836	uni	17 c	3C05	RK 085	P	M13 forward/T7
<i>Cnot2</i>	72068	uni	10 d2	3D05	RK 086	P	M13 forward/T7
<i>Ches1</i>	71375	uni	12 f1	3E05	RK 087	P	M13 forward/T7
<i>1110059M19Rik</i>	68800	uni	X x a3.3	3G05	RK 088	P	M13 forward/T7
<i>Apaf1</i>	11783	uni	10 48.0 cM	3H05	RK 089	P	M13 forward/T7
<i>4833439L19Rik</i>	97820	uni	13 B1	3I05	RK 090	P	M13 forward/T7
<i>Ptpn22</i>	19260	uni	3 F3	3K05	RK 091	P	M13 forward/T7

Tabelle A2: Übersicht über die RZPD-Kontrollgene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Pos_Chrom.	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	PCR Primer
<i>Osbp13</i>	71720	uni	6 b3	3L05	RK 092	P	M13 forward/T7
<i>A930007B11Rik</i>	77944	uni	16	3N05	RK 093	P	M13 forward/T7
<i>Ccl2</i>	20296	uni	11 46.5 cM	3O05	RK 094	P	M13 forward/T7
<i>Rbm16</i>	106583	uni	17 a1	3A06	RK 095	P	M13 forward/T7
<i>A630076J17Rik</i>	319929	uni	3 f2.3	3B06	RK 096	P	M13 forward/T7
<i>Aldh16a1</i>	69748	uni	7 B3	3C06	RK 097	P	M13 forward/T7
<i>A730046J16</i>	329124	uni	1 b	3E06	RK 098	P	M13 forward/T7
<i>Ankrd13d</i>	68423	uni	19 A	3F06	RK 099	P	M13 forward/T7
<i>Ifih1</i>	71586	uni	2 c3	3H06	RK 100	P	M13 forward/T7
<i>2310067B10Rik</i>	71947	uni	11 e2	3I06	RK 101	P	M13 forward/T7
<i>Shox2</i>	20429	uni	3 31.6 cM	3J06	RK 102	P	M13 forward/T7
<i>a</i>	50518	uni	2 89.0 cM	3N03	RK 103	P	M13 forward/T7
<i>Gls</i>	14660	uni	1 25.9 cM	3M06	RK 105	P	M13 forward/T7
<i>Zap70</i>	22637	uni	1 20.5 cM	3O06	RK 106	P	M13 forward/T7
<i>Stk19</i>	54402	uni	17 b1	3P06	RK 107	P	M13 forward/T7
<i>2310002J15Rik</i>	67859	uni	2 a3	3B07	RK 108	P	M13 forward/T7
<i>Dapk3</i>	13144	uni	10 43.0 cM	3C07	RK 110	P	M13 forward/T7
<i>Edn1</i>	13614	uni	13 26.0 cM	3D07	RK 111	P	M13 forward/T7
<i>Rps12</i>	20042	uni	10 A3	3F07	RK 112	P	M13 forward/T7
<i>Zfp354a</i>	21408	uni	11 28.0 cM	3G07	RK 113	P	M13 forward/T7
<i>Rims4</i>	241770	uni	2 h3	3E03	RK 114	P	M13 forward/T7
<i>Mmp15</i>	17388	uni	8 45.5 cM	3A07	RK 117	P	M13 forward/T7
<i>6230429P13Rik</i>	76134	uni	16 b2	3J07	RK 118	P	M13 forward/T7
<i>2310002L13Rik</i>	75577	uni	18 e2	3M07	RK 120	P	M13 forward/T7
<i>Gpc1</i>	14733	uni	1 d	3N07	RK 122	P	M13 forward/T7
<i>Cd80</i>	12519	uni	16 28.0 cM	3I07	RK 123	P	M13 forward/T7
<i>2810429K17Rik</i>	77041	uni	13 c1	3J08	RK 124	P	M13 forward/T7
<i>Pi4k2b</i>	67073	uni	5 C1	3K02	RK 125	P	M13 forward/T7
<i>Pde7a</i>	18583	uni	3 7.0 cM	3O02	RK 126	P	M13 forward/T7
<i>Rbms2</i>	56516	uni	10 d3	3P07	RK 128	P	M13 forward/T7
<i>Plekhg4</i>	102075	uni	8 d3	3O07	RK 129	P	M13 forward/T7
<i>Pparbp</i>	19014	uni	11 d	3A08	RK 130	P	M13 forward/T7
<i>A830058L05Rik</i>	210503	uni	17 a3.2	3D04	RK 131	P	M13 forward/T7
<i>Ptprg</i>	19270	uni	14 2.0 cM	3D02	RK 132	P	M13 forward/T7
<i>Tsga14</i>	83922	uni	6 a3.3	3B08	RK 133	P	M13 forward/T7
<i>Mmp19</i>	58223	uni	10 70.0 cM	3D08	RK 134	P	M13 forward/T7
<i>5133401H06Rik</i>	71305	uni	3	3A09	RK 135	P	M13 forward/T7
<i>Dab2</i>	13132	uni	15 6.7 cM	3E08	RK 136	P	M13 forward/T7
<i>2610027H17Rik</i>	71811	uni	14	3M08	RK 137	P	M13 forward/T7
<i>Mecp2</i>	17257	uni	X x 29.6 cM	3F08	RK 138	P	M13 forward/T7
<i>Rbms3</i>	207181	uni	9 f3	3E07	RK 141	P	M13 forward/T7
<i>Ngly1</i>	59007	uni	14 4.0 cM	3C08	RK 142	P	M13 forward/T7
<i>9030611O19Rik</i>	104943	uni	12 a2	3F05	RK 143	P	M13 forward/T7
<i>Txnip</i>	56338	uni	3	3L07	RK 144	P	M13 forward/T7
<i>Hoxb13</i>	15408	uni	11 56.0 cM	3H08	RK 147	P	M13 forward/T7
<i>Kcnk2</i>	16526	uni	1 h6	3I08	RK 148	P	M13 forward/T7
<i>2310014D11Rik</i>	69633	uni	19 c3	3K08	RK 149	P	M13 forward/T7
<i>Asb5</i>	76294	uni	8 b3.1	3H02	RK 151	P	M13 forward/T7
<i>Akap10</i>	56697	uni	11 b2	3D06	RK 152	P	M13 forward/T7
<i>Dctn4</i>	67665	uni	18 d2	3G06	RK 153	P	M13 forward/T7

Tabelle A2: Übersicht über die RZPD-Kontrollgene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Pos_Chrom.	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	PCR Primer
<i>Tubg1</i>	103733	uni	10 41.0 cM	3O04	RK 154	P	M13 forward/T7
<i>Npc1</i>	18145	uni	18 4.0 cM	3N08	RK 155	P	M13 forward/T7
<i>D130059P03Rik</i>	320538	uni	6 b1	3O08	RK 156	P	M13 forward/T7
<i>Dhx30</i>	72831	uni	9 f2	3J05	RK 157	P	M13 forward/T7
<i>Amigo1</i>	229715	uni	3 F3	3B05	RK 158	P	M13 forward/T7
<i>D030056L22Rik</i>	225995	uni	19 B	3P08	RK 159	P	M13 forward/T7
<i>D030011O10Rik</i>	320560	uni	6 g3	3B09	RK 160	P	M13 forward/T7
<i>Bace2</i>	56175	uni	16 c4	3M05	RK 161	P	M13 forward/T7
<i>Vamp4</i>	53330	uni	1 85.0 cM	3C09	RK 162	P	M13 forward/T7
<i>Ltap</i>	93840	uni	1 93.4 cM	3D09	RK 163	P	M13 forward/T7
<i>Gga1</i>	106039	uni	15 e2	3P05	RK 164	P	M13 forward/T7
<i>Hfe</i>	15216	uni	13 15.0 cM	3F09	RK 165	P	M13 forward/T7
<i>Iqgap1</i>	29875	uni	7 39.0 cM	3G09	RK 166	P	M13 forward/T7
<i>E330022O07</i>	330804	uni	8 c1	3H09	RK 167	P	M13 forward/T7
<i>1810011O10Rik</i>	69068	uni	8 a2	3J09	RK 168	P	M13 forward/T7
<i>Aven</i>	74268	uni	2 E4	3K09	RK 169	P	M13 forward/T7
<i>Txndc13</i>	52837	uni	2 77.0 cM	3M09	RK 170	P	M13 forward/T7
<i>Plac1</i>	56096	uni	X x 16.0 cM	3H04	RK 171	P	M13 forward/T7
<i>Dcp2</i>	70640	uni	18 B3	3N09	RK 172	P	M13 forward/T7
<i>E430014B02Rik</i>	320908	uni	17	3P09	RK 173	P	M13 forward/T7
<i>Calca</i>	12310	uni	7 54.0 cM	3A04	RK 174	P	M13 forward/T7
<i>Ccr2</i>	12772	uni	9 71.9 cM	3I03	RK 175	P	M13 forward/T7
<i>Ulk2</i>	29869	uni	11 B2	3K04	RK 176	P	M13 forward/T7
<i>Rgag4</i>	331474	uni	X D	3A10	RK 177	P	M13 forward/T7
<i>Dhdh</i>	71755	uni	7 B2	3B10	RK 178	P	M13 forward/T7
<i>Pik3cb</i>	74769	uni	9 E4	3D10	RK 179	P	M13 forward/T7
<i>Gcet2</i>	14525	uni	16 B5	3E10	RK 180	P	M13 forward/T7
<i>Phf12</i>	268448	uni	11 b5	3G10	RK 181	P	M13 forward/T7
<i>Dapk2</i>	13143	uni	9 32.0 cM	3H10	RK 182	P	M13 forward/T7
<i>Cd209e</i>	170780	uni	8 A1.1	3I10	RK 183	P	M13 forward/T7
<i>C530028O21Rik</i>	319352	uni	6	3K10	RK 184	P	M13 forward/T7
<i>Slc9a3</i>	105243	uni	13 43.0 cM	3L10	RK 185	P	M13 forward/T7
<i>Slc23a2</i>	54338	uni	2 g2	3N10	RK 187	P	M13 forward/T7
<i>Pdlim7</i>	67399	uni	13 B2	3O10	RK 188	P	M13 forward/T7
<i>Pik4cb</i>	107650	uni	3 f2.1	3P10	RK 189	P	M13 forward/T7
<i>Dlgh2</i>	23859	uni	7 d3	3B11	RK 190	P	M13 forward/T7
<i>Siat7c</i>	20447	uni	3 h3	3C11	RK 191	P	M13 forward/T7
<i>Sall2</i>	50524	uni	14 b-c1	3E11	RK 193	P	M13 forward/T7
<i>Dennd2d</i>	72121	uni	3 F2.3	3F11	RK 194	P	M13 forward/T7
<i>Extl2</i>	58193	uni	3 g1	3G11	RK 195	P	M13 forward/T7
<i>Tm9sf1</i>	74140	uni	14 c1	3I11	RK 196	P	M13 forward/T7
<i>Cd274</i>	60533	uni	19 C2	3J11	RK 197	P	M13 forward/T7
<i>Mrps5</i>	77721	uni	2 f3	3L11	RK 198	P	M13 forward/T7
<i>Dzip11</i>	72507	uni	9 F1	3M11	RK 200	P	M13 forward/T7
<i>BC024561</i>	232983	uni	7 a2	3N11	RK 201	P	M13 forward/T7
<i>Asxl2</i>	75302	uni	12 A1.1	3P11	RK 202	P	M13 forward/T7
<i>Zfp64</i>	22722	uni	2 98.0 cM	3A12	RK 203	P	M13 forward/T7
<i>C1qtnf1</i>	56745	uni	11 e2	3D12	RK 208	P	M13 forward/T7
<i>Amacr</i>	17117	uni	15 b1	3E12	RK 210	P	M13 forward/T7
<i>Nphp3</i>	74025	uni	9 61.0 cM	3G12	RK 212	P	M13 forward/T7

Tabelle A2: Übersicht über die RZPD-Kontrollgene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Pos_Chrom.	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	PCR Primer
<i>Srpx</i>	51795	uni	X A1.2	3H12	RK 213	P	M13 forward/T7
<i>4732496G21Rik</i>	320162	uni	11 e1	3J12	RK 215	P	M13 forward/T7
<i>Srpx2</i>	68792	uni	X E3	3K12	RK 216	P	M13 forward/T7
<i>2610206C17Rik</i>	72495	uni	7 d2	3L12	RK 217	P	M13 forward/T7
<i>Dock10</i>	210293	uni	1 C4	3N12	RK 218	P	M13 forward/T7
<i>4933425L03Rik</i>	71169	uni	12 A3	3O12	RK 219	P	M13 forward/T7
<i>1700123A16Rik</i>	73610	uni	10 C1	3P12	RK 222	P	M13 forward/T7
<i>9330180L21Rik</i>	77268	uni	14 a3	3B13	RK 223	P	M13 forward/T7
<i>0610013E23Rik</i>	76892	uni	11 C	3C13	RK 224	P	M13 forward/T7
<i>Gzmb</i>	14939	uni	14 20.5 cM	3E13	RK 226	P	M13 forward/T7
<i>Stard4</i>	170459	uni	18 b1	3H13	RK 229	P	M13 forward/T7
<i>Gtrgeo22</i>	110012	uni	10 43.0 cM	3I13	RK 230	P	M13 forward/T7
<i>Lztf1</i>	93730	uni	9 71.1 cM	3J13	RK 231	P	M13 forward/T7
<i>4932438H23Rik</i>	74387	uni	16 c3.3	3L13	RK 232	P	M13 forward/T7
<i>1810037C20Rik</i>	66294	uni	X x a7.1	3M13	RK 233	P	M13 forward/T7
<i>Klhdc1</i>	271005	uni	12 c2	3O13	RK 234	P	M13 forward/T7
<i>Trim17</i>	56631	uni	11 B1.2- B1.3	3N06	RK 235	P	M13 forward/T7
<i>Nicn1</i>	66257	uni	9 f2	3A14	RK 237	P	M13 forward/T7
<i>Nktr</i>	18087	uni	9 71.0 cM	3C14	RK 238	P	M13 forward/T7
<i>Homer2</i>	26557	uni	7 d1	3D14	RK 239	P	M13 forward/T7
<i>Lum</i>	17022	uni	10 61.0 cM	3F14	RK 242	P	M13 forward/T7
<i>6530415H11Rik</i>	76245	uni	7 e2	3G14	RK 243	P	M13 forward/T7
<i>Kihl18</i>	270201	uni	9 F2	3H14	RK 244	P	M13 forward/T7
<i>Psmb3</i>	26446	uni	11 58.3 cM	3J14	RK 245	P	M13 forward/T7
<i>Spata13</i>	219140	uni	14 30.5 cM	3K14	RK 246	P	M13 forward/T7
<i>Pgm5</i>	226041	uni	19 b	3M14	RK 251	P	T3/T7
<i>9830124H08Rik</i>	219105	uni	14 C3	3N14	RK 252	P	T3/T7
<i>Zdhhc2</i>	70546	uni	8 a4	3O14	RK 271	P	M13 forward/reverse
<i>2610306H15Rik</i>	72514	uni	19 c2	3A15	RK 272	P	M13 forward/reverse
<i>Stxbp5</i>	78808	uni	10 A2	3B15	RK 273	P	M13 forward/reverse
<i>Spna2</i>	20740	uni	2 18.0 cM	3D15	RK 274	P	M13 forward/reverse
<i>Cnot1</i>	234594	uni	8 D1	3F15	RK 276	P	M13 forward/reverse
<i>Stambpl1</i>	76630	uni	19 C1	3H15	RK 277	P	M13 forward/reverse
<i>Jmjd1c</i>	108829	uni	10 B5.1	3K15	RK 279	P	M13 forward/reverse
<i>Neo1</i>	18007	uni	9 b	3L15	RK 280	P	M13 forward/reverse
<i>4930429A22Rik</i>	208718	uni	1 c5	3M15	RK 281	P	M13 forward/reverse
<i>Smarcad1</i>	13990	uni	6 29.69 cM	3O15	RK 283	P	M13 forward/reverse
<i>Prkcsh</i>	19089	uni	9 6.0 cM	3P15	RK 284	P	M13 forward/reverse
<i>Gan</i>	209239	uni	8 e1	3A16	RK 285	P	M13 forward/reverse
<i>Fmr1nb</i>	207854	uni	X A7.1	3C16	RK 286	P	M13 forward/reverse
<i>Mrpl21</i>	353242	uni	19 A	3D16	RK 287	P	M13 forward/reverse
<i>Acsl6</i>	216739	uni	11 29.35 cM	3F16	RK 288	P	M13 forward/reverse
<i>Exoc8</i>	102058	uni	8 E2	3G16	RK 289	P	M13 forward/reverse
<i>Cenpe</i>	229841	uni	3 0.1 cM	3I16	RK 290	P	M13 forward/reverse
<i>D630004K10Rik</i>	103210	uni	10	3M16	RK 296	P	M13 forward/T7
<i>Cspg6</i>	13006	uni	19 d2	3N16	RK 297	P	M13 forward/T7
<i>1700021K02Rik</i>	65971	uni	10 b4	3P16	RK 298	P	M13 forward/T7
<i>2900056L01Rik</i>	73050	uni	15	3A17	RK 299	P	M13 forward/T7
<i>Hspa4l</i>	18415	uni	3 B	3C19	RK 324	P	M13 forward/T7
<i>Dnajc17</i>	69408	uni	2 36.0 cM	3D19	RK 326	P	M13 forward/T7

Tabelle A2: Übersicht über die RZPD-Kontrollgene auf dem Macroarray (Fortsetzung)

Name	Entrez Gene ID	Typ	Pos_Chr.	Array-Position	interne ID	Template erste PCR	PCR Primer
<i>Mthfs</i>	107885	uni	9	3F19	RK 327	P	M13 forward/T7
<i>Guk1</i>	14923	uni	11 b1.3	3G19	RK 328	P	M13 forward/T7
<i>Rnf111</i>	93836	uni	9 39.0 cM	3I19	RK 330	P	M13 forward/T7
<i>Pdcd11</i>	18572	uni	19 d2	3J19	RK 331	P	M13 forward/T7
<i>Abpb</i>	233099	uni	7 B1	3L19	RK 332	P	M13 forward/T7
<i>Bcat2</i>	12036	uni	7 23.0 cM	3M19	RK 333	P	M13 forward/T7
<i>Zbtb41</i>	226470	uni	1 F	3O19	RK 334	P	M13 forward/T7
<i>Matn2</i>	17181	uni	15 b3.3	3P19	RK 336	P	M13 forward/T7
<i>Klf15</i>	66277	uni	6 d1	3B20	RK 337	P	M13 forward/T7
<i>Emp3</i>	13732	uni	7 24.5 cM	3C20	RK 338	P	M13 forward/T7
<i>Nfatc2ip</i>	18020	uni	7 f3	3E20	RK 339	P	M13 forward/T7
<i>Thoc4</i>	21681	uni	11 E2	3F20	RK 340	P	M13 forward/T7
<i>Fem1c</i>	240263	uni	18 c	3H20	RK 341	P	M13 forward/T7
<i>Sip1</i>	66603	uni	12 c2	3I20	RK 345	P	M13 forward/T7
<i>B3galt3</i>	26879	uni	3 e2	3K20	RK 347	P	M13 forward/T7
<i>Tmem17</i>	103765	uni	11 A3.2	3L20	RK 348	P	M13 forward/T7
<i>Ing3</i>	71777	uni	6 a3	3N20	RK 350	P	M13 forward/T7

Abkürzungen: ID – Identitätsnummer; uni – RZPD-*Unigene*-Kontrollgen; Pos_Chr. – Position auf Chromosom; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; P – Plasmid-DNA

Sequenz-Alignment *Tbc1d1*

NZO-1: NZO lange Isoform
 NZO-k: NZO kurze Isoform
 SJL-k: SJL kurze Isoform

NZO-1	GAAGCAGAGACTGTGGAGTGGACCCCCACCCCAGCAGCGTGGGGCGGCAAGAGCACAGCC	60 bp
NZO-k	GAAGCAGAGACTGTGGAGTGGACCCCCACCCCAGCAGCGTGGGGCGGCAAGAGCACAGCC	60 bp
SJL-k	GAAGCAGAGACTGTGGAGTGGACCCCCACCCCAGCAGCGTGGGGCGGCAAGAGCACAGCC	60 bp

NZO-1	AGCTGAGGACCATGGACGCCCCGCCCCAGGCCATCTTCTGGGTGCCCGGGAGCACCT	120 bp
NZO-k	AGCTGAGGACCATGGACGCCCCGCCCCAGGCCATCTTCTGGGTGCCCGGGAGCACCT	120 bp
SJL-k	AGCTGAGGACCATGGACGCCCCGCCCCAGGCCATCTTCTGGGTGCCCGGGAGCACCT	120 bp

NZO-1	GCGCGCCCTAGCTCAGCCCGGAGTTCTGAGCGTGCCACCTCACTGGATTCTGCCCTCAGA	180 bp
NZO-k	GCGCGCCCTAGCTCAGCCCGGAGTTCTGAGCGTGCCACCTCACTGGATTCTGCCCTCAGA	180 bp
SJL-k	GCGCGCCCTAGCTCAGCCCGGAGTTCTGAGCGTGCCACCTCACTGGATTCTGCCCTCAGA	180 bp

NZO-1	AGCACGTGAAATAGATCACTTCATTTAAAGTAGGAAAATAGTAGCACGTTTCTGGCTC	240 bp
NZO-k	AGCACGTGAAATAGATCACTTCATTTAAAGTAGGAAAATAGTAGCACGTTTCTGGCTC	240 bp
SJL-k	AGCACGTGAAATAGATCACTTCATTTAAAGTAGGAAAATAGTAGCACGTTTCTGGCTC	240 bp

	Startcodon	
NZO-1	TCCAGACCTCTCCAGGATGGAGGCAATCACATTCACAGCGAGGAAGCATCCGTTCCCTA	300 bp
NZO-k	TCCAGACCTCTCCAGGATGGAGGCAATCACATTCACAGCGAGGAAGCATCCGTTCCCTA	300 bp
SJL-k	TCCAGACCTCTCCAGGATGGAGGCAATCACATTCACAGCGAGGAAGCATCCGTTCCCTA	300 bp

AS	1 M E A I T F T A R K H P F P	
NZO-1	ACGAAGTCTCCGTGGACTTCGGCTTGCAGCTGGTGGGCTCCTTACCCGTGCATTCTCTCA	360 bp
NZO-k	ACGAAGTCTCCGTGGACTTCGGCTTGCAGCTGGTGGGCTCCTTACCCGTGCATTCTCTCA	360 bp
SJL-k	ACGAAGTCTCCGTGGACTTCGGCTTGCAGCTGGTGGGCTCCTTACCCGTGCATTCTCTCA	360 bp

AS	15 N E V S V D F G L Q L V G S L P V H S L	
	2f	
NZO-1	CCACTATGCCCATGCTGCCGTGGGTGGTAGCCGAGGTACGAAGACTCAGTGGCCAGTGCT	420 bp
NZO-k	CCACTATGCCCATGCTGCCGTGGGTGGTAGCCGAGGTACGAAGACTCAGTGGCCAGTGCT	420 bp
SJL-k	CCACTATGCCCATGCTGCCGTGGGTGGTAGCCGAGGTACGAAGACTCAGTGGCCAGTGCT	420 bp

AS	35 T T M P M L P W V V A E V R R L S G Q C	
NZO-1	CTAAAAAGGAGCCTAGGACAAAAGCAAGTCCGCCTTTGGGTTTCGCCCTCCGGACTGCGGT	480 bp
NZO-k	CTAAAAAGGAGCCTAGGACAAAAGCAAGTCCGCCTTTGGGTTTCGCCCTCCGGACTGCGGT	480 bp
SJL-k	CTAAAAAGGAGCCTAGGACAAAAGCAAGTCCGCCTTTGGGTTTCGCCCTCCGGACTGCGGT	480 bp

AS	55 S K K E P R T K Q V R L W V S P S G L R	
	1r	
NZO-1	GCGAGCCTGACCTGGAGAAAAGTCAACCATGGGACCCGCTCATCTGTTCCAGCATCTTTG	540 bp
NZO-k	GCGAGCCTGACCTGGAGAAAAGTCAACCATGGGACCCGCTCATCTGTTCCAGCATCTTTG	540 bp
SJL-k	GCGAGCCTGACCTGGAGAAAAGTCAACCATGGGACCCGCTCATCTGTTCCAGCATCTTTG	540 bp

AS	75 C E P D L E K S Q P W D P L I C S S I F	
NZO-1	AGTGCAAGCCTCAGCGTGTGCACAAACTGATTCACAACAGTCACGACCCGAGTACTTTG	600 bp
NZO-k	AGTGCAAGCCTCAGCGTGTGCACAAACTGATTCACAACAGTCACGACCCGAGTACTTTG	600 bp
SJL-k	AGTGCAAGCCTCAGCGTGTGCACAAACTGATTCACAACAGTCACGACCCGAGTACTTTG	600 bp

AS	95 E C K P Q R V H K L I H N S H D P S Y F	

NZO-1	CTTGCCCTCATTAAGGAGGATGCTGCGCACAGGCAGAGCCTCTGCTATGTGTGTTAAAGCAG	660 bp
NZO-k	CTTGCCCTCATTAAGGAGGATGCTGCGCACAGGCAGAGCCTCTGCTATGTGTGTTAAAGCAG	660 bp
SJL-k	CTTGCCCTCATTAAGGAGGATGCTGCGCACAGGCAGAGCCTCTGCTATGTGTGTTAAAGCAG	660 bp

AS 115	A C L I K E D A A H R Q S L C Y V F K A	
	<i>PCR-Produkt Macroarray</i>	
NZO-1	ACGATCAAACAAAAGTGCCTGAGATCATCAGCTCCATCCGGCAGGCCGGGAAGATTGCC	720 bp
NZO-k	ACGATCAAACAAAAGTGCCTGAGATCATCAGCTCCATCCGGCAGGCCGGGAAGATTGCC	720 bp
SJL-k	ACGATCAAACAAAAGTGCCTGAGATCATCAGCTCCATCCGGCAGGCCGGGAAGATTGCC	720 bp

AS 135	D D Q T K V P E I I S S I R Q A G K I A	
NZO-1	GCCAGGAAGAGCTGCGTTGCCCTCCGAGTTCGACGATACCTTCGCCAAAAAGTTCGAGG	780 bp
NZO-k	GCCAGGAAGAGCTGCGTTGCCCTCCGAGTTCGACGATACCTTCGCCAAAAAGTTCGAGG	780 bp
SJL-k	GCCAGGAAGAGCTGCGTTGCCCTCCGAGTTCGACGATACCTTCGCCAAAAAGTTCGAGG	780 bp

AS 155	R Q E E L R C P S E F D D T F A K K F E	
NZO-1	TGCTCTTCTGTGGCCGGGTGACTGTGGCTCACAGAAGGCCCCACCCGCACTGATTGACG	840 bp
NZO-k	TGCTCTTCTGTGGCCGGGTGACTGTGGCTCACAGAAGGCCCCACCCGCACTGATTGACG	840 bp
SJL-k	TGCTCTTCTGTGGCCGGGTGACTGTGGCTCACAGAAGGCCCCACCCGCACTGATTGACG	840 bp

AS 175	V L F C G R V T V A H K K A P P A L I D	
NZO-1	AGTGTATCGAGAAGTTCAACCATGTGAGCTGTGGTTCGAGAACGGACTGGGAAGCGCCCA	900 bp
NZO-k	AGTGTATCGAGAAGTTCAACCATGTGAGCTGTGGTTCGAGAACGGACTGGGAAGCGCCCA	900 bp
SJL-k	AGTGTATCGAGAAGTTCAACCATGTGAGCTGTGGTTCGAGAACGGACTGGGAAGCGCCCA	900 bp

AS 195	E C I E K F N H V S C G R R T D W E A P	
	3f	
NZO-1	CCGGGCAGCCATCAGCGCCTGGCCCCAGGCCATGCGCAAATCCTTCTCACAGCCTGGAC	960 bp
NZO-k	CCGGGCAGCCATCAGCGCCTGGCCCCAGGCCATGCGCAAATCCTTCTCACAGCCTGGAC	960 bp
SJL-k	CCGGGCAGCCATCAGCGCCTGGCCCCAGGCCATGCGCAAATCCTTCTCACAGCCTGGAC	960 bp

AS 215	T G Q P S A P G P R P M R K S F S Q P G	
NZO-1	TGCGCTCGCTGGCCTTCAGGAAGGAGTTCAGGACGCTAGCCTCCGAGTAGCACCTTTA	1020 bp
NZO-k	TGCGCTCGCTGGCCTTCAGGAAGGAGTTCAGGACGCTAGCCTCCGAGTAGCACCTTTA	1020 bp
SJL-k	TGCGCTCGCTGGCCTTCAGGAAGGAGTTCAGGACGCTAGCCTCCGAGTAGCACCTTTA	1020 bp

AS 235	L R S L A F R K E F Q D A S L R S S T F	
	2r	
NZO-1	GCTCCTTTGACAATGACATAGAGAACCACCTCATCGGTGGGCACAATGTGGTTCAGCCCA	1080 bp
NZO-k	GCTCCTTTGACAATGACATAGAGAACCACCTCATCGGTGGGCACAATGTGGTTCAGCCCA	1080 bp
SJL-k	GCTCCTTTGACAATGACATAGAGAACCACCTCATCGGTGGGCACAATGTGGTTCAGCCCA	1080 bp

AS 255	S S F D N D I E N H L I G G H N V V Q P	
NZO-1	CAGACATGGAGGAGAACCGAACTATGCTGTTACGATTGGCCAATCTGAAGTTTACCTCA	1140 bp
NZO-k	CAGACATGGAGGAGAACCGAACTATGCTGTTACGATTGGCCAATCTGAAGTTTACCTCA	1140 bp
SJL-k	CAGACATGGAGGAGAACCGAACTATGCTGTTACGATTGGCCAATCTGAAGTTTACCTCA	1140 bp

AS 275	T D M E E N R T M L F T I G Q S E V Y L	
NZO-1	TCAGTCCTGACACCAAAAAGATTGCACTGGAGAAAAATTTTAAGGAGATATCCTTTTGCT	1200 bp
NZO-k	TCAGTCCTGACACCAAAAAGATTGCACTGGAGAAAAATTTTAAGGAGATATCCTTTTGCT	1200 bp
SJL-k	TCAGTCCTGACACCAAAAAGATTGCACTGGAGAAAAATTTTAAGGAGATATCCTTTTGCT	1200 bp

AS 295	I S P D T K K I A L E K N F K E I S F C	
	4f	
NZO-1	CTCAGGGCATCAGACATGTGGACCACTTTGGATTTCATCTGCCGAGAGTGCTCGGGTGGCG	1260 bp
NZO-k	CTCAGGGCATCAGACATGTGGACCACTTTGGATTTCATCTGCCGAGAGTGCTCGGGTGGCG	1260 bp
SJL-k	CTCAGGGCATCAGACATGTGGACCACTTTGGATTTCATCTGCCGAGAGTGCTCGGGTGGCG	1260 bp

AS 315	S Q G I R H V D H F G F I C R E C S G G	

NZO-1	GCAGTGGCGGCTTTCATTTTGTCTGTTACGTGTTCCAGTGCACAAATGAAGCTCTGGTTG	1320 bp
NZO-k	GCAGTGGCGGCTTTCATTTTGTCTGTTACGTGTTCCAGTGCACAAATGAAGCTCTGGTTG	1320 bp
SJL-k	GCAGTGGCGGCTTTCATTTTGTCTGTTACGTGTTCCAGTGCACAAATGAAGCTCTGGTTG	1320 bp

AS 335	G S G G F H F V C Y V F Q C T N E A L V	
NZO-1	ACGAGATCATGATGACTCTGAAGCAGGCTTTCACGGTAGCTGCGGTGCAGCAGACGGCTA	1380 bp
NZO-k	ACGAGATCATGATGACTCTGAAGCAGGCTTTCACGGTAGCTGCGGTGCAGCAGACGGCTA	1380 bp
SJL-k	ACGAGATCATGATGACTCTGAAGCAGGCTTTCACGGTAGCTGCGGTGCAGCAGACGGCTA	1380 bp

AS 355	D E I M M T L K Q A F T V A A V Q Q T A	
	3r	
NZO-1	AGGACCAGCCCAGCTCTGTGAGGGGTGCCCTTGCAAGGCCTGCACAAGCTCTGCGAAA	1440 bp
NZO-k	AGGACCAGCCCAGCTCTGTGAGGGGTGCCCTTGCAAGGCCTGCACAAGCTCTGCGAAA	1440 bp
SJL-k	AGGACCAGCCCAGCTCTGTGAGGGGTGCCCTTGCAAGGCCTGCACAAGCTCTGCGAAA	1440 bp

AS 375	K A P A Q L C E G C P L Q G L H K L C E	
NZO-1	GGATAGAGGGAATGAATTCATCTAAAACCAAATTAGAAGCTCCAGAAGCACTTGACCACAC	1500 bp
NZO-k	GGATAGAGGGAATGAATTCATCTAAAACCAAATTAGAAGCTCCAGAAGCACTTGACCACAC	1500 bp
SJL-k	GGATAGAGGGAATGAATTCATCTAAAACCAAATTAGAAGCTCCAGAAGCACTTGACCACAC	1500 bp

AS 395	R I E G M N S S K T K L E L Q K H L T T	
	5f	
NZO-1	TGACCAATCAGGAGCAGGCCACCATATTCGAGGAGGTTTCAGAAATTGAGACCAAGAAACG	1560 bp
NZO-k	TGACCAATCAGGAGCAGGCCACCATATTCGAGGAGGTTTCAGAAATTGAGACCAAGAAACG	1560 bp
SJL-k	TGACCAATCAGGAGCAGGCCACCATATTCGAGGAGGTTTCAGAAATTGAGACCAAGAAACG	1560 bp

AS 415	L T N Q E Q A T I F E E V Q K L R P R N	
NZO-1	AGCAGCGAGAGAATGAATTAATTATTTCTTTTCTGAGGTGCTTATATGAAGAGAAGCAAA	1620 bp
NZO-k	AGCAGCGAGAGAATGAATTAATTATTTCTTTTCTGAGGTGCTTATATGAAGAGAAGCAAA	1620 bp
SJL-k	AGCAGCGAGAGAATGAATTAATTATTTCTTTTCTGAGGTGCTTATATGAAGAGAAGCAAA	1620 bp

AS 435	E Q R E N E L I I S F L R C L Y E E K Q	
NZO-1	AAGAGCACAGCCACACTGGGGAGCCAAAGCAGACACTACAGGTGGCAGCAGAGAATATTG	1680 bp
NZO-k	AAGAGCACAGCCACACTGGGGAGCCAAAGCAGACACTACAGGTGGCAGCAGAGAATATTG	1680 bp
SJL-k	AAGAGCACAGCCACACTGGGGAGCCAAAGCAGACACTACAGGTGGCAGCAGAGAATATTG	1680 bp

AS 455	K E H S H T G E P K Q T L Q V A A E N I	
NZO-1	GGAGTGACCTGCCACCCAGTGTAGCCGGTTCAGGTTAGATTGCTGAAGAACAGAGCAA	1740 bp
NZO-k	GGAGTGACCTGCCACCCAGTGTAGCCGGTTCAGGTTAGATTGCTGAAGAACAGAGCAA	1740 bp
SJL-k	GGAGTGACCTGCCACCCAGTGTAGCCGGTTCAGGTTAGATTGCTGAAGAACAGAGCAA	1740 bp

AS 475	G S D L P P S A S R F R L D S L K N R A	
	4r	
NZO-1	AGAGGTCCTTAACAGAGTCCCTAGAGAGCATTCTGTCCCAGGTAATAAAGCCAGAGGCC	1800 bp
NZO-k	AGAGGTCCTTAACAGAGTCCCTAGAGAGCATTCTGTCCCAGGTAATAAAGCCAGAGGCC	1800 bp
SJL-k	AGAGGTCCTTAACAGAGTCCCTAGAGAGCATTCTGTCCCAGGTAATAAAGCCAGAGGCC	1800 bp

AS 495	K R S L T E S L E S I L S R G N K A R G	
NZO-1	TGCAGGACCATTCGCCAGTGTGGATCTGGACAGCTCCACTTCTAGTACTCTAAGTAACA	1860 bp
NZO-k	TGCAGGACCATTCGCCAGTGTGGATCTGGACAGCTCCACTTCTAGTACTCTAAGTAACA	1860 bp
SJL-k	TGCAGGACCATTCGCCAGTGTGGATCTGGACAGCTCCACTTCTAGTACTCTAAGTAACA	1860 bp

AS 515	L Q D H S A S V D L D S S T S S T L S N	
NZO-1	CCAGCAAAGAGCTGTCCATGGGTGACAAGGAGGCCCTCCCGTCTCTGAGACCTCCTTCA	1920 bp
NZO-k	CCAGCAAAGAGCTGTCCATGGGTGACAAGGAGGCCCTCCCGTCTCTGAGACCTCCTTCA	1920 bp
SJL-k	CCAGCAAAGAGCTGTCCATGGGTGACAAGGAGGCCCTCCCGTCTCTGAGACCTCCTTCA	1920 bp

AS 535	T S K E L S M G D K E A F P V S E T S F	

6f

NZO-1 AGCTCCTTGGCTCCTCAGATGACCTGTCCAGTACTCAGAGGGCCACATTGCAGAAGAGT 1980 bp
 NZO-k AGCTCCTTGGCTCCTCAGATGACCTGTCCAGTACTCAGAGGGCCACATTGCAGAAGAGT 1980 bp
 SJL-k AGCTCCTTGGCTCCTCAGATGACCTGTCCAGTACTCAGAGGGCCACATTGCAGAAGAGT 1980 bp

AS 555 K L L G S S D D L S S D S E G H I A E E

7f Thr590 5r

NZO-1 CTGCCCTGTTGTCACCCAGCAGGCGTTCAGAAGGAGAGCCAACACCCTGAGTCATTTCC 2040 bp
 NZO-k CTGCCCTGTTGTCACCCAGCAGGCGTTCAGAAGGAGAGCCAACACCCTGAGTCATTTCC 2040 bp
 SJL-k CTGCCCTGTTGTCACCCAGCAGGCGTTCAGAAGGAGAGCCAACACCCTGAGTCATTTCC 2040 bp

AS 575 S A L L S P Q Q A F R R R A N T L S H F

NZO-1 CAGTAGAGTGCCTGCGCCTCCAGAACCTGCCAGAGCTCTCCAGGGGTCTCTCAAAGGA 2100 bp
 NZO-k CAGTAGAGTGCCTGCGCCTCCAGAACCTGCCAGAGCTCTCCAGGGGTCTCTCAAAGGA 2100 bp
 SJL-k CAGTAGAGTGCCTGCGCCTCCAGAACCTGCCAGAGCTCTCCAGGGGTCTCTCAAAGGA 2100 bp

AS 595 P V E C P A P P E P A Q S S P G V S Q R

Lange Isoform forward

NZO-1 AACTCATGCGGTACCACTCCGTGAGCACAGAGACGCTCATGAACGCAATGTGGACCATC 2160 bp
 NZO-k AACTCATGCGGTACCACTCCGTGAGCACAGAGACGCTCATGAACGCAATGTGCA----- 2155 bp
 SJL-k AACTCATGCGGTACCACTCCGTGAGCACAGAGACGCTCATGAACGCA----- 2149 bp

AS 615 K L M R Y H S V S T E T P H E R N V D H

Lange Isoform Sonde

NZO-1 TTCTGGGGGTGAGTCTCAGGGCTGCCAGGGCAGCCTTCAGCTCCGCCTCCACCTCGTC 2240 bp
 NZO-k -----
 SJL-k -----

AS 635 L P G G E S Q G C P G Q P S A P P P P R

Lange Isoform revers

NZO-1 TTAACCCCTCCGCCTCCTCACAAACTTCTTTAAGTACCTAAAAACAATTCAGTGGAG 2300 bp
 NZO-k -----
 SJL-k -----

AS 655 L N P S A S S P N F F K Y L K H N S S G

6r

NZO-1 AGCAAAGTGGGAATGCTGTGCCAAAAAGAAGGGACTTTGAATCCAAGCAAACCACCTGG 2360 bp
 NZO-k -----GGACTTTGAATCCAAGCAAACCACCTGG 2185 bp
 SJL-k -----GGACTTTGAATCCAAGCAAACCACCTGG 2178 bp

AS 675 E Q S G N A V P K R R D F E S K A N H L

NZO-1 GTGACACAGATGGGACCCCGTGAAGACCCGGCGGCACTCGTGGAGACAGCAGATATTCC 2420 bp
 NZO-k GTGACACAGATGGGACCCCGTGAAGACCCGGCGGCACTCGTGGAGACAGCAGATATTCC 2245 bp
 SJL-k GTGACACAGATGGGACCCCGTGAAGACCCGGCGGCACTCGTGGAGACAGCAGATATTCC 2238 bp

AS 695 G D T D G T P V K T R R H S W R Q Q I F

Alle Isoformen forward Alle Isoformen Sonde

NZO-1 TTCGAGTGGCCACTCCACAGAAGGCTTGTGACTCCCCGAGCAGATATGAAGATTATTCCG 2480 bp
 NZO-k TTCGAGTGGCCACTCCACAGAAGGCTTGTGACTCCCCGAGCAGATATGAAGATTATTCCG 2305 bp
 SJL-k TTCGAGTGGCCACTCCACAGAAGGCTTGTGACTCCCCGAGCAGATATGAAGATTATTCCG 2298 bp

AS 715 L R V A T P Q K A C D S P S R Y E D Y S

8f Alle Isoformen revers

NZO-1 AGCTGGGAGAGCTCCCTCCACGCTCCCCTTTAGAACCAGGTGTGTGAGGACGGCCATTTG 2540 bp
 NZO-k AGCTGGGAGAGCTCCCTCCACGCTCCCCTTTAGAACCAGGTGTGTGAGGACGGCCATTTG 2365 bp
 SJL-k AGCTGGGAGAGCTCCCTCCACGCTCCCCTTTAGAACCAGGTGTGTGAGGACGGCCATTTG 2358 bp

AS 735 E L G E L P P R S P L E P V C E D G P F

NZO-1	GCCCAGTACAGGAAGAAAAGAGGAAGACGTCACGCGAGCTTCGAGAGCTGTGGAAAAAGG	2600 bp
NZO-k	GCCCAGTACAGGAAGAAAAGAGGAAGACGTCACGCGAGCTTCGAGAGCTGTGGAAAAAGG	2425 bp
SJL-k	GCCCAGTACAGGAAGAAAAGAGGAAGACGTCACGCGAGCTTCGAGAGCTGTGGAAAAAGG	2418 bp
AS 755	G P V Q E E K R K T S R E L R E L W K K	
NZO-1	CCATCTTGCAGCAGATCCTGCTGCTCAGGATGGAGAAGGAGAATCAGAAGCTACAAGCCT	2660 bp
NZO-k	CCATCTTGCAGCAGATCCTGCTGCTCAGGATGGAGAAGGAGAATCAGAAGCTACAAGCCT	2485 bp
SJL-k	CCATCTTGCAGCAGATCCTGCTGCTCAGGATGGAGAAGGAGAATCAGAAGCTACAAGCCT	2478 bp
AS 775	A I L Q Q I L L L R M E K E N Q K L Q A	
	7r	
NZO-1	CTGAAAACGATTTGCTGAACAAACGCCTCAAGCTTGACTATGAAGAAATCACTCCGTGTC	2720 bp
NZO-k	CTGAAAACGATTTGCTGAACAAACGCCTCAAGCTTGACTATGAAGAAATCACTCCGTGTC	2545 bp
SJL-k	CTGAAAACGATTTGCTGAACAAACGCCTCAAGCTTGACTATGAAGAAATCACTCCGTGTC	2538 bp
AS 795	S E N D L L N K R L K L D Y E E I T P C	
NZO-1	TTAAGAAGTCACTACAGTGTGGGAAAAGATGCTTAGCACTCCAGGAAGATCCAAAATTA	2780 bp
NZO-k	TTAAGAAGTCACTACAGTGTGGGAAAAGATGCTTAGCACTCCAGGAAGATCCAAAATTA	2605 bp
SJL-k	TTAAGAAGTCACTACAGTGTGGGAAAAGATGCTTAGCACTCCAGGAAGATCCAAAATTA	2598 bp
AS 815	L K E V T T V W E K M L S T P G R S K I	
	TBC-Domäne	
NZO-1	AGTTTGACATGGAAAAGTGCACCTCAGCTGTTGGGCAAGGTGTGCCACGTCATCACCGAG	2840 bp
NZO-k	AGTTTGACATGGAAAAGTGCACCTCAGCTGTTGGGCAAGGTGTGCCACGTCATCACCGAG	2665 bp
SJL-k	AGTTTGACATGGAAAAGTGCACCTCAGCTGTTGGGCAAGGTGTGCCACGTCATCACCGAG	2658 bp
AS 835	K F D M E K V H S A V G Q G V P R H H R	
NZO-1	GTGAGATCTGAAAATTTCTAGCTGAGCAGTTCACCTTAAACACCCATTTCTAGTAAAC	2900 bp
NZO-k	GTGAGATCTGAAAATTTCTAGCTGAGCAGTTCACCTTAAACACCCATTTCTAGTAAAC	2725 bp
SJL-k	GTGAGATCTGAAAATTTCTAGCTGAGCAGTTCACCTTAAACACCCATTTCTAGTAAAC	2718 bp
AS 855	G E I W K F L A E Q F H L K H P F P S K	
	9f	
NZO-1	AGCAGCCAAAGGACGTGCCCTACAAAGAGCTCCTGAAGAAGCTGACCTCGCAGCAGCAGG	2960 bp
NZO-k	AGCAGCCAAAGGACGTGCCCTACAAAGAGCTCCTGAAGAAGCTGACCTCGCAGCAGCAGG	2785 bp
SJL-k	AGCAGCCAAAGGACGTGCCCTACAAAGAGCTCCTGAAGAAGCTGACCTCGCAGCAGCAGG	2778 bp
AS 875	Q Q P K D V P Y K E L L K K L T S Q Q H	
NZO-1	CCATTCTCATCGACCTCGGGCGAACCTTTCCAACACATCCATACTTCTCTGCCAGCTTG	3020 bp
NZO-k	CCATTCTCATCGACCTCGGGCGAACCTTTCCAACACATCCATACTTCTCTGCCAGCTTG	2845 bp
SJL-k	CCATTCTCATCGACCTCGGGCGAACCTTTCCAACACATCCATACTTCTCTGCCAGCTTG	2838 bp
AS 895	A I L I D L G R T F P T H P Y F S A Q L	
	8r	
NZO-1	GAGCAGGTCAGCTGTCACTTTACAACATTCTGAAGGCCTACTCGCTTCTGGACCAGGAGG	3080 bp
NZO-k	GAGCAGGTCAGCTGTCACTTTACAACATTCTGAAGGCCTACTCGCTTCTGGACCAGGAGG	2905 bp
SJL-k	GAGCAGGTCAGCTGTCACTTTACAACATTCTGAAGGCCT-----TCTGGACCAGGAGG	2898 bp
AS 915	G A G Q L S L Y N I L K A Y S L L D Q E	
	Stoppcodon SJL (949 AA)	
NZO-1	TTGGATACTGCCAAGGTCTCAGCTTTGTGGCAGGCATTTTGCTTCTTACATGAGTGAGG	3140 bp
NZO-k	TTGGATACTGCCAAGGTCTCAGCTTTGTGGCAGGCATTTTGCTTCTTACATGAGTGAGG	2965 bp
SJL-k	TTGGATACTGCCAAGGTCTCAGCTTTGTGGCAGGCATTTTGCTTCTTACATGAGTGAGG	2958 bp
AS 935	V G Y C Q G L S F V A G I L L L H M S E	
NZO-1	AAGAGGCGTTCAAGATGCTCAAGTTCCTGATGTTTGACATGGGGCTGCGGAAACAGTATC	3200 bp
NZO-k	AAGAGGCGTTCAAGATGCTCAAGTTCCTGATGTTTGACATGGGGCTGCGGAAACAGTATC	3025 bp
SJL-k	AAGAGGCGTTCAAGATGCTCAAGTTCCTGATGTTTGACATGGGGCTGCGGAAACAGTATC	3018 bp
AS 955	E E A F K M L K F L M F D M G L R K Q Y	

NZO-1	GGCCAGACATGATTATTTTGCAGATCCAGATGTACCAGCTGTCACGGCTCCTCCACGATT	3260 bp
NZO-k	GGCCAGACATGATTATTTTGCAGATCCAGATGTACCAGCTGTCACGGCTCCTCCACGATT	3085 bp
SJL-k	GGCCAGACATGATTATTTTGCAGATCCAGATGTACCAGCTGTCACGGCTCCTCCACGATT	3078 bp

AS 975	R P D M I I L Q I Q M Y Q L S R L L H D	
NZO-1	ACCACCGAGACCTCTACAACCACCTGGAAGAGCACGAGATCGGCCCCAGCCTCTACGCGG	3320 bp
NZO-k	ACCACCGAGACCTCTACAACCACCTGGAAGAGCACGAGATCGGCCCCAGCCTCTACGCGG	3145 bp
SJL-k	ACCACCGAGACCTCTACAACCACCTGGAAGAGCACGAGATCGGCCCCAGCCTCTACGCGG	3138 bp

AS 995	Y H R D L Y N H L E E H E I G P S L Y A	
NZO-1	CTCCCTGGTTTCTCACCGTGTTCGCCTCACAGTCCCACCTCGGCTTTGTAGCCAGAGTCT	3380 bp
NZO-k	CTCCCTGGTTTCTCACCGTGTTCGCCTCACAGTCCCACCTCGGCTTTGTAGCCAGAGTCT	3205 bp
SJL-k	CTCCCTGGTTTCTCACCGTGTTCGCCTCACAGTCCCACCTCGGCTTTGTAGCCAGAGTCT	3198 bp

AS1015	A P W F L T V F A S Q F P L G F V A R V	
	10f	
NZO-1	TTGATATGATCTTCCTTCAGGGATCAGAGGTCATATTTAAAGTAGCTTTAAGTCTTTTGG	3420 bp
NZO-k	TTGATATGATCTTCCTTCAGGGATCAGAGGTCATATTTAAAGTAGCTTTAAGTCTTTTGG	3265 bp
SJL-k	TTGATATGATCTTCCTTCAGGGATCAGAGGTCATATTTAAAGTAGCTTTAAGTCTTTTGG	3258 bp

AS1035	F D M I F L Q G S E V I F K V A L S L L	
NZO-1	GGAGCCATAAGCCCTTGATTCTACAGCATGAGAACCTGGAAACCATCGTGGACTTCATAA	3480 bp
NZO-k	GGAGCCATAAGCCCTTGATTCTACAGCATGAGAACCTGGAAACCATCGTGGACTTCATAA	3325 bp
SJL-k	GGAGCCATAAGCCCTTGATTCTACAGCATGAGAACCTGGAAACCATCGTGGACTTCATAA	3318 bp

AS1055	G S H K P L I L Q H E N L E T I V D F I	
	9r	
NZO-1	AGAACACACTCCCCAACCTGGGCTGGTGCAGATGGAGAAGACCATCAGTCAGGTGTTTG	3540 bp
NZO-k	AGAACACACTCCCCAACCTGGGCTGGTGCAGATGGAGAAGACCATCAGTCAGGTGTTTG	3385 bp
SJL-k	AGAACACACTCCCCAACCTGGGCTGGTGCAGATGGAGAAGACCATCAGTCAGGTGTTTG	3378 bp

AS1075	K N T L P N L G L V Q M E K T I S Q V F	
NZO-1	AGATGGACATCGCCAAGCAGCTCCAGGCCTATGAGGTCGAGTACCACGTGCTCCAGGAGG	3600 bp
NZO-k	AGATGGACATCGCCAAGCAGCTCCAGGCCTATGAGGTCGAGTACCACGTGCTCCAGGAGG	3445 bp
SJL-k	AGATGGACATCGCCAAGCAGCTCCAGGCCTATGAGGTCGAGTACCACGTGCTCCAGGAGG	3438 bp

AS1095	E M D I A K Q L Q A Y E V E Y H V L Q E	
NZO-1	AGCTTATTGAGTCCTCGCCTCTCAGTGACAACCAAAGAATGGAGAAATTGGAGAAAACCA	3660 bp
NZO-k	AGCTTATTGAGTCCTCGCCTCTCAGTGACAACCAAAGAATGGAGAAATTGGAGAAAACCA	3505 bp
SJL-k	AGCTTATTGAGTCCTCGCCTCTCAGTGACAACCAAAGAATGGAGAAATTGGAGAAAACCA	3498 bp

AS1115	E L I E S S P L S D N Q R M E K L E K T	
NZO-1	ACAGCAGCTTGCGCAAACAGAACCTTGACCTCCTGGAGCAGTTGCAGGTGGCAAATGCTA	3720 bp
NZO-k	ACAGCAGCTTGCGCAAACAGAACCTTGACCTCCTGGAGCAGTTGCAGGTGGCAAATGCTA	3565 bp
SJL-k	ACAGCAGCTTGCGCAAACAGAACCTTGACCTCCTGGAGCAGTTGCAGGTGGCAAATGCTA	3558 bp

AS1135	N S S L R K Q N L D L L E Q L Q V A N A	
	11f	
NZO-1	GGATCCAAAGCCTTGAAGCCACGGTAGAGAACTTCTTACCAGCGAGAGTAAGCTGAAGC	3780 bp
NZO-k	GGATCCAAAGCCTTGAAGCCACGGTAGAGAACTTCTTACCAGCGAGAGTAAGCTGAAGC	3625 bp
SJL-k	GGATCCAAAGCCTTGAAGCCACGGTAGAGAACTTCTTACCAGCGAGAGTAAGCTGAAGC	3618 bp

AS1155	R I Q S L E A T V E K L L T S E S K L K	
NZO-1	AGGCTGCGCTGACCCTGGAGGTGGAGCGCTCCGCCCTGCTGCAGATGGTGGAGGAGCTGC	3840 bp
NZO-k	AGGCTGCGCTGACCCTGGAGGTGGAGCGCTCCGCCCTGCTGCAGATGGTGGAGGAGCTGC	3685 bp
SJL-k	AGGCTGCGCTGACCCTGGAGGTGGAGCGCTCCGCCCTGCTGCAGATGGTGGAGGAGCTGC	3678 bp

AS1175	Q A A L T L E V E R S A L L Q M V E E L	

```

NZO-1      GGAGGCAAAGCGCCCGGCCAGCACTCCAGAGCCAGACTGCACCCAGCTGGAGCCCACAG  3900 bp
NZO-k      GGAGGCAAAGCGCCCGGCCAGCACTCCAGAGCCAGACTGCACCCAGCTGGAGCCCACAG  3745 bp
SJL-k      GGAGGCAAAGCGCCCGGCCAGCACTCCAGAGCCAGACTGCACCCAGCTGGAGCCCACAG  3738 bp
          *****
AS1195    R R Q S A R P S T P E P D C T Q L E P T
          Stoppcodon      10r
NZO-1      GCGATTGACCGCTGCCAGAAGAGACTGTGCACCATTAACACTGTCCAAGCCTTAATCAAG  3960 bp
NZO-k      GCGATTGACCGCTGCCAGAAGAGACTGTGCACCATTAACACTGTCCAAGCCTTAATCAAG  3805 bp
SJL-k      GCGATTGACCGCTGCCAGAAGAGACTGTGCACCATTAACACTGTCCAAGCCTTAATCAAG  3798 bp
          *****
AS1215    G D -
NZO-1      AGAGATGGAAGTCAGAGGCAGAGAAGAGAGAGCTTCTCAGGGAGGAAACTGGCTGACCAG  4020 bp
NZO-k      AGAGATGGAAGTCAGAGGCAGAGAAGAGAGAACTTCTCAGGGAGGAAACCGGCTGACCAG  3865 bp
SJL-k      AGAGATGGAAGTCAGAGGCAGAGAAGAGAGAACTTCTCAGGGAGGAAACTGGCTGACCAG  3858 bp
          *****
NZO-1      CCTGCAGATCCTTTTGAGCTCAGAACTTGGGATTGGAGGACAAAAGTCTCAGAGTTATTG  4080 bp
NZO-k      CCTGCAGATCCTTTTGAGCTCAGAACTTGGGATTGGAGGACAAAAGTCTCAGAGTTATTG  3925 bp
SJL-k      CCTGCAGATCCTTTTGAGCTCAGAACTTGGGATTGGAGGACAAAAGTCTCAGAGTTATTG  3918 bp
          *****
NZO-1      TTGTTTTTGGTTCTAATCCGTCCCCTTTCCAGTCCTGGTTGTTGTA  4126 bp
NZO-k      TTGTTTTTGGTTCTAATCCGTCCCCTTTCCAGTCCTGGTTGTTGTA  3971 bp
SJL-k      TTGTTTTTGGTTCTAATCCGTCCCCTTTCCAGTCCTGGTTGTTGTA  3964 bp
          *****

```

Tabelle A3: Annotierte SNPs im *Nob1.10*-FragmentSNPs data downloaded from Mouse Phenome Database (<http://www.jax.org/phenome>)

Pos_Chr 5 (Mbp), NCBI Build 37	NCBI Gen-Annotation	dbSNP 128 Annotation	SJL/J	C57BL/6J	NZB/BINJ	NZO/HILtJ	dbSNP ID
64.221.936	0610040J01Rik_intron1	I	G	T	G	G	rs3703900
64.289.838	0610040J01Rik_exon4	Cn Q225L	A	T	A	A	rs13459170
64.342.904	AA536743_intron1	Rel1 I	C	T	C	C	rs6281588
64.371.068			C	A	C	C	rs3715307
64.403.638			T	G	T	T	rs3711950
64.488.209	Pgm1_intron1	I	A	A	A	A	rs3090421
64.580.894	Tbc1d1_intron2	I	C	T	T	C	rs33138184
64.636.772	Tbc1d1_intron2	I	T	C	T	T	rs13478297
64.742.568	Tbc1d1_UTR	U	A	A	A	A	rs4225234
64.748.771			C	T	C	C	rs6152354
64.976.129			A	G	A	A	rs13478298
65.070.491			A	T	A	A	rs3718814
65.141.993			G	A	G	G	rs6265085
65.174.170			T	C	T	T	rs13478299
65.220.902	Klf3_UTR	U	T	T	C	T	rs33654627
65.434.464			T	C	T	T	rs13478300
65.581.998			G	A	G	A	rs13478301
65.985.125	Hip2_intron5	I	G	G	G	G	rs6158897
66.098.141			C	T	C	T	rs6339313
66.166.364	B3bp_intron1	I	G	C	G	G	rs33753049
66.287.414	Rhoh_UTR	U	G	A	G	G	rs13478305
66.436.553	BC013481_intron4	I	G	A	G	A	rs3717258
66.546.701			T	A	T	T	rs13478307
66.605.988			G	A	G	G	rs3656989
66.893.864	Apbb2_intron2	I	G	A	G	G	rs6267669
67.053.114			A	G	A	G	rs4225252
67.053.356			C	T	C	T	rs4225248
67.118.611			T	C	T	C	rs3719870
67.289.020		I	C	T	C	C	rs3711269
67.538.359			A	G	A	G	rs13478309
67.682.480	Tmem33_UTR	U	C	C	C	C	rs4225260
67.739.262	Slc30a9_exon15	Cs R450	T	C	T	T	rs13478310
67.746.690	Slc30a9_UTR	U	A	G	A	A	rs13472234
67.751.433			C	T	C	C	rs3684754
67.962.986			G	G	G	G	rs6170457
67.964.307			G	A	G	G	rs3659098
67.991.066			A	G	A	G	rs3662462
68.029.080		I	C	T	C	C	rs13478311
68.173.759	Atp8a1_intron6	I	T	T	T	T	rs3656462
68.479.206	AY616753_intron1	I	C	C	C	C	rs6227779
68.657.752			G	G	G	A	rs3691938
68.757.363			T	T	T	T	rs6367911
68.915.049			A	A	A	A	rs6383560
69.028.813			A	A	A	A	rs6411304
69.285.572			G	G	T	G	rs13478313
69.381.914			G	G	G	G	rs3088773
69.445.794			A	A	A	A	rs6320498
69.527.299	Kctd8_intron1	I	G	G	G	G	rs31502646
69.791.826			A	A	A	A	rs3090910

Tabelle A3: Annotierte SNPs im *Nob1.10*-Fragment (fortgesetzt)SNPs data downloaded from Mouse Phenome Database (<http://www.jax.org/phenome>)

Pos_Chr 5 (Mbp), NCBI Build 37	NCBI Gen-Annotation	dbSNP 128 Annotation	SJL/J	C57BL/6J	NZB/BINJ	NZO/HILJ	dbSNP ID
69.950.340	Guf1_intron4		G	G	A	G	rs13478315
70.161.982			G	G	A	G	rs13478317
70.285.784			T	T	G	G	rs6242879
70.337.197			A	A	G	G	rs3691920
70.427.585			A	A	G	G	rs6168670
70.428.167			T	T	C	C	rs3675400
70.535.508			G	G	A	A	rs3681370
70.706.851			C	C	C	C	rs6158490
70.759.816			G	G	A	A	rs3722869
70.805.830			C	C	T	T	rs3695107
71.133.300			A	C	A	A	rs13478320
71.261.822			A	A	A	A	rs3088650
71.288.983			T	T	T	T	rs6394819
71.402.113	Gabra2_intron6		T	T	T	T	rs3678516
71.405.050	Gabra2_intron5		C	C	C	C	rs6182670
71.563.636			C	C	C	C	rs6207667
71.664.263			G	G	G	G	rs6207521
71.898.391	4930503B16Rik_intron1	Cox7b2	T	T	T	T	rs6397126
72.024.636	Gabra4_intron7		G	G	G	G	rs6308779
72.024.736	Gabra4_intron7		A	A	A	A	rs6309329
72.264.046	Gabbr1_intron4		T	T	C	T	rs13478321
72.361.750	Gabbr1_intron4		T	T	T	T	rs3090696
72.569.708			C	C	C	C	rs29634610
72.693.499	Corin_intron2	Corin Atp10d	G	G	G	G	rs33334153
72.695.780	Corin_intron1	Atp10d Corin	C	C	C	C	rs29585183
72.695.782	Corin_intron1	Atp10d Corin	C	C	C	C	rs33295762
72.699.204		Atp10d Corin	G	G	G	G	rs29729006
72.711.078	Corin_intron16		T	C	C	C	rs29501536
72.733.958	Corin_intron11		A	A	A	A	rs31531926
72.740.459	Corin_intron10		T	T	T	T	rs31532723
72.767.561	Corin_intron5		G	T	T	T	rs29563222
72.771.632	Corin_intron5		C	C	C	C	rs31536491
72.819.678	Corin_intron4		A	G	G	G	rs31530883
72.819.776	Corin_intron4		G	A	A	A	rs31531954
72.819.980	Corin_intron4		C	T	T	T	rs29533762
72.820.152	Corin_intron4		C	A	A	A	rs31531955
72.820.193	Corin_intron4		T	A	A	A	rs29627778
72.836.689	Corin_intron3		A	G	G	G	rs33364329
72.838.447	Corin_intron3		C	A	A	A	rs29519782
72.838.484	Corin_intron3		A	G	G	G	rs31529812
72.838.782	Corin_intron3		A	C	C	C	rs31530684
72.839.572	Corin_intron3		C	T	T	T	rs31530685
72.840.346	Corin_intron3		T	G	G	G	rs31530688
72.841.716	Corin_intron3		G	T	T	T	rs29586243
72.843.155	Corin_intron3		T	C	C	C	rs31531447

Tabelle A3: Annotierte SNPs im *Nob1.10*-Fragment (fortgesetzt)SNPs data downloaded from Mouse Phenome Database (<http://www.jax.org/phenome>)

Pos_Chr 5 (Mbp), NCBI Build 37	NCBI Gen-Annotation	dbSNP 128 Annotation	SJL/J	C57BL/6J	NZB/BINJ	NZO/HILJ	dbSNP ID
72.843.238	Corin intron3		A	T	T	T	rs29548198
72.843.250	Corin intron3		T	A	A	A	rs29628535
72.844.726	Corin intron3		C	T	T	T	rs31533267
72.846.204	Corin intron2		A	G	G	G	rs31534035
72.847.975	Corin intron2		C	A	A	A	rs33269641
72.855.723	Corin intron2		A	T	T	T	rs33093228
72.856.016	Corin intron2		A	C	C	C	rs29683576
72.856.344	Corin intron2		C	T	T	T	rs33353343
72.856.653	Corin intron2		A	C	C	C	rs29766492
72.856.812	Corin intron2		G	A	A	A	rs29558966
72.856.915	Corin intron2		C	T	T	T	rs33508003
72.857.031	Corin intron2		G	T	T	T	rs29525756
72.857.061	Corin intron2		T	C	C	C	rs29526834
72.857.183	Corin intron2		T	G	G	G	rs33091100
72.859.425	Corin intron2		T	A	A	A	rs29561648
72.859.638	Corin intron2		T	C	C	C	rs33668702
72.859.890	Corin intron2		T	G	G	G	rs33754348
72.859.938	Corin intron2		A	G	G	G	rs33746918
72.860.214	Corin intron2		C	T	T	T	rs33502774
72.860.839	Corin intron2		T	C	C	C	rs29568334
72.861.958	Corin intron2		C	T	T	T	rs29510470
72.862.061	Corin intron2		G	A	A	A	rs33716366
72.862.350	Corin intron2		G	A	A	A	rs31533475
72.862.383	Corin intron2		T	C	C	C	rs31533476
72.863.438	Corin intron1		G	C	C	C	rs33354154
72.864.085	Corin intron1		T	C	C	C	rs31533483
72.866.613	Corin intron1		C	T	T	T	rs31534994
72.866.727	Corin intron1		C	T	T	T	rs29682858
72.867.059	Corin intron1		T	G	G	G	rs29544302
72.868.763	Corin intron1		G	A	A	A	rs33612655
72.868.790	Corin intron1		T	C	C	C	rs33034580
72.868.939	Corin intron1		T	C	C	C	rs33510964
72.869.079	Corin intron1		T	C	C	C	rs29526775
72.869.177	Corin intron1		T	A	A	A	rs31534998
72.869.687	Corin intron1		G	A	A	A	rs31535000
72.869.851	Corin intron1		T	C	C	C	rs29678208
72.869.977	Corin intron1		C	T	T	T	rs31535001
72.870.036	Corin intron1		T	C	C	C	rs33674376
72.870.846	Corin intron1		T	C	C	C	rs29631002
72.870.864	Corin intron1		C	T	T	T	rs31535887
72.871.723	Corin intron1		G	A	A	A	rs31535891
72.874.354	Corin intron1		C	T	T	T	rs31537276
72.880.073	Corin intron1		A	T	T	T	rs33187447
72.880.347	Corin intron1		C	T	T	T	rs33556387
72.881.687	Corin intron1		A	G	G	G	rs29678644
72.881.695	Corin intron1		T	C	C	C	rs33300493
72.881.896	Corin intron1		A	C	C	C	rs33669525
72.882.461	Corin intron1		A	G	G	G	rs33642467
72.882.599	Corin intron1		T	C	C	C	rs29680354

Tabelle A3: Annotierte SNPs im *Nob1.10*-Fragment (fortgesetzt)SNPs data downloaded from Mouse Phenome Database (<http://www.jax.org/phenome>)

Pos_Chr 5 (Mbp), NCBI Build 37	NCBI Gen-Annotation	dbSNP 128 Annotation	SJL/J	C57BL/6J	NZB/BINJ	NZO/HILJ	dbSNP ID
72.885.539	Corin intron1	I	C	T	T	T	rs31539608
72.886.877	Corin intron1	I	T	C	C	C	rs29581748
72.887.074	Corin intron1	I	C	A	A	A	rs33079144
72.887.173	Corin intron1	I	C	T	T	T	rs31539610
72.887.199	Corin intron1	I	A	G	G	G	rs33443091
72.887.332	Corin intron1	I	G	A	A	A	rs33383576
72.887.392	Corin intron1	I	G	A	A	A	rs29546745
72.887.880	Corin intron1	I	C	G	G	G	rs33651837
72.887.891	Corin intron1	I	T	C	C	C	rs29585729
72.887.910	Corin intron1	I	C	T	T	T	rs33497761
72.893.073	Corin intron1	I	A	C	C	C	rs29558760
72.893.245	Corin intron1	I	A	G	G	G	rs29821164
72.893.418	Corin intron1	I	T	C	C	C	rs33479331
72.893.650	Corin intron1	I	G	A	A	A	rs33051943
72.893.673	Corin intron1	I	G	C	C	C	rs33065405
72.893.741	Corin intron1	I	G	T	T	T	rs33641059
72.894.077	Corin intron1	I	C	T	T	T	rs29672975
72.894.259	Corin intron1	I	G	A	A	A	rs29513378
72.895.053	Corin intron1	I	A	G	G	G	rs29672239
72.995.337	Cnga1 UTR	U	T	G	G	G	rs31537882
73.123.583	Txk intron3	I	G	C	C	C	rs3710735
73.152.037	Tec intron14	I	G	A	A	A	rs6259856
73.188.279	Tec intron3	I	A	G	G	G	rs6340166
73.345.508	Slain2 intron1	I	C	T	T	T	rs3669361
73.519.551	Fryl intron8	I	C	T	C	C	rs6409508
73.587.235	Fryl intron2	I	G	G	G	G	rs3090429
73.700.837	Ociad1 intron7	I	T	G	T	T	rs4225267
73.733.816			C	T	T	C	rs3707918
73.733.955			A	G	G	A	rs3708666
73.915.675	Dcun1d4 intron5	I	A	G	G	A	rs6366606
74.027.161	Sgcb intron5	I	T	T	T	T	rs3670420
74.033.683	Sgcb intron2	I	G	G	G	G	rs4138743
74.052.186	Spata18 intron4	I	T	C	C	T	rs13478325
74.061.192	Spata18 intron7	I	A	G	G	A	rs3689647
74.219.749			A	A	G	A	rs6163111
74.266.175			A	A	G	A	rs3672427
74.594.595	Rasl11b exon4	Cs T244	A	G	G	G	rs13478326
74.595.178	Rasl11b UTR	U	T	T	C	T	rs29566744
74.791.288			A	A	G	A	rs6161105
74.815.531			C	C	T	C	rs6354067
74.855.253	Scfd2 intron4	I	A	A	G	A	rs3672514
74.876.268	Scfd2 intron3	I	G	G	T	G	rs3700540

Tabelle A 4: *Primer zur Sequenzierung der Kandidatengene*

Symbol	Primersequenz	Nummer	Template	Gewebe	PCR-Produkt-Länge (bp)
<i>Centd1</i>	CAGGTTTGAGCACATGAACAG	S1	genomische DNA		608
	CTTCTGGACAGAGCAGGTCA	S2			
	GCGAAGTAAATGCGGACATC	S3	cDNA	Gehirn	705
	GCGGGAAGCTTTCTAATACG	S4			
	TTACCAAGAGGGCTGTGGAG	S5	cDNA	Gehirn	652
	CGGGGTATCCAAATGTCTTC	S6			
	AGAGGAAGCAGCCACTACAAG	S7	cDNA	Gehirn	658
	CAACTGTGATGCAAGTGATGG	S8			
	ACGGCGATATCCACAGTCC	S9	cDNA	Gehirn	658
	TGCTCCAAATACTGGCATCC	S10			
	ACTGGGCATCCATCAATCTC	S11	cDNA	Gehirn	697
	GTGGTGCACCTGTCGTTTTTC	S12			
	CCAATCCTCCTTCTCTG	S13	cDNA	Gehirn	683
	TGCGTTACCATCTGTACCTG	S14			
	TGCAGGAGCTAACAATCAGC	S15	cDNA	Gehirn	625
	CAGGATGAAAAGACCATTGC	S16			
	CAGGGTTCAGAAATGCTCAG	S17	cDNA	Gehirn	689
	TCTTGTCGTGTTTGCTGCTC	S18			
	GCCTGGTTCTGCGTATCTTG	S19	cDNA	Gehirn	651
	GCACGATTTCCGAGTTTCTC	S20			
	TGGAGGTTTACCTCTGATTCC	S21	cDNA	Gehirn	514
	GCTTGATTTCTGTCCTGCAC	S22			
<i>3110047P20Rik</i>	CCGGAACAGACCCAAGAATC	S23	cDNA	Gehirn, Hoden	667
	GGATAAGGCACCCGAGTTTTC	S24			
	ACGAAGCTAGGAAGCTCTGG	S25	cDNA	Gehirn, Hoden	705
	TTGTGTGCATCTCTCGAAGG	S26			
	CCCCTGAGAGTACCTTACCTG	S27	cDNA	Gehirn, Hoden	674
	GAACTCACAAACAGGCAGCAG	S28			
	CAACTACTCGCAGGAAAAGG	S29	cDNA	Gehirn, Hoden	708
	TGGCCACAGAAAGCATATACC	S30			
	GCTAGAGGCCAGCAAAGATG	S31	cDNA	Gehirn, Hoden	670
	AACGCCACTGGTTGACAAAAG	S32			
	AAACGGGGACTGTATCATCG	S33	cDNA	Gehirn, Hoden	668
	GACTGACTGCCAGCACTTTG	S34			
	GCAACATCTTGACCACTTTGC	S35	cDNA	Gehirn, Hoden	664
	TTCAACGCAGCATCTACACG	S36			
	AGTGATGAGACTGGCTGACG	S37	cDNA	Gehirn, Hoden	674
	CTCTCTTCTGGGGGAGATGG	S38			
	GGGAGTTCGAGGGAGGATAG	N1	cDNA	Gehirn, Hoden	603
	AGGAAGGGCGGTGAGATTAC	N2			
	AGAGGTGTAGGAGGCGACAA	N3	cDNA	Gehirn, Hoden	624
	GACAGCAGCATCCAAAATCA	N4			
GGGTGGAATTCAGGTCAT	N5	cDNA	Gehirn, Hoden	601	
CCATCTCTGGGATTTTCACG	N6				
ACTCTGTGCCAGCAGCCTAT	N7	cDNA	Gehirn, Hoden	635	
GGAGTGCTGCAGGATTTTCAT	N8				
CGATTGCCTTCTACTTGG	N9	genomische DNA		592	
TTCTGAGGTTGGTCCAGGAT	N10				
TATAAAAATCCCCGATTGC	N11	genomische DNA		561	
CAGGTTGCACCGAGAAGAG	N12				

Tabelle A 4: Primer zur Sequenzierung der Kandidatengene (fortgesetzt)

Symbol	Primersequenz	Nummer	Template	Gewebe	PCR-Produkt-Länge (bp)
0610040J01Rik	CGGGTCACTAAACATCATGG	S39	genomische DNA		551
	GGTTTGGTGGCTGATTATGG	S40			
	AGACCAGAGTCCAGTCACCTG	S41	genomische DNA		701
	GCTCTGCAGTCTCCATGTCC	S42			
CCTGGGTAGCCACCATAGAC	S43	genomische DNA		739	
GGGATGCCCTATACAGCAAG	S44				
Aa536743	ATGGACACCCGGAATACATC	S45	cDNA	Gehirn, Hoden	799
	GCCCTTTTGGGTTTGATCC	S46			
	CGAGCTCCTGCATTCAATC	N13	cDNA	Gehirn, Hoden	655
TCCCACTGTGTGCAGATGAT	N14				
Tlr1	AAGAAGCTCAGGCGAGCAGAG	S47	cDNA	Gehirn, Leber	688
	AGTGCTAACGTGCCGAAGAG	S48			
	TACAGTTCTGGGGTTGAGC	S49	cDNA	Gehirn, Leber	643
	AAGTCCACATGCAGAAATGG	S50			
	AACACACATGGTCCACATGC	S51	cDNA	Gehirn, Leber	642
	CCCTCCACCACTTCTCTTGC	S52			
	CTCAGTTTCCCATCCCTCTG	S53	cDNA	Gehirn, Leber	696
	GCCAGCAAGATGAGGATTAAG	S54			
CAAGTCCATCTTTGTGCTGTC	S55	genomische DNA		342	
TCCCCAGAGCAGCAACATC	S56				
Tlr6	GTTTCCTGTGGCTTCAGACC	S57	genomische DNA		670
	GGAAAGTCAGCTTCGTCAGG	S58			
	CTGGATGTCTCACACAATCG	S59	genomische DNA		685
	TGTTTCATCTCAGCAAACACC	S60			
	CTGAGAGAATCGACAGGGAAG	S61	genomische DNA		669
	CAGAGGGATGGGAAACTGAG	S62			
	GCATCCCTAAAGATGTCACC	S63	genomische DNA		671
	GTTCTCCACAATGCTCTTGC	S64			
CCTCCAGTTCCATGCTTTTG	S65	genomische DNA		706	
ACCAACTTCCTCCAATCAGG	S66				
9130005N14Rik	GCCTTCCCATAACCAGATCC	S67b	genomische DNA		424
	TGATCTCAGGCTGCTCTTCC	S68b			
	ACATGGAAGAGCAGCCTGAG	S69	cDNA	Gehirn, Hoden	683
	CTGCTTCTCCTTCTCCTTGG	S70			
	CGGAGGTCTGGATGCTTTAG	S71	cDNA	Gehirn, Hoden	694
	TGCAGTGACTTCAGCCAGAC	S72			
AAAGCGTGGTGTGATAGATG	S73	cDNA	Gehirn, Hoden	600	
GCTTGTAGTGTCCCAAATGG	S74				
Wdr19	TGGAGCCTTTGAAATGAAGC	S75	cDNA	Gehirn, Hoden	645
	AGCATTTTCTTGCCAACCAC	S76			
	AGTAACCAGGAAGGCGACAC	S77	cDNA	Gehirn, Hoden	700
	AGAGCCCTACTGCGACAAAG	S78			
	TGCATGTCTTCTGACCAAG	S79	cDNA	Gehirn, Hoden	673
	GGCCAGTTTTCCCAAGAAC	S80			
	TGATGCGACCTATGAGATTCC	S81	cDNA	Gehirn, Hoden	600
	CAGTTGGATGCCAGGTACAG	S82			
	ATGTTGGCACAGTGATGTCG	S83	cDNA	Gehirn, Hoden	679
	CGGATGACACTGTTCCATTG	S84			
	GCGAACTTCTCCCTCATGTC	S85	cDNA	Gehirn, Hoden	701
TGCAGACTGCTCTTCTCTGG	S86				
AGGCCAAAGATGAACTGCTG	S87	cDNA	Gehirn, Hoden	664	
AACATGTGTCGGCCTGTTG	S88				

Tabelle A 4: Primer zur Sequenzierung der Kandidatengene (fortgesetzt)

Symbol	Primersequenz	Nummer	Template	Gewebe	PCR-Produkt-Länge (bp)
Wdr19	GAGACAGAAGAGGCCACCAC	S89	cDNA	Gehirn, Hoden	513
	CAGAGCACAGAACACACAGG	S90			
Mll5	CATTTTCCCAGAGCGAGAAG	S95	genomische DNA		505
	AGGGACAGGCAGGAGAAAG	S96			
	CTCTTGGGTTCCCACTGAAG	S97	cDNA	Gehirn	739
	CTGTCAATCCCCATGCAGTC	S98			
	CGGTAATGATGTAACCAGGTG	S99	cDNA	Gehirn	663
	TGGCTCTCTACAGGAGGTCTG	S100			
	ATCAAAGCATGGATGGATCG	S101	cDNA	Gehirn	609
	TTCTGTGGATTCCGAGCTTC	S102			
	AGAGTGCCCTGTTCTCAAGC	S103	cDNA	Gehirn	650
	CAGGAGAAGATGGCGGTATG	S104			
GCTTTGGAAAGGATCAGCAC	S105	cDNA	Gehirn	529	
GACCTGGCAAAGAATTGAGC	S106				
AGTTACAGGCGGTTGTGAGC	S107	genomische DNA		447	
TTCCGAAAGGAATGGTGATG	S108				
Abhd1	CTTGCCCTAGGGATTCAGTG	S109	genomische DNA		631
	GTATAGGGGGAGCACCCCTTC	S110			
	TGCTGGACACTTGACTGTGG	S111	genomische DNA		660
	TAGGGTCCGGGTAGTGAGTG	S112			
	CCAGTGAAGTCCCTCCAGACC	S113	genomische DNA		712
	GGAACTGGGACAGAAGAGG	S114			
	GCCTGGGTTTGTTCATCTTG	S115	genomische DNA		660
	AGAGAACAGGGGTGTGGATG	S116			
GCTACACATCTGTGGCTTTTG	S117	genomische DNA		687	
GTGCTGGCACTTGCTGTAG	S118				
2310045A20Rik	CCCAGGACAGAACAGAGCAC	S119	cDNA	Gehirn, Leber	653
	GTGACCATGGGGTAGTCCAC	S120			
	GTGTCCTCTGGAAAGTGATGC	S121	cDNA	Gehirn, Leber	682
	CTGGACTGTTGCAGCATAACG	S122			
	TGGACCGGTGAAATACTATCG	S123	cDNA	Gehirn, Leber	701
	GCAGTGTGTGCTGATCAAGG	S124			
	TACCAGGGTGTGACAGCTAC	S125	cDNA	Gehirn, Leber	650
	CCACCTTGTGCAGCTTTATG	S126			
	AGGCAGAAGAAATGGGGAAC	S127	cDNA	Gehirn, Leber	660
	CCAAGAACTCCAGGATGTGG	S128			
CCATCAAACCAGTCCCAAG	S129	cDNA	Gehirn, Leber	729	
TTCCGGGTAACCCTTGAATC	S130				
Ppp1cb	CGTGACTCGTAGGTGAGAACG	S133	cDNA	Gehirn, Hoden	674
	TCAGGTACGTCAGTGGGTCTC	S134			
	TCATGGAGGACTGTCACCAG	S135	cDNA	Gehirn, Hoden	559
	GGCTGGATGGTTTTACAGTG	S136			
Alox5ap	AGGAAGAAGAGGGGGACAAG	S137	genomische DNA		455
	GTTTCTCACCAGCCCTTCAG	S138			
	AGGCAAATTGGTGACACTCC	S139	genomische DNA		546
	TCAGTGCAGGCACTAAAGG	S140			
	CATGGATCAAGAGGCTGTGG	S141	cDNA	Gehirn, Leber	601
GAGGGCAGCAAGATTGACAG	S142				

Tabelle A 4: Primer zur Sequenzierung der Kandidatengene (fortgesetzt)

Symbol	Primersequenz	Nummer	Template	Gewebe	PCR-Produkt-Länge (bp)
<i>Tmem156</i>	CCTGTCTGGAAGTGTGTTTCC	S143	cDNA	Hoden	627
	ATCTCCGCACTTTCCTGTGG	S144			
	TGTCATGAGGGGATCAATGG	S145	cDNA	Hoden	616
	TCATTGTCATGGTGGGTAGC	S146			
GGGAGTGGAATACATGACAG	S159	genomische DNA		455	
GTAAGGCCCTGGGTTTGACC	S160				
<i>Rpl9</i>	CTTTCGTAGCTGGCGATTCC	S147	genomische DNA		529
	CGTATGTCACACGCACAGG	S148			
	CCGGTAACCGATGTTAATCC	S149	genomische DNA		532
	CATACCAGCCAGCAATCTCC	S150			
	TGGGAAACTGAAGAAGAGG	S151	genomische DNA		494
	GTTTGAATTGAACCTCCTG	S152			
	GATGACAGGAGGTTCAATTCC	S153	genomische DNA		391
ACGAGCAGAGCACACACAAC	S154				
TGGGGTGTGTATGCCACTG	S155	genomische DNA		510	
TTGCTTGAGTATCGCTGACC	S156				
<i>G6pd2</i>	CATCTATTCTACCTGGCCTTGC	S157	cDNA	Gehirn, Hoden	560
	TATCCATTGGCAGTTCTCC	S158			
<i>Klh5</i>	AGCTCGAGCAGGACTTCCA	N17	cDNA	Gehirn, Hoden	600
	CAAGAGCTTGGCGATCTCA	N18			
	ACATCGAGTGCTTGTGTCC	N19	cDNA	Gehirn, Hoden	629
GGTCGAAAAAGGCAACTGAT	N20				
<i>Recc1</i>	AGCCCCGATAACGAATTACC	N21	cDNA	Gehirn, Hoden	625
	TTTCCTTTTGCTTGTACCA	N22			
	TCTCAGAAGGATCCTGTACC	N23	cDNA	Gehirn, Hoden	609
	TGATTTGCAAGGCTGCTTAG	N24			
	GGCAGTTGCATGAAGATGAA	N25	cDNA	Gehirn, Hoden	609
	CAATGGACTCCAGCACTCCT	N26			
	AGAAAAGAAAGCGCCACTGA	N27	cDNA	Gehirn, Hoden	629
	GTGCTTGCCTCCTTCTCAC	N28			
	CAAGAGTGACAAGGCAGCAG	N29	cDNA	Gehirn, Hoden	603
	CTGTAGCCCAATTCCTGACA	N30			
	CCGCCTCACTCAAGAACATA	N31	cDNA	Gehirn, Hoden	615
	GGGGGATTTTTAAACCCTCTT	N32			
	CATCATGGATGAGGTCGATG	N33	cDNA	Gehirn, Hoden	629
	TCCGGATCTGATTGTCCACT	N34			
	CCAAGGCTGATTCTCAGAGG	N35	cDNA	Gehirn, Hoden	635
	CCAGCTGCTAACTTCCATGA	N36			
CTGGGGAAGCACTCGTCTAC	N37	cDNA	Gehirn, Hoden	608	
ACTGGCCGAGAGGGTAAGTT	N38				
CCACCTGACCCCACTACTCAC	N39	cDNA	Gehirn, Hoden	634	
AAAAATTGAGCATTGTTCTCT	N40				
<i>Lias</i>	TGACTCAAGCGACGAGTTGT	N65	cDNA	Gehirn, Hoden	607
	TAATCCAGACCCCACTCTGC	N66			
	CATGGCTAAAGACAAAGATACCC	N67	cDNA	Gehirn, Hoden	611
	GCCCAGCATTATCGATGTTT	N68			
	CAAAAATCCTCGTGAATGC	N69	cDNA	Gehirn, Hoden	631
GCCATCAGACCCTCAGAAC	N70				
<i>Ugdh</i>	ACTGGTGACCATTTCGAAGG	S161	cDNA	Gehirn	650
	GAGAACGAGACTGCCTTTCC	S162			
<i>Klb</i>	CCACTTCACTACGAGGTTCCG	S163	cDNA	Gehirn	556
	AGCCAGAGTGGAGATGAAGC	S164			

Tabelle A 4: Primer zur Sequenzierung der Kandidatengene (fortgesetzt)

Symbol	Primersequenz	Nummer	Template	Gewebe	PCR-Produkt-Länge (bp)
<i>Tbc1d1</i>	CAGGAAACAGCTATGAC	T1f	pCR2.1-TOPO		643
	CAGCATCTTTGAGTGCAAGC	T1r			
	AGCCGAGGTACGAAGACTCA	T2f	pCR2.1-TOPO		671
	AGAGAACCACCTCATCGGTG	T2r			
	TCCTTCTCACAGCCTGGACT	T3f	pCR2.1-TOPO		510
	TCCCTCTATCCTTTTCGAGA	T3r			
	ATTCATCTGCCGAGAGTGCT	T4f	pCR2.1-TOPO		569
	GGCCTCTGGCTTTATTACCC	T4r			
	GAAACGAGCAGCGAGAGAAT	T5f	pCR2.1-TOPO		501
	CAGGGCACTCTACTGGGAAA	T5r			
	GTGACTCAGAGGGCCACATT	T6f	pCR2.1-TOPO		227
	CAGGTGGTTTGCCTTGGATT	T6r			
	CGTTCAGAAGGAGAGCCAAC	T7f	pCR2.1-TOPO		508
	AGCTTGAGGCGTTTGTTCAG	T7r			
CCCTTTAGAACCGGTGTGTG	T8f	pCR2.1-TOPO		571	
CTGGTCCAGAAGCGAGTAGG	T8r				
AAGGACGTGCCCTACAAAGA	T9f	pCR2.1-TOPO		612	
CAGGTTGGGGAGTGTGTTCT	T9r				
CCTTCAGGGATCAGAGGTCA	T10f	pCR2.1-TOPO		559	
TGGTGACAGTCTCTTCTGG	T10r				
AGCGAGAGTAAGCTGAAGCAG	T11f	pCR2.1-TOPO		472	
GTAAAACGACGGCCAGTG	T11r				
	CAGCCAGAGGTACAACTCC	ex18for	genomische DNA		709
	CTGGGCCAACTTCATAATCC	ex18rev			
	GCATCCATGGCTGATAGAGG	P1f	genomische DNA		622
	AGGCACCAGGCAGCTATCTC	P1r			
	CTGGAACCCAAAGGGTGAG	P2f	genomische DNA		488
	TTCCAGAAGGTCACCACGTC	P2r			
	GGTAGATGAGGTGGCTCTGG	P3f	genomische DNA		614
	ACCTCTCAAAGCACCATTCC	P3r			
CTAACCCACATGGCAGCTA	P4f	genomische DNA		554	
GTGCGAGGTTCTCAGCAGGT	P4r				
AGAGAAGCAGGATCCCTCAG	P5f	genomische DNA		707	
CTCAGCTGGCTGTGCTTTG	P5r				

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Hans-Georg Joost für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die anregenden Diskussion der Ergebnisse im Datenclub.

PD Dr. Hadi Al-Hasani danke ich für die gute Betreuung, die wertvollen Anregungen und die Diskussion sowie kritische Auseinandersetzung mit den Daten.

Ich danke Dr. Reinhart Kluge und dem Team des MRL für die fachgerechte Betreuung der Mäuse, die Hilfe bei der Präparation der Mausgewebe und die stetige Hilfsbereitschaft in allen Fragen.

Dem MPI (Berlin Dahlem) sowie den Firmen Signature (Potsdam) und Microdiscovery (Berlin) danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Array-Experimenten, besonders Thomas Przewieslik für die Hilfe beim Spotten der Arrays.

Stellvertretend für die technischen Mitarbeiter der Abteilung Pharmakologie danke ich Peggy Großmann und Susanne Neubert für die Isolation der Gewebe-RNA. Der gesamten Abteilung danke ich für die Unterstützung bei den Laborversuchen und die gute Arbeitsatmosphäre.

Dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das immer offene Ohr des Personalreferates, wenn's mal nicht so gut lief.

Ich danke meinen Doktoranden-Kollegen für die vielen anregenden Gespräche, Diskussionen und Hilfe bei Experimenten, besonders Katja Schmolz für die nicht nur anfängliche Begleitung und Marco Teichert für die Amplifikation vieler DNA-Sonden. Ganz besonders danke ich Ulrike Bernhardt, Alexandra Chadt, Tanja Dreja und Kathrin Warnke für unsere gemeinsame Zeit mit Höhen und Tiefen, das umfangreiche Korrekturlesen (dafür vielen Dank auch an Dr. Stephan Scherneck) und vor allem für das viele Lachen. Ihr seid sehr wertvolle Menschen, die diese Zeit viel schöner gemacht haben.

Dann sind da viele Freunde, denen ich danke. Claudi, unsere aufbauenden Telefonate und Besuche waren mir stets eine große Hilfe. Vielen Dank genauso an Kerstin, Thomas, Sabine und Nadine, die mich sehr unterstützt haben – ob durch gute Gespräche, Ablenkung oder die manchmal nötige Kinderbetreuung.

Ich bedanke mich ganz besonders bei meinen Eltern Isolde und Claus Wagner. Ohne eure Unterstützung und Interesse wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

Zuletzt und im ganz besonderem Maß danke ich meinem Mann Johannes. Du bist für mich der wichtigste Mensch auf der Welt und mein bester Freund. Danke für deine Begleitung, dein Verständnis und die Unterstützung, besonders in letzter Zeit. Ich hoffe ich kann es dir bald gleichtun.