

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. W. Dötsch

**Metformin zur Prävention Adipositas-assoziiierter
Komplikationen in der Schwangerschaft
- ein Tiermodell mit Fokus auf Mechanismen im
weißen Fettgewebe**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Katrín Schmitz
aus Bergisch Gladbach

promoviert am 15.02.2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. W. Dötsch
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. R. J. Wiesner
3. Gutachter: Professor Dr. med. M. Blüher

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. rer. nat. Sarah Appel
Dr. med. Eva-Maria Turnwald

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Haltung und Versorgung der Versuchstiere erfolgte durch die TierpflegerInnen des dezentralen Tierhaltungsnetzwerks der Uniklinik Köln in Zusammenarbeit mit Marion Handwerk, Dr. Ruth Janoschek, Dr. Eva-Maria Turnwald, Dr. Tobias Kretschmer und Dr. Sarah Appel. In Kooperation mit Prof. Dr. Angela Köninger (Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Uniklinik Regensburg) wurden im Vorfeld die Rahmenbedingungen für die Metformin-Intervention festgelegt und Prof. Dr. Dirk Gründemann (Institut für Pharmakologie, Uniklinik Köln) stand beratend für Möglichkeiten der Metformin-Quantifizierung zur Seite. Die Organisation des Versuchsablaufs sowie die Verpaarung der Mäuse wurde von Dr. Sarah Appel, Dr. Eva-Maria Turnwald, Dr. Tobias Kretschmer und Marion Handwerk übernommen. Dr. Sarah Appel, Dr. Eva-Maria Turnwald, Marion Handwerk, Maria Wohlfarth und Dr. Tobias Kretschmer erbrachten anteilig die Präparation, Probenentnahme, -aufbewahrung, Erhebung der phänotypischen Daten und Einbettung der histologischen Präparate.

Die Fettquantifizierung mittels μ CT wurde durch Dr. Andrea Mesaros und Martin Purrio der Phenotyping Core Facility des Max-Planck-Instituts für Biologie des Alterns durchgeführt und analysiert. Simone Kalis machte die LC-MS/MS-Messungen zur Quantifizierung von Metformin in Trinkwasser und Serum im Zentrum für Pharmakologie der Uniklinik Köln (AG Gründemann).

Für die technische Umsetzung der Verarbeitung der histologischen Bilder mittels „QuPath“ sorgte Peter Zentis der CECAD Imaging Facility, außerdem war er beratend für die statistische Analyse der Fettzellgröße tätig. Die LC-MS für den Proteomic Screen, die anschließende Verarbeitung mithilfe der Software „MaxQuant“, sowie die Einpflegung und Imputierung der Messwerte im Programm „Perseus“ wurden durch die MitarbeiterInnen der CECAD Proteomics Facility erbracht. Sämtliche Arbeiten, die den Lipidomic Screen und seine Auswertung betreffen, wurden durch Christina Lucas und Dr. Susanne Brodesser der CECAD Lipidomics Facility durchgeführt. Maria Wohlfarth fertigte Western Blots für diese Arbeit an (IL-6 und TNF- α im egWAT der SD- und HFD-Gruppe, ohne Abbildung).

Durch meine Person erfolgten alle übrigen Arbeiten. Diese umfassen das Schneiden, Färben und die Analyse der histologischen Schnitte, die RT-qPCR und alle diesbezüglichen Arbeiten, die Proteinisolation und -aufbereitung für die LC-MS, sämtliche statistischen Analysen, die Anfertigung aller zu sehenden Abbildungen, Tabellen und Diagramme sowie die Erhebung und Interpretation der Messergebnisse. Dabei wurde ich durch Dr. Sarah Appel, Dr. Eva-Maria Turnwald, Maria Wohlfarth und Dr. Tobias Kretschmer zur Durchführung der experimentellen Arbeiten angeleitet. Alle Arbeiten, die Proben der SD- und HFD-Gruppe betrafen, führte ich stets gemeinsam mit meinen Mitdoktorandinnen Kathrin Voßbrecher und Merlin Kammerer durch.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 25.07.2022

Unterschrift: K. Schmitz

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die in so vielfältiger und wesentlicher Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Jörg W. Dötsch für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Promotionszeit und viele hilfreiche und kritische Anregungen danken. Vielen Dank zudem an Prof. Dr. Rudolf J. Wiesner und Prof. Dr. Matthias Blüher für die Begutachtung.

Ganz besonders danken möchte ich Dr. Sarah Appel und Dr. Eva-Maria Turnwald für die sowohl fachlich als auch menschlich hervorragende Betreuung. Danke für Eure großartige Unterstützung, stets offene Ohren für Anliegen jeder Art und nicht zuletzt das mühevolle Durchsehen der Arbeit zu verschiedenen Zeitpunkten der Fertigstellung.

Mein Dank gilt Maria Wohlfarth für die geduldige und unverzichtbare Einführung in die Laborarbeit und Dr. Tobias Kretschmer für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und zahlreichen fachlichen Ratschläge. Auch möchte ich Marion Handwerk und dem gesamten Team des Forschungspavillons der Kinderklinik der Uniklinik Köln für die angenehme Zusammenarbeit und Unterstützung danken, durch die offene Atmosphäre habe ich mich immer sehr wohl und willkommen gefühlt.

Ich danke Dr. Ruth Janoschek, Prof. Dr. Dirk Gründemann und Prof. Dr. Angela Köninger, deren kompetente Beratung essenziell zur Konzeption des Forschungsdesigns im Vorfeld der Experimente beitrug.

Danken möchte ich außerdem Peter Zentis, Christina Lucas, Dr. Susanne Brodesser, Simone Kalis und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Phenotyping Core Facility des Max-Planck-Instituts für Biologie des Alterns, der CECAD Imaging Facility und der CECAD Proteomics Facility für ihre fachkundige Hilfe und diversen wertvollen Beiträge zu dieser Arbeit. Ein großer Dank gilt meinen Mitdoktorandinnen und insbesondere Kathrin und Merlin für die wunderbare und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Zudem danke ich der Studienstiftung des deutschen Volkes, die es mir durch ein Stipendium ermöglichte, mich voll und ganz auf die Promotion zu konzentrieren und diese gemeinsam mit meinem Studium abzuschließen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und bei Julian bedanken, Eure uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung während der Promotion und in allen Lebenslagen ist nicht wegzudenken und hat diese Arbeit erst möglich gemacht.

Für Julian und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1 ZUSAMMENFASSUNG	16
2 EINLEITUNG	18
2.1 Übergewicht und Adipositas	18
2.2 Fettgewebe	18
2.2.1 Struktur	18
2.2.2 Metabolische und endokrine Funktionen	19
2.2.3 Regulierung	20
2.2.4 Bindeglied zwischen Adipositas und ihren Folgeerkrankungen	20
2.2.5 Subkutanes und viszerales Fettgewebe	21
2.3 Fettsäuren im Blut	22
2.4 Inflammation	23
2.4.1 Potenzielle Entzündungsmarker	24
2.5 Oxidativer Stress	24
2.5.1 Potenzielle oxidative Stressmarker	26
2.6 Metformin als möglicher Therapieansatz	26
2.7 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	27
3 MATERIAL UND METHODEN	29
3.1 Medikamente, Chemikalien und Enzyme	29
3.2 Stammlösungen und Puffer	31
3.3 (Oligo-)Nukleotide	32
3.4 Geräte	33
3.5 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	34
3.6 Software und Datenbanken	35
3.7 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	36
3.7.1 Verpaarung	37
3.7.2 Metformin-Intervention	37
3.7.3 Präparation, Probenentnahme und -aufbewahrung	38
3.7.4 Erhebung der phänotypischen Daten	38
3.8 Quantifizierung von Metformin	38
3.9 Histologische Methoden	39

3.9.1	Einbetten und Schneiden	39
3.9.2	HE-Färbung	40
3.9.3	Auswertung der Fettzellgröße	40
3.10	Fettgewebsquantifizierung mittels μ CT (Mikro-Computertomographie)	42
3.11	Molekularbiologische Methoden	43
3.11.1	RNA-Isolation	43
3.11.2	Umschreibung in cDNA	44
3.11.3	Quantitative Echtzeit-PCR	45
3.12	Proteinanalytische Methoden (Proteomic Screen)	46
3.12.1	Proteinisolation	46
3.12.2	Proteinverdau	47
3.12.3	Beladung der StageTips mit Protein	47
3.12.4	LC-MS (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)	48
3.12.5	Auswertung	49
3.13	Lipidanalytische Methoden (Lipidomic Screen)	50
3.13.1	Lipidextraktion	50
3.13.2	Herstellung von Fettsäuremethylestern	51
3.13.3	GC-MS (Gas-Chromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)	51
3.13.4	Auswertung	52
3.14	Statistische Analyse	52
4	ERGEBNISSE	54
4.1	Metformin-Intervention	54
4.2	Phänotypische Veränderungen	55
4.2.1	Körpergewicht	55
4.2.2	Gewicht des epigonadalen Fettgewebes	56
4.2.3	Fettgewebsquantifizierung an nichttragenden Tieren	57
4.3	Fettgewebsmorphologie	59
4.3.1	Methodenetablierung zur Analyse der Fettzellgröße	59
4.3.2	Fettzellgröße des scWATs	61
4.3.3	Fettzellgröße des egWATs	62
4.4	mRNA-Expression von Entzündungsfaktoren und oxidativen Stressmarkern im WAT	63
4.4.1	Auswahl der Housekeeping-Gene	63
4.4.2	Entzündungsfaktoren und oxidative Stressmarker im scWAT	65
4.4.1	Entzündungsfaktoren und oxidative Stressmarker im egWAT	66

4.5	Proteom-Analyse des egWATs	69
4.5.1	Hauptkomponentenanalyse	69
4.5.2	Volcano Plots	70
4.5.3	Venn-Diagramm	72
4.5.4	String-Analysen	73
4.5.5	Übersichtstabellen der signifikant regulierten Proteine	81
4.6	Analyse des Blut-Fettsäureprofils	96
5	DISKUSSION	98
5.1	Bewertung der Adipositas-Induktion und Metformin-Intervention	98
5.2	Phänotypische Veränderungen durch Metformin	100
5.3	Einfluss auf die Fettgewebsmorphologie durch Metformin	101
5.4	Einfluss auf Inflammation und oxidativen Stress im WAT durch Metformin	102
5.5	Einfluss auf die globale Proteinexpression im egWAT	104
5.5.1	Veränderungen durch HFD	104
5.5.2	Metformin-vermittelte Veränderungen im egWAT adipöser Mäuse	107
5.5.3	Gemeinsame Metformin-Effekte in HFD+MF und SD+MF	113
5.5.4	Limitation	115
5.6	Einfluss auf das Blut-Fettsäureprofil durch HFD und Metformin	115
5.7	Zusammenfassende Diskussion, Limitation und Ausblick	117
6	LITERATURVERZEICHNIS	122
7	ANHANG	133
7.1	Abbildungsverzeichnis	133
7.2	Tabellenverzeichnis	134
7.3	Ergänzende Abbildungen	135
8	VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN	136

Abkürzungsverzeichnis

μCT	Mikro-Computertomographie
18S	18S ribosomale RNA
A	Adenosin
A2m	Alpha-2-macroglobulin-P
Acaca	Acetyl-CoA carboxylase 1
Acadsb	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
Acat2	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic
Acin1	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus
Acly	ATP-citrate synthase
Acot13	Acyl-coenzyme A thioesterase 13
Acox1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1
Acsf3	Acyl-CoA synthetase family member 3, mitochondrial
Acss2	Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic
Acss3	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial
Adam10	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
Adsl	Adenylosuccinate lyase
AG	Arbeitsgemeinschaft
AGC	automatische Verstärkungsregelung (Automatic Gain Control)
Agl	4-alpha-glucanotransferase
Aldh2	Aldehyddehydrogenase-2
Aldh4a1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-activated protein kinase
Anxa1	Annexin A1
Anxa2	Annexin A2
Anxa5	Annexin A5
Apoa4	Apolipoprotein A-IV
Arrb1	Beta-arrestin-1
Atad3a	ATPase family AAA domain-containing protein 3
Atp5o	ATP synthase subunit O, mitochondrial
Bclaf1	Bcl-2-associated transcription factor 1
BHT	Butylhydroxytoluol
BMI	Body Mass Index
Brk1	Protein BRICK1
C	Cytosin
C1ra	Complement C1r-A subcomponent

Cald1	Caldesmon 1
CAT	Catalase
cDNA	komplementäre DNA
CECAD	Cluster of Excellence - Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases
Ckap5	Cytoskeleton-associated protein 5
Cnpy4	Cnpy4
Cobl1	Cordon-bleu protein-like 1
Col6a5	Collagen alpha-5(VI) chain
Crk	Adapter molecule crk
CT-Wert	Schwellenwert-Zyklus (Threshold Cycle)
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10
CYB-A	Cytochrome b-245 alpha chain
CYB-B	Cytochrome b-245 beta chain
Dctn3	Dynactin subunit 3
Ddx21	Nucleolar RNA helicase 2
Ddx46	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46
Dld	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnaja2	DnaJ homolog subfamily A member 2
Dnajb6	DnaJ homolog subfamily B member 6
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
egWAT	epigonadales weißes Fettgewebe (epigonadal white adipose tissue)
Etfa	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial
EtOH	Ethanol
FAM	Fluorescein
FAMEs	Fettsäuremethylester (fatty acid methyl esters)
Fasn	Fatty acid synthase
Fbn2	Fibrillin-2
for	forward primer
FS	Fettsäure(n)
Fstl1	Follistatin-related protein 1
Fxr1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1
g	Erdbeschleunigung (entspricht 9,81 N/kg)
G	Guanin
Gak	Cyclin-G-associated kinase

GAPDH / Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Gbe1	1,4-alpha-glucan-branching enzyme
GC	Gas-Chromatographie
Gcdh	Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
GC-MS	Gas-Chromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
gDNA	genomische DNA
Gfm1	Elongation factor G, mitochondrial
Glul	Glutamine synthetase
Gna13	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13
Gpi	Glucose-6-phosphate isomerase
GPX1	Glutathion peroxidase 1
Gpx3	Glutathione peroxidase 3
Grn	Granulins
Gsr	Glutathione reductase, mitochondrial
Gsta3	Glutathione S-transferase A3
GUSB	β -Glucuronidase
Gys1	Glycogen [starch] synthase, muscle
h	Stunde(n)
HCD	kollisionsinduzierte Dissoziation (high-energy collisional dissociation)
HCl	Salzsäure
HDL	High-Density-Lipoprotein-Cholesterin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HED	Human equivalent dose
HFD	Hochfett-Diät (high fat diet)
HFD+MF	Hochfett-Diät mit Metformin-Intervention
Hk2	Hexokinase-2
Hnrnpc	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2
Hnrnpdl	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
ID	Identifikator
IL-1 α	Interleukin 1 α
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
Ipo4	Importin-4
IQR	Interquartilsabstand (interquartile range)
Itga6	Integrin alpha-6

Itgb4	Integrin beta-4
Itgb5	Integrin beta-5
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
Kpna4	Importin subunit alpha-3
Lamc1	Laminin subunit gamma-1
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LFQ	markierungsfreie Quantifizierung (label-free quantification)
Lgals3	Galectin-3-binding protein
Lrg1	Leucine-rich HEV glycoprotein
M	mol/l
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
Me1	NADP-dependent malic enzyme
MeOH	Methanol
Mgst1	Microsomal glutathione S-transferase 1
Mgst3	Microsomal glutathione S-transferase 3
Mid1ip1	Mid1-interacting protein 1
min	Minute(n)
Mlycd	Malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial
mM	mmol/l
Mpst	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase
mRNA	Boten-RNA
Myh10	Myosin-10
Naprt	Nicotinate phosphoribosyltransferase
NCF1	Neutrophil cytosolic factor 1
NCF2	Neutrophil cytosolic factor 2
Ndufb1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1
Ndufb2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 2, mitochondrial
Ndufv3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial
Nfia	Nuclear factor 1-A
NF-κB	Nuclear factor-κB
Nol3	Nucleolar protein 3
NOX4	NADPH oxidase 4
Nt5c3a	Cytosolic 5-nucleotidase 3A
Nucb1	Nucleobindin-1
OD	optische Dichte

Opa3	Optic atrophy 3 protein homolog
p	p-Wert (Signifikanzwert)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pcx	Pyruvate carboxylase
Pdha1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial
Pdk2	Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2
Pfkl	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type
Pkm	Pyruvate kinase PKM
Plin1	Perilipin-1
ppm	Teile pro eine Million Teile (parts per million)
Ppp1r1a	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1A
Ppp2ca	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform
Prdx6	Peroxiredoxin-6
Prkcdp	Protein kinase C delta-binding protein
PSM	Peptidspektrum-Übereinstimmungen (peptide spectrum matches)
Pygl	Glycogen phosphorylase, liver form
qPCR	quantitative PCR
Rab14	Ras-related protein Rab-14
Rab34	Ras-related protein Rab-34
rev	reverse primer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
Rpl12	60S ribosomal protein L12
Rpl8	60S ribosomal protein L8
Rplp1	60S acidic ribosomal protein P1
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real-time PCR)
Scd1	Acyl-CoA desaturase 1
scWAT	subkutanes weißes Fettgewebe (subcutaneous white adipose tissue)
SD	Standard-Diät (standard diet)
SD+MF	Standard-Diät mit Metformin-Intervention
SDB	Poly-Styren-Divinylbenzen-Copolymer
Selenbp1	Selenium-binding protein 1
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
Serpina1b	Alpha-1-antitrypsin 1-2
Serpina1c	Alpha-1-antitrypsin 1-3

Slc2a4	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4
SMAD2	SMAD Family Member 2
Smarca4	Transcription activator BRG1
Smarcc2	SWI/SNF complex subunit SMARCC2
Snx4	Sorting nexin-4
SOD1	Superoxide dismutase 1
Sod2	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial
Sod3	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]
Sptan1	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1
Sptbn1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1
Strap	Serine-threonine kinase receptor-associated protein
T	Thymin
Taco1	Translational activator of cytochrome c oxidase 1
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
taq	Taqman-Sonde (probe)
Tbl1x	F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1X
Tcof1	Treacle protein
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
TGF- β	Transforming Growth Factor β
Th	Thomson
Thrsp	Thyroid hormone-inducible hepatic protein
Tkt	Transketolase
Tln2	Talin-2
Tmed3	Transmembrane emp24 domain-containing protein 3
Tmsb4x	Thymosin beta-4
TNF- α	Tumor necrosis factor α
Tpm4	Tropomyosin alpha-4 chain
Txn2	Thioredoxin, mitochondrial
Txnrd1	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic
Txnrd2	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial
Ube2l3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3
Ube2z	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z
Uck1	Uridine-cytidine kinase 1
Ugp2	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
v/v	Volumen pro Volumen
Vamp3	Vesicle-associated membrane protein 3
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
Vim	Vimentin

Vps29	Vacuolar protein sorting-associated protein 29
WAT	weißes Fettgewebe (white adipose tissue)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
σ	Standardabweichung

1 Zusammenfassung

Durch die weltweit dramatisch steigende Prävalenz von Übergewicht und Adipositas nehmen auch Adipositas-bedingte Risiken und Komplikationen in der Schwangerschaft zu. Dabei steigert Adipositas zum einen das Risiko für unerwünschte Ereignisse während der Schwangerschaft und zum anderen können auch langfristige gesundheitliche Folgen für Mutter und Kind verursacht werden. Angesichts dieses ernstzunehmenden Public-Health-Problems gewinnen entsprechende Therapieoptionen mehr und mehr an Bedeutung. Inflammation und oxidativer Stress gelten als Schlüsselmechanismen, die vom weißen Fettgewebe (WAT) ausgehend auf den gesamten Körper übergreifen und auf diese Weise Adipositas-assoziierte Komplikationen und Folgeerkrankungen auslösen können. Deshalb stellt WAT einen vielversprechenden Angriffspunkt neuer Behandlungsstrategien für adipöse Schwangere dar. Das Antidiabetikum Metformin kann Inflammation und oxidativen Stress reduzieren, zusätzlich wird es bereits für andere Indikationen in der Schwangerschaft eingesetzt und es besteht eine langjährige klinische Erfahrung mit dem Medikament. In dieser Arbeit wurde anhand eines Mausmodells die Metformintherapie adipöser Schwangerer dargestellt, um zu erörtern, ob sie geeignet wäre, Schlüsselmechanismen im WAT zu unterbinden und somit möglicherweise den teilweise tiefgreifenden, Adipositas-assoziierten Komplikationen vorzubeugen.

Die Versuchstiere erhielten zunächst eine Adipositas-induzierende HFD, ab der Verpaarung wurde zudem Metformin über das Trinkwasser verabreicht, bis im dritten Trimenon schließlich eine subkutane WAT-Probe (scWAT), epigonadales WAT (egWAT) und Serum entnommen wurden. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Behandlung, wurde jedoch mit einer SD gefüttert. Zwei weitere Vergleichsgruppen erhielten nur die jeweilige Diät ohne Metformingabe. Bei der postmortalen Messung der Serumkonzentrationen fiel eine erhöhte Metforminkonzentration bei den adipösen Mäusen auf, die sich möglicherweise durch eine reduzierte renale Ausscheidung erklären lässt. Dennoch lagen die Konzentrationen verglichen mit humanen Serumleveln damit im mittleren bis hohen therapeutischen Bereich.

Unter der Metforminbehandlung verringerte sich die Gewichtszunahme der adipösen Mäuse in der Tragezeit. Begleitend dazu war auch eine reduzierte egWAT-Masse sowie eine signifikant verminderte Adipozyten-Hypertrophie im scWAT und ein Trend zu einer geringeren Adipozyten-Hypertrophie im egWAT zu beobachten. Im scWAT der unbehandelten adipösen Mäuse zeigten sich widererwartend keine Hinweise auf gesteigerte Inflammation oder oxidativen Stress in der mRNA-Expression von Entzündungsfaktoren oder oxidativen Stressmarkern, während im egWAT indessen ein klares Bild von erhöhten oxidativen Stressmarkern zu sehen war. Durch Metformin war eine isolierte Reduktion der Entzündungsfaktoren TNF- α und CXCL10 sowie eine massive Depletion der oxidativen

Stressmarker im egWAT der adipösen Mäuse zu verzeichnen. In ihrem scWAT zeigte sich eine reduzierte mRNA-Expression der anti-oxidativen Stressmarker SOD1 und GPX1.

Die Analyse des egWAT-Proteoms konnte diese Erkenntnisse durch weitere Metformin-Effekte ergänzen. Es wurden verschiedenste Veränderungen identifiziert, die über eine Hochregulation antioxidativer Proteine, eine TGF- β - und NF- κ B-Inhibierung sowie AMPK-Aktivierung unter Metformin Inflammation und oxidativen Stress reduzieren könnten. Darüber hinaus fanden sich Hinweise einer gesteigerten respiratorischen Kapazität, des WAT-Brownings und einer Gegenregulation der Adipositas-assoziierten WAT-Dysfunktion. Mit der Regulation von Lrg1, Alpha-1-Antitrypsin, Selenbp1 und ApoA4 im egWAT der Metformin-behandelten Mäuse wurden zudem potenzielle neue Adipokine entdeckt, durch die Metformin auch auf systemischer Ebene antiinflammatorisch und antioxidativ wirken kann. Außerdem wurde eine Perilipin-1-Runterregulation als Korrelat des schlankeren Phänotyps durch die Metforminbehandlung beobachtet. Insbesondere die Proteom-Analyse konnte eine Vielzahl neuer Erkenntnisse hervorbringen, die dazu beitragen werden, die bisher erst teilweise bekannte Metforminwirkung auf egWAT zu verstehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit müssen vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass der Ausgang der Schwangerschaften nicht über das letzte Trimenon hinaus beobachtet wurde und Menschen kein direktes Äquivalent zum hier analysierten egWAT besitzen, da sie viszerales Fettgewebe vor allem in anderen Lokalisationen ausbilden. Insbesondere die identifizierten Effekte der Proteom-Analyse bedürfen einer Bestätigung durch weitere Forschung, zumal zusätzliche Faktoren, wie etwa die Phosphorylierung oder Lokalisation der Proteine, aufgrund der verwendeten Methode nicht berücksichtigt wurden.

In der Zusammenschau aller Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass eine Metformintherapie potenziell geeignet ist, um Adipositas-Schlüsselmechanismen im WAT zu unterbinden. Somit wäre auch eine dadurch vermittelte Vorbeugung Adipositas-bedingter Komplikationen in der Schwangerschaft denkbar. Es konnten neben antiinflammatorischen und antioxidativen Effekten auch vielfältige weitere Wirkmechanismen identifiziert werden, die unter anderem die WAT-Hypertrophie reduzieren, die viszerale Fettmasse verringern, antidiabetisch wirken, der Adipositas-bedingten WAT-Dysfunktion entgegensteuern oder über neue potenzielle Adipokine vermittelt werden können. Als ergänzender positiver Aspekt kann die Metformin-vermittelte reduzierte Gewichtszunahme in der Schwangerschaft herausgestellt werden, durch die womöglich auch gewichtsbedingte Komplikationen in einer darauffolgenden Schwangerschaft vermindert werden können. Die bekräftigenden und neuen Erkenntnisse dieser Arbeit bieten eine erweiterte wissenschaftliche Grundlage für das Potenzial einer Metforminbehandlung adipöser Schwangerer und liefern vielfältige Anstöße für nachfolgende experimentelle und klinische Forschung.

2 Einleitung

2.1 Übergewicht und Adipositas

Die Prävalenz von Übergewicht (BMI 25 - 29,9 kg/m²) und Adipositas (BMI ≥ 30 kg/m²) steigt weltweit dramatisch an. Laut WHO sind 26 % der erwachsenen Weltbevölkerung übergewichtig und 13 % adipös¹, in Europa sind sogar 35,4 % von Übergewicht und 23,3 % von Adipositas betroffen (Daten von 2016)². Mit steigendem BMI steigt auch das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, muskuloskeletale Störungen, verschiedene Krebs-Leiden und viele weitere Erkrankungen¹. Diese Folgeerkrankungen sind meist mit stark erhöhter Morbidität und Mortalität assoziiert. Übergewicht und Adipositas stellen somit eine wachsende Herausforderung für die Gesundheits- und Sozialsysteme dar und sind hoch relevante Public-Health-Probleme.

Auch Frauen im reproduktiven Alter sind von dieser Entwicklung betroffen, je nach Region sind 7 - 25 % der Schwangeren in Europa adipös³. In Deutschland ist beispielsweise etwa jede dritte Frau zwischen 18 und 44 Jahren übergewichtig oder adipös (16,5 - 24,2 % übergewichtig; 9,7 - 17,3 % adipös)⁴. Ein erhöhtes Gewicht ist ein wichtiger Risikofaktor für unerwünschte Ereignisse während der Schwangerschaft und kann außerdem auch langfristig negative Folgen für die Gesundheit einer Schwangeren und ihres Kindes bedeuten. Für die Mutter besteht das erhöhte Risiko eines Gestationsdiabetes, hypertensiver Störungen, Entwicklung einer Präeklampsie und der Notwendigkeit eines Kaiserschnitts^{5,6}. Die Wahrscheinlichkeit einer fetalen Makrosomie sowie Fehl- und Totgeburten steigt⁷, außerdem ist das Risiko für angeborene Fehlbildungen erhöht und das Neugeborene ist häufiger auf eine intensivmedizinische Behandlung angewiesen^{8,9}. Später besteht für Kinder von adipösen Schwangeren lebenslang ein erhöhtes Risiko eigener Adipositas, metabolischer Störungen (z. B. Diabetes mellitus oder Fettstoffwechselstörungen) und Hypertonie¹⁰.

2.2 Fettgewebe

Übergewicht und Adipositas sind durch eine Zunahme des weißen Fettgewebes (WAT) charakterisiert. Als eines der größten menschlichen Organe macht es 9 - 28 % des Körpergewichts normalgewichtiger Erwachsener aus, während dieser Anteil bei adipösen Personen auf bis zu 60 - 70 % ansteigen kann¹¹.

2.2.1 Struktur

WAT besteht hauptsächlich aus univakuolären Adipozyten (Fettzellen), die eine einzelne große Lipid-gefüllte Vakuole enthalten. Sie füllt nahezu das gesamte Zellvolumen aus und verdrängt den Zellkern und andere Organellen in die Peripherie der Zelle. Umgeben sind die Adipozyten von einer Basallamina und einem reich vaskularisierten Bindegewebe. Zusätzlich schützt ein Gerüst aus Kollagen, retikulären Fasern sowie Proteinen und Proteoglykanen der

extrazellulären Matrix die Zellen vor mechanischen Einwirkungen^{12,13}. Neben Adipozyten besteht das Fettgewebe aus weiteren Zellen wie Präadipozyten, Fibroblasten, Perizyten und Endothelzellen der enthaltenen Gefäße, Makrophagen, Lymphozyten und anderen Immunzellen, die in das Gewebe einwandern¹⁴.

2.2.2 Metabolische und endokrine Funktionen

Im Gegensatz zum braunem Fettgewebe, das insbesondere in der Embryonal- und Neonatalperiode zur Thermogenese beiträgt¹⁵, fungiert WAT als Energiespeicher, es besitzt eine Schlüsselrolle in der Regulierung des Energiehaushalts und beeinflusst auch andere wesentliche Stoffwechselfunktionen des Körpers.

Energie wird in Form von Triacylglyceriden, die aus einem Glycerin-Molekül mit drei veresterten Fettsäuren bestehen, in den Adipozyten gespeichert. Dadurch wächst die Lipid-Vakuole und es kommt bei einem Kalorienüberschuss zur Ausdehnung des Fettgewebes und zu Übergewicht¹⁶. Sowohl Fettsäuren als auch Glukose werden aus dem Blutkreislauf in die Fettzellen aufgenommen und zur Synthese der Triacylglyceride genutzt, diesen Vorgang nennt man Lipogenese. Bei der De-novo-Lipogenese werden aus dem Glukose-Metabolit Acetyl-CoA mithilfe der Enzyme Acetyl-CoA-Carboxylase und Fettsäuresynthase zunächst Fettsäuren synthetisiert, die anschließend weiter zu Triacylglyceriden verestert werden können. Besteht hingegen Energiebedarf, werden aus Triacylglyceriden mittels Lipolyse wieder Fettsäuren und Glycerin freigesetzt. Leber, Muskeln oder andere Gewebe können diese freien Fettsäuren aufnehmen und ihre Energie durch Oxidation in den Mitochondrien nutzen. Das freigesetzte Glycerin kann als Substrat der Glukoneogenese in der Leber dienen. Außerdem ist WAT ein äußerst aktives endokrines Organ, das eine Vielzahl von bioaktiven Faktoren sekretiert, die Adipokine genannt werden. Diese wirken sowohl lokal auf die sekretierende Zelle selbst oder ihre Umgebung (autokrin bzw. parakrin) als auch systemisch auf andere Organe¹⁷ wie Gehirn, Muskeln, Leber oder Bauchspeicheldrüse (endokrin). Adipokine tragen zur Regulierung wesentlicher Körperfunktionen bei, indem sie unter anderem Appetit, Sättigung, Lipid- und Glukosestoffwechsel, Energiehaushalt, Fettverteilung, Insulinsensitivität und -sekretion, Immunsystem, Entzündungsreaktion, Endothelfunktion, Blutdruck und Blutgerinnung beeinflussen¹⁸. Innerhalb des WATs regulieren sie den Metabolismus und die Funktion der Adipozyten, die Adipogenese (Fettgewebbildung) sowie Einwanderung von Immunzellen¹⁹.

Die beiden Hormone Leptin und Adiponectin werden von den Adipozyten selbst produziert, andere Adipokine werden vor allem durch im Fettgewebe ansässige Immun- und Endothelzellen freigesetzt²⁰. Leptin gilt als Sättigungshormon, da es den Energiehaushalt reguliert, indem es den Appetit hemmt und den Energieverbrauch durch Beeinflussung des Glukose- und Fettstoffwechsels steigert²¹, auf diese Weise fördert es auch einen Gewichtsverlust. Die Sekretion ist direkt proportional zur Fettgewebsmenge, sodass Adipöse

besonders hohe Leptin-Spiegel aufweisen²². Allerdings profitieren sie meist aufgrund einer Leptin-Resistenz nicht von dessen vorteilhaften Effekten²³. Adiponectin besitzt verschiedene positive Effekte, es erhöht die Insulinsensitivität, wirkt antiinflammatorisch und zudem protektiv auf das kardiovaskuläre System²⁰. Das Adipokin Resistin wirkt hingegen proinflammatorisch, indem es u. a. die Produktion von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6) anregt²⁴. Diese proinflammatorischen Zytokine werden u. a. auch durch das WAT selbst sekretiert¹⁴ und gehören damit ebenfalls zu den Adipokinen. Mehrere hundert Adipokine konnten bereits nachgewiesen werden oder sind Gegenstand aktueller Forschung.

2.2.3 Regulierung

Neben seiner Selbstregulierung untersteht das WAT auch der Regulation durch andere endokrine Signale und dem sympathischen Nervensystem. Insulin fördert die Lipogenese und die Aufnahme von Glukose in die Adipozyten, während es die Lipolyse inhibiert. Glukagon agiert hingegen als Gegenspieler des Insulins, indem es die Lipolyse anregt. Leptin vermittelt ebenso gegenteilige Effekte, es vermindert die Lipogenese und Glukose-Aufnahme der Adipozyten und steigert die Lipolyse²⁵. Auch Katecholamine verursachen über β -Adrenozeptoren eine vermehrte Lipolyse²⁶.

2.2.4 Bindeglied zwischen Adipositas und ihren Folgeerkrankungen

Die Entwicklung von Adipositas und den dadurch bedingten Folgeerkrankungen ist eng mit einer Funktionsstörung des WATs und einem ungünstigen Adipokin-Sekretionsmuster verknüpft: Unter physiologischen Gegebenheiten passen Adipozyten ihren Stoffwechsel und die Adipokin-Ausschüttung dem metabolischen Zustand des Körpers an und tragen auf diese Weise dazu bei, die systemische Homöostase aufrechtzuerhalten²⁷. Dieser große Stellenwert des WATs wird mitunter dadurch deutlich, dass es nicht nur bei einem Überschuss, sondern ebenso bei einem Mangel an Fettgewebe zu negativen Auswirkungen auf den Metabolismus, wie einer Insulinresistenz, kommt²⁸, die einen Hauptrisikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und eines Typ-2-Diabetes darstellt²⁹. Verschiedene Faktoren führen bei übergewichtigen und adipösen Personen zu einer anhaltend positiven Energiebilanz, die eine Gewichtszunahme hervorruft. Dabei entsteht eine Funktionsstörung des WATs, die mit einer Hypertrophie der Adipozyten, einer Entzündungsreaktion und ektoper Fettverteilung (z. B. in Muskeln oder Leber) einhergeht¹⁹. Außerdem verändert sich dadurch die Sekretion hin zu einem ungünstigen Adipokin-Muster, das proinflammatorisch, diabetogen und atherogen wirkt¹⁹. Somit stellen die Funktionsstörung des WATs und seine veränderte Adipokinsekretion wichtige Bindeglieder dar, die den Zusammenhang von Adipositas mit ihren kardiovaskulären, metabolischen und malignen Folgeerkrankungen in gewissem Umfang erklären können.

Im Detail kommt es mit zunehmendem Körpergewicht zu einer Infiltration von Immunzellen, wie Lymphozyten und Makrophagen, die ins WAT migrieren und dort zur vermehrten Sekretion

proinflammatorischer Adipokine führen³⁰. Sie tragen zu einer lokalen und systemischen Entzündungsreaktion bei, die die Entstehung einer Insulinresistenz befördert³⁰. Auch das von Adipozyten sekretierte Leptin hat neben seinem Effekt auf den Energiehaushalt eine proinflammatorische Wirkung, indem es unter anderem die TNF- α - und IL-6-Ausschüttung von Immunzellen steigert¹⁴. Während Leptin mit steigender Fettmasse erhöhte Serum-Spiegel aufweist, zeigen sich die Adiponectin-Spiegel, ebenso wie die weiterer antiinflammatorischer Adipokine, erniedrigt¹⁴. Dies ist unter anderem auch auf die Wirkung von TNF- α und IL-6 zurückzuführen, die die Sekretion von Adiponectin direkt verringern³¹ und damit seine positiven, Insulin-sensibilisierenden Effekte mindern. Bei langanhaltendem Kalorienüberschuss werden vermehrt Lipide in Adipozyten gespeichert, die dabei an Größe (Hyperplasie) und Zellzahl (Hypertrophie) zunehmen. Es wird unweigerlich eine Grenze erreicht, an der eine Speicherung weiterer Lipide aufgrund der begrenzten Möglichkeit zur Zell- und Gewebeausdehnung die Kapazität übersteigt³². Beim Überschreiten dieser Speicherkapazität wird Fett vermehrt in viszeralen Fettdepots als auch in ektopen Geweben eingelagert (z. B. Leber, Muskeln, Herz oder Bauchspeicheldrüse)³². Zudem wird eine Entzündungsreaktion verursacht³³ und durch eine verstärkte basale Lipolyse in hypertrophen Adipozyten³⁴ werden mehr freie Fettsäuren freigesetzt. Die Kombination dieser Effekte führt zu metabolischen Erkrankungen wie einer lokalen und systemischen Insulinresistenz^{33,35,36}. Insbesondere der Adipozyten-Hypertrophie kommt in diesem Zusammenhang eine Schlüsselrolle zu. Große Adipozyten sind assoziiert mit einer reduzierten Insulinsensitivität, einer erhöhten Anzahl von Makrophagen im WAT, oxidativem Stress, erhöhten Entzündungsmarkern³⁰, erhöhten proinflammatorischen Adipokinen (wie Leptin, IL-6, TNF- α), geringeren Spiegeln des protektiven Adiponectins und verringerten weiteren antiinflammatorischen Adipokinen³⁷.

2.2.5 Subkutanes und viszerales Fettgewebe

Die zwei wesentlichen WAT-Depots des Körpers sind das subkutane Fettgewebe (scWAT), das unter der Haut lokalisiert ist, und das viszerale, um innere Organe gelegene, Fettgewebe³⁸. Beide unterscheiden sich nicht nur bezüglich ihrer Lokalisation, auch die enthaltenen Adipozyten, ihre endokrine Funktion, lipolytische Aktivität und Reaktion auf einige Hormone sind verschieden³⁹.

Das scWAT dient als physiologischer Energiespeicher, indem es überschüssige freie Fettsäuren und Triacylglyceride aufnimmt und auf diese Weise deren Einlagerung an anderen Orten verhindert⁴⁰. Sobald seine Speicherkapazität erschöpft ist, sammelt sich Fett zunehmend auch im viszeralen WAT und ektopen Geweben, die weniger für die Lipidspeicherung geeignet sind³⁹. Die mangelnde Kapazität des scWATs, weitere Lipide zu speichern, stellt also einen wesentlichen Mechanismus der pathologischen Folgen einer Adipositas dar⁴¹ und ist mit der Entwicklung einer Funktionsstörung des WATs verbunden³⁰.

Während vermehrtes intraabdominelles viszerales Fettgewebe mit einem erhöhten Risiko für Stoffwechselstörungen und kardiovaskuläre Erkrankungen verbunden ist⁴², ist dieser Zusammenhang bezogen auf scWAT geringer ausgeprägt⁴³ und es scheint teilweise sogar protektive Effekte aufzuweisen⁴⁴. Somit ist die Körperfettverteilung neben der bereits erwähnten Funktionsstörung des WATs ein maßgeblicher Faktor, der in Verbindung mit der Entwicklung Adipositas-bedingter Folgeerkrankungen steht.

Anders als im scWAT, das eher eine speichernde Funktion aufweist, sind die Adipozyten im viszeralen WAT metabolisch aktiver und zeigen eine höhere lipolytische Aktivität⁴⁵, wodurch mehr freie Fettsäuren freigesetzt werden. Viszerales WAT spricht weniger auf den anti-lipolytischen Effekt von Insulin an³⁹, enthält mehr Makrophagen und sekretiert mehr proinflammatorische Adipokine als scWAT⁴⁶. Diese Unterschiede unterstreichen die mit abdomineller Adipositas verbundenen metabolischen und kardiovaskulären Risiken, denn die viszerale Fettmasse korreliert stärker mit Adipositas-assoziierten Folgeerkrankungen als eine Adipositas selbst⁴⁷ und die Menge des viszeralen Fettgewebes ist der stärkste Prädiktor für eine Insulinresistenz⁴⁸. Auch die Subgruppe metabolisch gesunder Adipöser, die (noch) keine Insulinresistenz oder andere metabolische Komorbidität aufweisen, kann in Teilen durch die andersartige Körperfettverteilung hin zu weniger viszeralem WAT erklärt werden⁴⁹. Im Gegensatz dazu gibt es Anzeichen dafür, dass eine Vermehrung des scWATs die Insulinsensitivität fördern und den Stoffwechsel vorteilhaft beeinflussen kann⁴⁴.

2.3 Fettsäuren im Blut

Blut enthält Fettsäuren in Form von Triacylglyceriden, Cholesterinestern, Phospholipiden und freien Fettsäuren. Da sie nicht wasserlöslich sind, liegen sie gebunden an Transportproteine wie Lipoproteine oder Albumin vor. Lipoproteine besitzen eine Phospholipid-haltige Hülle und transportieren Triacylglyceride sowie Cholesterinester. Freie Fettsäuren, die einen deutlich geringeren Anteil ausmachen, werden gebunden an Albumin transportiert. Bei Adipositas kommt es zu einer Dyslipidämie, die wahrscheinlich durch die begleitende Insulinresistenz verursacht wird⁵⁰ und u. a. durch erhöhte Triacylglyceride und freie Fettsäuren sowie veränderte Konzentrationen verschiedener Lipoproteine gekennzeichnet ist⁵¹. Sie gilt als wichtige Verbindung zwischen Adipositas und der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes oder kardiovaskulärer Folgeerkrankungen⁵⁰. Auch die Zusammensetzung der Blut-Fettsäuren selbst wird durch Adipositas verändert und Unterschiede im Fettsäureprofil sind mit verschiedenen Stoffwechselstörungen assoziiert⁵²⁻⁵⁴. Fettsäuren im Blut spiegeln in einem gewissen Maß die über die Nahrung aufgenommenen Fettsäuren wider⁵⁵, sind aber auch vom individuellen Fettsäurestoffwechsel abhängig, der u. a. durch Insulin reguliert wird⁵⁶.

2.4 Inflammation

Wie bereits in Ansätzen ausgeführt wurde, scheint Inflammation (Entzündung) ein bedeutender Mechanismus zu sein, der zur Entwicklung Adipositas-assoziiierter Komplikationen, wie insbesondere metabolischer Störungen, beiträgt¹⁴. Inflammation ist eine Reihe zellulärer und molekularer Reaktionen, die den Körper vor Infektionen und anderen Schädigungen schützt und außerdem zur Wiederherstellung der dabei destruierten Gewebe beiträgt⁵⁷. Eine Schädigung führt zu einer akuten Entzündung, indem sie die Freisetzung immunmodulatorischer Moleküle aus gewebeständigen Makrophagen und Mastzellen verursacht, die wiederum für eine Migration weiterer Immunzellen (Neutrophile, Makrophagen und Lymphozyten) aus der Blutzirkulation zur Entzündungsstelle sorgen⁵⁸. Die Infektionserreger und beschädigten Zellen werden dann durch die infiltrierenden Immunzellen entfernt⁵⁹. Neben den infiltrierenden Immunzellen ist eine akute Inflammation allgemein durch erhöhte Zytokinpiegel (TNF- α , IL-6 und andere) an der lokalen Entzündungsstelle und im systemischen Blutkreislauf gekennzeichnet⁵⁷. Adipositas ist hingegen assoziiert mit einer chronischen niedriggradigen Entzündung, die durch lediglich moderat erhöhte proinflammatorische Faktoren im Blutkreislauf und das Fehlen klinischer Anzeichen einer Entzündung charakterisiert ist⁵⁹. Das bedeutet, anders als eine akute Entzündung, verläuft sie chronisch, besteht also fortwährend, ohne eine Ausheilung zu erreichen, und besitzt eine geringere (niedriggradige) Intensität.

Dabei gilt WAT als wesentlicher Ursprungsort, an dem die Adipositas-bedingte Entzündung ausgelöst wird und sich verstärkt⁶⁰. Der initiale Auslöser der Entzündungsreaktion ist noch nicht bekannt, WAT bietet im adipösen Zustand jedoch zahlreiche potenzielle Entzündungsreize (z. B. Zelltod, Hypoxie oder mechanischen Stress)³³. Wie bereits geschildert, infiltrieren mit zunehmendem Körpergewicht verschiedenste Immunzellen das WAT und sekretieren dort vermehrt proinflammatorische Faktoren³⁰. So verändert eine übermäßige Fettakkumulation die Anzahl und Funktion der Immunzellen im Fettgewebe wesentlich⁵⁹. Makrophagen stellen hierbei die größte Population dar⁶⁰. Diese besitzen bei Normalgewicht antiinflammatorische Eigenschaften (M2-Makrophagen), im adipösen WAT verschiebt sich jedoch ihre Polarisation zu einem proinflammatorischen Phänotyp (M1-Makrophagen)⁶⁰, der vermehrt proinflammatorische Adipokine sekretiert und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert¹⁴. Neben Makrophagen spielen auch viele weitere Immunzellen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung der WAT-Inflammation, wie z. B. B- und T-Lymphozyten, Neutrophile, dendritische Zellen und Mastzellen⁶⁰.

Die durch Adipositas verursachte Inflammation beginnt im WAT und greift dann auf andere Gewebe über, dadurch weitete sich die lokale zu einer systemischen niedriggradigen Entzündung aus⁶⁰, die wiederum zur Entwicklung Adipositas-assoziiierter Komplikationen beiträgt¹⁴. Im WAT werden zunächst lokal proinflammatorische Faktoren und Adipokine durch

Adipozyten und verschiedene Immunzellen sekretiert^{19,30}. Diese können über den systemischen Kreislauf andere Gewebe, wie Leber und Skelettmuskulatur, erreichen und auch dort proinflammatorische Signalwege aktivieren, die u. a. die Insulin-Signalübertragung beeinträchtigen und somit die Entwicklung einer Insulinresistenz fördern⁶⁰. Eine Insulinresistenz ist gekennzeichnet durch schwerwiegende Störungen des Glukosestoffwechsels infolge eines geringeren Ansprechens der insulinsensitiven Gewebe (wie WAT, Leber und Skelettmuskulatur) auf Insulin⁶¹. Die β -Zellen der Bauchspeicheldrüse kompensieren diesen Zustand zunächst durch erhöhte Insulin-Ausschüttung, bis es schließlich bei ihrer Erschöpfung zu anhaltender Hyperglykämie und einem Typ-2-Diabetes kommt⁶⁰. Durch Beeinträchtigung des Lipidstoffwechsels kann eine Insulinresistenz auch zur Bildung atherosklerotischer Plaques⁶¹ und somit zur Entwicklung verschiedenster kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen.

Auch in der Schwangerschaft scheint ein Überschuss an Fettgewebe zur Entwicklung einer systemischen Inflammation beizutragen, indem sowohl im WAT selbst, als auch in der Plazenta, Entzündungsreaktionen ausgelöst werden⁶². Eine milde systemische Entzündungsreaktion mit Gipfel während des dritten Schwangerschaftstrimenons gilt als physiologisch⁶³, eine überschießende Reaktion ist jedoch mit verschiedenen Komplikationen wie Präeklampsie, intrauteriner Wachstumsrestriktion, Früh- und Fehlgeburten sowie Gestationsdiabetes assoziiert^{62,64}. Dabei korreliert der Grad der Inflammation mit der Schwere der Komplikation⁶⁴.

2.4.1 Potenzielle Entzündungsmarker

Adipositas induziert die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine (wie TNF- α , IL-6 oder IL-1) und Chemokine (wie CXCL1 oder CXCL10) durch Adipozyten und Immunzellen, die an der Entzündung des WATs beteiligt sind⁶⁵. TNF- α ist zusätzlich zu seiner potenten proinflammatorischen Wirkung in den Insulin- und Glukosestoffwechsel involviert und befördert eine Insulinresistenz⁶⁶. Auch IL-6 beeinflusst den Glukosestoffwechsel und spielt eine Rolle in der Entwicklung der Insulinresistenz, es scheint außerhalb des WATs jedoch teilweise auch vorteilhafte Effekte zu besitzen⁶⁷. Beide weisen eine positive Korrelation mit dem Körpergewicht auf⁶⁷. IL-1, das aus den beiden Hauptproteinen IL-1 α und IL-1 β besteht⁶⁸, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Insulinresistenz⁶⁹. Chemokine bewirken hingegen die Einwanderung von zirkulierenden Leukozyten in hypertrophes Fettgewebe⁷⁰ und fördern auf diese Weise die WAT-Entzündung. Die zugrundeliegenden Mechanismen und ihre Rolle in der Entwicklung einer Adipositas sind allerdings noch nicht im Detail verstanden⁷⁰.

2.5 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress scheint ein weiterer bedeutender Mechanismus zu sein, der Adipositas mit ihren assoziierten Komplikationen verbindet³¹. Als oxidativen Stress bezeichnet man ein

Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Oxidantien⁷¹. Sie sind natürliche Produkte des aeroben Stoffwechsels und unter physiologischen Bedingungen besteht ein Fließgleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen, das jedoch unter pathophysiologischen Bedingungen ausgelenkt werden kann⁷². Dies kann zur Veränderung körpereigener Moleküle führen, wodurch es zum Verlust bestimmter Funktionen von Proteinen, Lipiden und DNA sowie zu Gewebeschädigungen kommen kann⁷². Oxidativer Stress ist positiv mit steigendem BMI korreliert⁷³ und WAT scheint eine bedeutende Rolle in seiner Entstehung zu spielen⁷⁴.

Adipositas erzeugt oxidativen Stress durch verschiedene potenzielle Mechanismen. Zum einen gilt Fettgewebe an sich als unabhängiger Faktor für die Entstehung eines systemischen oxidativen Stresses, da die ausgeschütteten proinflammatorischen Adipokine die ROS-Produktion induzieren³¹. Im Zuge der chronischen niedriggradigen Entzündung stimulieren Adipokine die Ausschüttung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies durch Immunzellen³¹. Außerdem kann Fettgewebe die NADPH-Oxidase-Aktivität anregen, die ebenfalls erheblich zur ROS-Produktion beiträgt³¹. Zum anderen fördern verschiedene weitere, nicht Fettgewebespezifische, Mechanismen oxidativen Stress im Zusammenhang mit Adipositas, indem sie die Entstehung von Oxidantien auslösen. Dazu gehören die Fettsäure-Oxidation in Mitochondrien und Peroxisomen, eine Adipositas-assoziierte Funktionsstörung der Mitochondrien, fettreiche Diät und mechanische Zellschäden bei übermäßiger Fettansammlung³¹. Generell entstehen ROS und andere Oxidantien außerdem in der mitochondrialen Atmungskette, bei der physiologischen Enzymaktivität von Oxidoreduktasen sowie durch Entzündungsprozesse⁷². Dem gegenüber stehen körpereigene Mechanismen zum Schutz vor oxidativen Schädigungen. Dazu zählen u. a. verschiedene Vitamine und die antioxidativ wirkenden Enzyme Katalase (CAT), Superoxiddismutase (SOD) und Glutathionperoxidase (GPX), die ROS stabilisieren und zu weniger schädlichen Molekülen reduzieren⁷⁵. Langfristig können sich diese antioxidativen Ressourcen erschöpfen und der resultierende oxidative Stress kann Adipositas-assoziierte Gesundheitsprobleme wie Insulinresistenz oder das metabolische Syndrom fördern³¹.

In der Schwangerschaft kommt es physiologischer Weise zu oxidativem Stress, der vor allem durch die einhergehende systemische Entzündungsreaktion hervorgerufen wird⁷⁶. Analog zur Inflammation ist erhöhter oxidativer Stress in der Plazenta jedoch mit Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie, Frühgeburtlichkeit, intrauteriner Wachstumsrestriktion und Gestationsdiabetes verbunden⁷⁷. Das gehäufte Vorkommen verschiedenster Komplikationen bei adipösen Schwangeren könnte folglich u. a. durch vom WAT ausgehende Inflammation und oxidativen Stress bedingt sein.

2.5.1 Potenzielle oxidative Stressmarker

Als potenzielle Marker für oxidativen Stress eignen sich insbesondere die Untereinheiten der NADPH-Oxidase (CYB-A, CYB-B, NCF1, NCF2, NOX4), die eine Hauptquelle für ROS in verschiedenen Zellen darstellt⁷⁸ und somit hinweisend für die pro-oxidative Stresskapazität sein kann. Die NADPH-Oxidase-Aktivität im WAT zeigt sich bei Adipositas erhöht, während die Aktivität antioxidativer Enzyme (wie CAT, SOD und GPX) erniedrigt ist⁷⁸. Letztere können folglich Aufschluss über die antioxidative Kapazität geben.

2.6 Metformin als möglicher Therapieansatz

Das Antidiabetikum Metformin besitzt verschiedene positive Effekte auf Inflammation und oxidativen Stress, sodass es womöglich Teil einer neuen Behandlungsstrategie werden könnte. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Metformin sowohl Inflammation als auch oxidativen Stress reduziert⁷⁹⁻⁸¹. Unter anderem verringert es die Ausschüttung unterschiedlicher proinflammatorischer Zytokine⁸² sowie Chemokine⁸³ und hemmt direkt die ROS-Produktion in den Mitochondrien⁸⁴. Metformin gilt seit Jahrzehnten als Medikament der ersten Wahl in der Therapie des Typ-2-Diabetes⁸⁵. Seine antiglykämische Wirkung wird vor allem durch eine Verringerung der hepatischen Glukose-Produktion und eine verbesserte Insulinsensitivität vermittelt⁸⁶, trotzdem ist der zugrundeliegende Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt⁸⁷. Im Gegensatz zu anderen antidiabetischen Wirkstoffen ist es sicher in der Anwendung, da es keine Hypoglykämien auslöst⁸⁸. Außerdem reduziert Metformin kardiovaskuläre Ereignisse, kann sich positiv auf das Körpergewicht auswirken und ist nicht zuletzt eine besonders kostengünstige Therapie⁸⁸.

Auch in der Schwangerschaft wird es u. a. bei bereits bestehendem Typ-2-Diabetes, Gestationsdiabetes oder Polyzystischem Ovarsyndrom eingesetzt⁸⁹. Da Metformin plazentagängig ist⁹⁰ und die Langzeitfolgen für das Kind noch nicht umfassend erforscht sind, bestehen jedoch unterschiedliche Ansichten zum Einsatz von Metformin in der Schwangerschaft. Diese reichen beim Gestationsdiabetes von der liberalen Empfehlung von Metformin als First-Line-Therapie neben Insulin (NICE, Großbritannien)⁹¹ bis zur vergleichsweise restriktiven Empfehlung zum Einsatz allein bei strenger Indikationsstellung (DDG und DGGG, Deutschland)⁹². Verschiedene Studien belegen, dass Metformin bezüglich kindlicher und mütterlicher Stoffwechselfparameter gegenüber der gängigen Insulintherapie gleichwertig bzw. überlegen ist⁹³. So waren postprandiale Plasma-Glukose-Spiegel und das Risiko für schwangerschaftsinduzierte Hypertonie unter Metformintherapie geringer als unter Insulin⁹³. Eine große Meta-Analyse aus 16 randomisierten kontrollierten Studien konnte zeigen, dass Metformin während der Schwangerschaft keine nachteiligen Effekte aufweist und in der Neugeborenenphase sogar potenzielle Vorteile besitzt (geringeres Risiko neonataler Hypoglykämie sowie intensivmedizinischer Behandlung und weniger Large-for-gestational-

age-Babys)⁹⁴. Auch für die Mütter zeigten sich in dieser Analyse positive Effekte, da ihre Gewichtszunahme während der Schwangerschaft mit Metformin geringer war⁹⁴. Zudem waren Patientinnen mit der Metformintherapie deutlich zufriedener als mit einer Insulintherapie⁹⁵. Bezüglich möglicher Langzeitfolgen für Kinder Metformin-behandelter Schwangerer ist die Datenlage wesentlich dünner. In mehreren Nachbeobachtungsstudien zeigten Kinder im Alter von zwei Jahren keinen Unterschied bezogen auf ihrer Entwicklung^{96,97} oder ihren Blutdruck⁹⁸. Im Alter von sieben bis neun Jahren waren metabolische Parameter, Gesamtkörperfett sowie die viszerale Fettmenge ähnlich denen mit Insulinbehandlung, allerdings waren Metformin-exponierte Kinder teilweise größer⁹⁹. Bevor der Einsatz in der Schwangerschaft als uneingeschränkt sicher angesehen werden kann, fehlen bisher weitere langfristige Untersuchungen, vor allem im Hinblick auf metabolische Effekte und Gewichtsentwicklung Metformin-exponierter Kinder.

Aufgrund seiner verschiedenen positiven Effekte ist auch eine Metforminbehandlung adipöser Schwangerer ohne Diabetes denkbar, um möglicherweise mütterlichen und kindlichen Schädigungen vorzubeugen. Diesbezüglich wurden bereits verschiedene klinische Studien durchgeführt, bei denen eine Metformintherapie übergewichtiger und adipöser Schwangerer untersucht wurde. Unter anderem wegen Studien mit heterogenen oder eher kleinen Gruppen sowie Ungenauigkeiten und Unterschieden im Design gibt es aktuell jedoch noch keine breite Evidenz für eine abschließende Bewertung des Therapienutzens bei Schwangeren ohne Diabetes. Bisher wurde in Meta-Analysen vor allem eine hohe Evidenz für die Reduktion der Gewichtszunahme in der Schwangerschaft unter Metformin festgestellt^{100,101}. Ein reduziertes Vorkommen kindlicher unerwünschter Ereignisse wurde dabei bis jetzt nicht belegt¹⁰⁰.

2.7 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Potenzielle Schlüsselmechanismen, wie chronische Inflammation und oxidativer Stress, die für den Übergang von bloßer Adipositas zu ihren nachfolgenden metabolischen, kardiovaskulären und weiteren Komplikationen verantwortlich sind, eröffnen neue Möglichkeiten für die Entwicklung gezielter Behandlungsstrategien. Ein vielversprechender Angriffspunkt einer solchen neuen Therapie stellt das WAT dar, da es als Bindeglied zwischen Adipositas und ihren Folgeerkrankungen fungiert. Es gilt als Ursprungsort und Verstärker der Adipositas-assoziierten Inflammation und des oxidativen Stresses, die von dort aus auf den gesamten Körper übergreifen. Das Unterbinden dieser Mechanismen im WAT könnte dazu beitragen, potenzielle systemische Komplikationen der Adipositas zu verhindern. Demnach könnte ein derartiger Therapieansatz für adipöse Schwangere möglicherweise den teilweise tiefgreifenden, kurzfristigen und langfristigen, Adipositas-assoziierten Schädigungen von Schwangeren und Kindern vorbeugen.

Bisher gibt es kaum Untersuchungen, die das dahingehende Potenzial einer Metforminbehandlung adipöser Schwangerer erforschen. In der vorliegenden Arbeit soll eine Metformintherapie mit Beginn der Schwangerschaft anhand eines Mausmodells mit Diät-induzierter Adipositas dargestellt werden. Ziel ist es, die potenzielle Wirksamkeit von Metformin mit besonderem Fokus auf das WAT der Muttertiere zu untersuchen.

Es lassen sich folgende zentrale Fragestellungen zusammenfassen:

1. Kann sich eine Metforminbehandlung der Muttertiere günstig auf ihr Körpergewicht, die viszerale WAT-Akkumulation und WAT-Morphologie auswirken?
2. Kann eine Metforminbehandlung Inflammation und oxidativem Stress im WAT der Muttertiere entgegenwirken?
3. Sind darüber hinaus weitere vorteilhafte Effekte der Metforminbehandlung auf Proteinebene im egWAT zu beobachten?
4. Beeinflusst eine Metforminbehandlung das Blut-Fettsäureprofil der Muttertiere?

Insgesamt soll in der Zusammenschau dieser Fragestellungen diskutiert werden, ob eine Metformintherapie adipöser Schwangerer geeignet wäre, um Schlüsselmechanismen im WAT zu unterbinden und somit möglicherweise Adipositas-bedingten Komplikationen vorzubeugen.

3 Material und Methoden

Alle verwendeten Materialien, Geräte und Software können den nachfolgenden Tabellen entnommen werden, diese Angaben werden in der Beschreibung der einzelnen Methoden nur in Teilen wiederholt.

3.1 Medikamente, Chemikalien und Enzyme

Tabelle 1: Medikamente, Chemikalien und Enzyme

Medikament / Chemikalie / Enzym	CAS-Nummer	Hersteller	Verwendung
1,1-Dimethylbiguanid Hydrochlorid (Metformin)		Alfa Aesar, Kandel, Deutschland	Metformin-Intervention
Buprenoret 0,3 mg/ml Injektionslösung (Buprenorphin in 0,9 % NaCl)		Bayer, Leverkusen, Deutschland	Euthanasie
Acetonitril für Flüssigchromatographie	75-05-08	Merck, Darmstadt, Deutschland	Metformin-Quantifizierung
Ammoniumformat, ≥ 99 %, für LC-MS	540-69-2	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA	Metformin-Quantifizierung
Roti®-Histofix 4 %		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie
Isopropanol (2-Propanol), ≥ 99,95 %	67-63-0	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie, RNA-Isolation
Hämalaunlösung sauer nach Mayer		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	17372-87-1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie
Essigsäure	64-19-7	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie
Neo-Clear®	64741-65-7	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Histologie
Neo-Mount®		Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Histologie
Ethanol vergällt, ≥ 99,8 %	64-17-5	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie
Ethanol absolut	64-17-5	Merck, Darmstadt, Deutschland	RNA-Isolation
TRI Reagent®		Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	RNA-Isolation
Chloroform	67-66-3	Merck, Darmstadt, Deutschland	RNA-Isolation
DEPC (Diethylpyrocarbonat), ≥ 97 %	1609-47-8	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	RNA-Isolation
RQ1 RNase-Free DNase (1 U/μl)		Promega, Mannheim, Deutschland	cDNA-Synthese
RQ1 DNase 10X Reaction Buffer		Promega, Mannheim, Deutschland	cDNA-Synthese

RQ1 DNase Stop Solution (20 mM EGTA)		Promega, Mannheim, Deutschland	cDNA-Synthese
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)		Promega, Mannheim, Deutschland	cDNA-Synthese
M-MLV RT 5X Buffer		Promega, Mannheim, Deutschland	cDNA-Synthese
RNasin® Ribonuclease Inhibitors (40 U/μl)		Promega, Mannheim, Deutschland	cDNA-Synthese
Platinum® qPCR SuperMix-UDG mit ROX		Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA	RT-qPCR
Water for chromatography LiChrosolv® (HPLC-Wasser)	7732-18-5	Merck, Darmstadt, Deutschland	RT-qPCR
TRIS-Hydrochlorid	1185-53-1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Proteomic Screen
Natriumchlorid	7647-14-5	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Proteomic Screen
IGEPAL® CA-630	9002-93-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen
Desoxycholsäure Natriumsalz	302-95-4	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Proteomic Screen
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)	6381-92-6	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen
Aprotinin, from bovine lung	9087-70-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen
Pepstatin A, ≥ 75 %	26305-03-3	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen
Leupeptin, ≥ 90 %	103476-89-7	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), ≥ 98,5%	329-98-6	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen
Sodiumfluorid, NaF, ≥ 99 %	7681-49-4	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen
Sodiumorthovanadat, Na ₃ VO ₄ , ≥ 99 %	13721-39-6	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen
Aceton	67-64-1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Proteomic Screen
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail		Roche, Basel, Schweiz	Proteomic Screen
Triethylammoniumbicarbonat	15715-58-9	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen
Urea, ≥ 99,5 %	57-13-6	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen

DTT BioChemica (Dithiothreitol)	3483-12-3	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	Proteomic Screen
2-Chloracetamid	79-07-2	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen
Trypsin (1 µg/µl)	9002-07-7	Serva, Heidelberg, Deutschland	Proteomic Screen
Lysyl EndopeptidaseR (Lys-C)		WAKO, Neuss, Deutschland	Proteomic Screen
Ameisensäure, puriss. p.a., ≥ 98 %	64-18-6	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomic Screen
Water with 0,1% Formic Acid (v/v), Optima LC/MS Grade (Puffer A)	7732-18-5	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Proteomic Screen
Acetonitril, 80 %, 20 % Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, Optima LC/MS (Puffer B)	75-05-8	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Proteomic Screen
Methanol, ≥ 99,8 %	67-56-1	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA	Proteomic Screen
Myristinsäure-d ₂₇	60658-41-5	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Lipidomic Screen
Chloroform	67-66-3	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Lipidomic Screen
Methanol, mit 250 ppm BHT (entspricht 0,025 %)	15833-61-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Lipidomic Screen
HCl	7647-01-0	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Lipidomic Screen
Hexan	110-54-3	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Lipidomic Screen

3.2 Stammlösungen und Puffer

Tabelle 2: Stammlösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	Endkonzentration	
DEPC-H ₂ O	DEPC <i>24 h inkubieren bei RT, anschließend autoklavieren</i>	0,2 %	(v/v)
modifizierter RIPA-Puffer	TRIS-Hydrochlorid NaCl IGEPAL® Desoxycholsäure Natriumsalz EDTA Aprotinin Pepstatin A Leupeptin PMSF NaF Na ₃ VO ₄	50 150 1 % 0,25 % 1 1 1 1 1 1 1	mM mM (v/v) (v/v) mM µg/ml µg/ml µg/ml mM mM mM
Urea-Puffer	Urea TEAB	8 50	M mM

Alle Puffer wurden in MilliQ-Wasser angesetzt und für das allgemeine Arbeiten im Labor verwendet.

3.3 (Oligo-)Nukleotide

Tabelle 3: (Oligo-)Nukleotide zur cDNA-Synthese

(Oligo-)Nukleotid	Hersteller	Verwendung
Primer „random“ (Bestellnr. 11034731001) (0,5 µg/ml)	Roche, Basel, Schweiz	cDNA-Synthese
Oligo(dT) Primer (0,5 µg/ml)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland	cDNA-Synthese
dNTP Mix (jeweils 10 mM)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	cDNA-Synthese

Tabelle 4: Oligonukleotide für die RT-qPCR

for = forward primer, rev = reverse primer, taq = Taqman-Sonde;
A = Adenosin, T = Thymin, C = Cytosin, G = Guanin

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Referenz
IL-6 for	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT	102
IL-6 rev	AATCAGAATTGCCATTGCACAA	
IL-6 taq	TCTTTTCTCATTTCACGATTTCCCAGAGAA	
TNF-α for	GGCTGCCCCGACTACGT	102
TNF-α rev	GACTTTCTCCTGGTATGAGATAGCAA	
TNF-α taq	CCTCACCCACACCGTCAGCCG	
IL-1α for	TCGGGAGGAGACGACTCTAAATA	102
IL-1α rev	TGGCAACTCCTTCAGCAACA	
IL-1α taq	TCAGATTCACAACCTGTTTCGTGAGCGCTC	
IL-1β for	TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC	102
IL-1β rev	GGACAGCCCAGGTCAAAGG	
IL-1β taq	ACCCCAAAGATGAAGGGCTGCTTCC	
CXCL1 for	AGACCATGGCTGGGATTCAC	102
CXCL1 rev	AGCCTCGCGACCATTCTTG	
CXCL1 taq	CTGCACCCAAACCGAAGTCATAGCCAC	
CXCL10 for	CATCCCTGCGAGCCTATCC	102
CXCL10 rev	CCCTTTTAGACCTTTTTTGGCTAA	
CXCL10 taq	CCCACGTGTTGAGATCATTGCCACG	
CYB-A for	CGTCTGGCCTGATTCTCATCA	102
CYB-A rev	GATAGAGTAGGCGCCGAAATACC	
CYB-A taq	CATCGTGGCTACTGCTGGACGTTTCAC	
CYB-B for	CCCAACTGGGATAACGAGTTCA	102
CYB-B rev	TCAGGGCCACACAGGAAAAC	
CYB-B taq	ACCATTGCAAGTGAACACCCTAACACCACA	
NCF1 for	CACCTTCATTGCCCATATTGC	102
NCF1 rev	ACAGGTCCTGCCACTTAACCA	
NCF1 taq	CATCCCAGCCAGCACTATGTGTACATGT	
NCF2 for	CCGATATTCCACCACCTCCTAA	102
NCF2 rev	CATAGGCACGCTGAGCTTCA	
NCF2 taq	TCACCAGGTCACAAGCAAAAAGAGCCC	
NOX4 for	GAAGGTCCCTAGCAGGAGAACA	102
NOX4 rev	ACTGAAAAGTTGAGGGCATTAC	
NOX4 taq	TCTCAGGTGTGCATGTAGCCGCC	

SOD1 for	GTACCAGTGCAGGACCTCATTTTA	102
SOD1 rev	GTCTCCAACATGCCTCTCTTCAT	
SOD1 taq	CTCACTCTAAGAAACATGGTGGCCCGG	
GPX1 for	GACACCAGGAGAATGGCAAGA	102
GPX1 rev	TTCTCACCATTCACTTCGCACTT	
GPX1 taq	TGAATTCCCTCAAGTACGTCCGACCTGG	
CAT for	CCATCCTTTATCCATAGCCAGAA	102
CAT rev	GAATCCCTCGGTCACTGAACAA	
CAT taq	TCGTCCCGAGTCTCTCCATCAGGTTTCT	
18S for	AGATCCCAGACTGGTTCCTG	
18S rev	TTGTTGTCTAGACCGTTGGC	
18S taq	CAGAACCTGGCTGTACTTCCCATCC	
β-Actin 5	TGACAGGATGCAGAAGGAGATTACT	103
β-Actin 3	GCCACCGATCCACACAGAGT	
β-Actin taq	ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC	
HPRT 5	TGGCCATCTGCCTAGTAAAGCT	
HPRT 3	TAGGCTCATAGTGCAAATCAAAGTC	
HPRT taq	TTTTTAGAAATGTCAGTTGCTGCGTCCCC	
GUSB 5	CGCTGAGAGTAATCGGAAACAA	
GUSB 3	CGCAAATAAAGGCCGAAGT	
GUSB taq	ATCTTCACTCGCCAGAGACAGCCCA	
GAPDH for	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA	103
GAPDH rev	TGCCTGCTTCACCACCTTCT	
GAPDH taq	CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	

Sämtliche für die RT-qPCR verwendeten Oligonukleotide stammen von dem Hersteller Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland).

3.4 Geräte

Tabelle 5: Geräte

Gerät	Hersteller	Verwendung
4000 QTRAP®	AB SCIEX, Darmstadt, Deutschland	Metformin-Quantifizierung
SLC-20AD Prominence HPLC	Shimadzu, Kyoto, Japan	Metformin-Quantifizierung
Gewebeinfiltrationsautomat ASP300S	Leica, Wetzlar, Deutschland	Histologie
Paraffinausgießstation EG1150 H	Leica, Wetzlar, Deutschland	Histologie
Rotationsmikrotom RM2255	Leica, Wetzlar, Deutschland	Histologie
Kühlplatte Leica EG1150 C	Leica, Wetzlar, Deutschland	Histologie
Slide Scanner SCN400	Leica, Wetzlar, Deutschland	Histologie
SkyScan 1176	Bruker, Kontich, Belgien	µCT
Schwingmühle MM 400	Retsch, Haan, Deutschland	RNA-Isolation
Zentrifuge Z 216 MK	Hermle, Wehingen, Deutschland	RNA-Isolation
NanoQuant infinite M200 Pro	Tecan, Crailsheim, Deutschland	RNA-Isolation

HLC Blockthermostat TH23	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland	cDNA-Synthese
7500 Real Time PCR System Thermocycler	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA	RT-qPCR
Folienschweiß-Automat 4s2	4titude, Berlin, Deutschland	RT-qPCR
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland	RT-qPCR
Sonifizierer SONOPULS® HD 2070	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland	Proteomic Screen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Proteomic Screen
Vortex-Mixer V-1 Plus	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland	Allgemeine Arbeiten
Bioruptor®	Diagenode, Ougrée, Belgien	Proteomic Screen
Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Proteomic Screen
Eppendorf ThermoMixer® C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Proteomic Screen
Q Exactive Plus Orbitrap	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Proteomic Screen
EASY nLC 1000	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Proteomic Screen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Proteomic Screen, Lipidomic Screen
Reacti-Therm III	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Lipidomic Screen
7693 Autosampler	Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA	Lipidomic Screen
1890A GC-System	Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA	Lipidomic Screen
5975 Inert XL EI/CI MSD	Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA	Lipidomic Screen

3.5 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Verwendung
SeQuant® ZIC®-HILIC Säule (5 µm, 2.1 x 100 mm)	Dichrom, Marl, Deutschland	Metformin-Quantifizierung
Adhäsionsobjektträger SuperFrost Plus	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Histologie
Mikrotomklinge R35	pfm medical ag, Köln, Deutschland	Histologie
Deckgläser (24 x 40 mm / 24 x 50 mm / 24 x 60 mm)	VWR International, Darmstadt, Deutschland	Histologie
Filter-Pipettenspitzen epT.I.P.S LoRetention, 0,1-10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	RT-qPCR
96-Well-Platte Frame Star® 96 Semi-Skirted	4titude, Berlin, Deutschland	RT-qPCR
Clear Seal	4titude, Berlin, Deutschland	RT-qPCR

AttractSPE™ Disks BIO for Molecular Biology	Affiniseq, Petit Couronne, Frankreich	Proteomic Screen
3M Empore C18 47 mm Disk	3M Bioanalytical, Saint Paul Minnesota, USA	Proteomic Screen
Poroshell 120 EC-C18	Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA	Proteomic Screen
GC-Säule HP-5MS (25 m, 0,25 mm, 0,25 µm)	Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA	Lipidomic Screen

3.6 Software und Datenbanken

Tabelle 7: Software und Datenbanken

Name	Hersteller / Entwickler	Verwendung
QuPath 0.2.0 m2	University of Edinburgh, Edinburgh, Großbritannien ¹⁰⁴	Histologie
Aperio ImageScope	Leica, Wetzlar, Deutschland	Histologie
Random.org	Randomness and Integrity Services, Dublin, Irland	Histologie
ImageJ Fiji	Curtis Rueden u. a. ¹⁰⁵	Histologie
Adiposoft 1.16	CIMA, Universidad de Navarra, Pamplona, Spanien ¹⁰⁶	Histologie
NRecon	Bruker, Kontich, Belgien	µCT
CTAn	Bruker, Kontich, Belgien	µCT
CTVox	Bruker, Kontich, Belgien	µCT
i-control 2.0	Tecan, Crailsheim, Deutschland	RNA-Isolation
7500 Software 2.0.6	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA	RT-qPCR
AMDIS 2.72	NIST, Gaithersburg, Maryland, USA	Lipidomic Screen
NIST 08 MS Library	NIST, Gaithersburg, Maryland, USA	Lipidomic Screen
R 3.61	R Core Team, Wien, Österreich ¹⁰⁷	Lipidomic Screen
R Studio 1.2.1335	RStudio, Boston, Massachusetts, USA ¹⁰⁸	Lipidomic Screen
Metab	Raphael Aggio et al. ¹⁰⁹	Lipidomic Screen
MaxQuant 1.5.3.8	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland	Proteomic Screen
Uniprot MOUSE.fasta (Stand 16.6.2017)	UniProt Consortium	Proteomic Screen
Perseus 1.6.1.1	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland	Proteomic Screen
FunRich 3.1.3	Pathan et al. ¹¹⁰	Proteomic Screen
STRING Database 11.0	https://string-db.org/ ¹¹¹	Proteomic Screen
UniProt	https://www.uniprot.org/ ¹¹²	Proteomic Screen

GraphPad Prism 8	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA	Statistische Auswertung
Microsoft Excel	Microsoft, München, Deutschland	allgemeine Arbeiten

3.7 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle Tierversuche fanden an weiblichen Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6N (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) statt. Sämtliche Abläufe erfolgten gemäß den Richtlinien des Tierhaltungsnetzwerks der Universität zu Köln, die Versuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt (Aktenzeichen 84-02.04.2016.A046).

Die Tierhaltung fand in den Tierställen des dezentralen Tierhaltungsnetzwerks in der Pharmakologie der Uniklinik Köln bei 22 °C, unter 50 % Luftfeuchtigkeit und einem täglichen Zyklus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit statt. Die Mäuse wurden in Gruppen von 2 - 5 Tieren gehalten. Nach dem Absetzen im Alter von drei Wochen erhielten sie entweder eine normokalorische Standard-Diät (SD; R/M-H, ssniff, Soest, Deutschland) oder eine Hochfett-Diät (HFD; C1057 modified, Altromin, Lage, Deutschland) mit einem hohen Anteil gesättigter Fettsäuren. Bei der Standard-Diät stammen 9 % der metabolisierbaren Energie aus Fett, während dieser Anteil bei der Hochfett-Diät 60 % beträgt. Futter und Trinkwasser waren jederzeit frei verfügbar. Die jeweilige Diät wurde konstant, auch während der anschließenden Verpaarung und Tragezeit, verabreicht.

Nach der Verpaarung (s. Kapitel 3.7.1) erhielt ein Teil der SD-Gruppe und der HFD-Gruppe zusätzlich das Medikament Metformin (s. Kapitel 3.7.2). So ergeben sich insgesamt vier verschiedene Versuchsgruppen: SD, HFD, SD+MF (Standard-Diät plus Metformin) und HFD+MF (Hochfett-Diät plus Metformin). Dabei dienen SD und HFD als Vergleichsgruppe für die dazugehörige Metformin-behandelte Gruppe, ebenso stellt die SD-Gruppe eine Kontrollgruppe für die HFD dar.

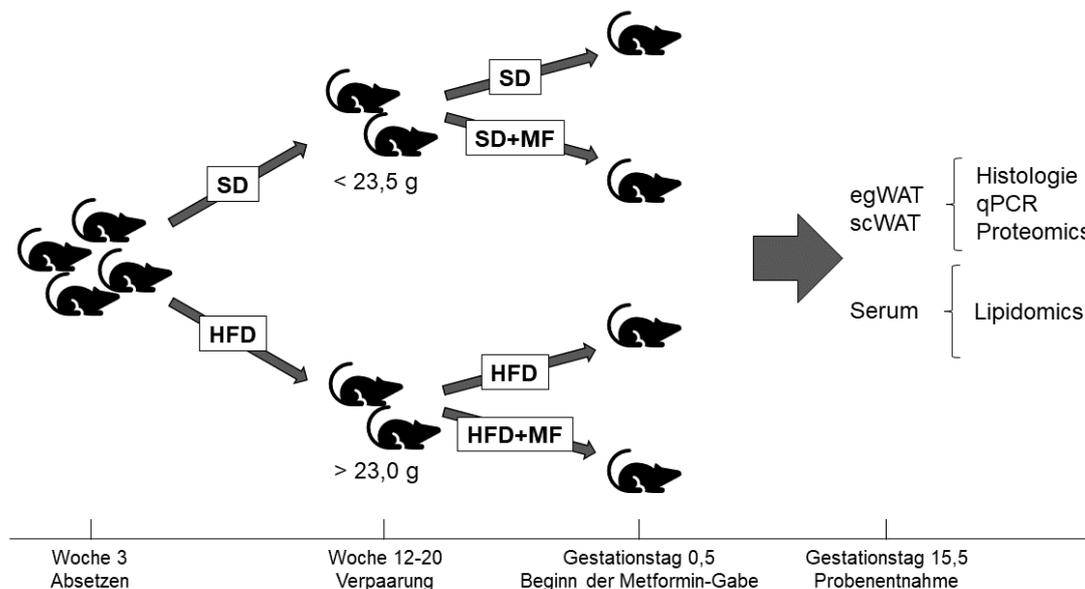


Abb. 1: Schema der Versuchsgruppen

Zwei Gruppen erhielten nach dem Absetzen zunächst eine Standard-Diät (SD) oder Hochfett-Diät (HFD). Ab der Verpaarung im Alter von 12 - 20 Wochen wurde zwei Teilgruppen (SD+MF, HFD+MF) zudem Metformin über das Trinkwasser verabreicht. An G15,5 wurden die Versuchstiere euthanasiert und u. a. eine scWAT-Probe, das egWAT und Serum entnommen.

3.7.1 Verpaarung

Im Alter von 12 - 20 Wochen wurden die Mäuse über Nacht (ca. 20 h) verpaart und der Folgetag wurde als Gestationstag G0,5 definiert. Die Tiere der HFD-Gruppe mussten zu diesem Zeitpunkt ein Mindestgewicht von 23,0 g aufweisen, die Tiere der SD-Gruppe mussten hingegen weniger als 23,5 g wiegen.

3.7.2 Metformin-Intervention

Die Mäuse der beiden Metformin-behandelten Gruppen (SD+MF, HFD+MF) erhielten das Medikament ab der Trennung nach Verpaarung (G0,5) über ihr Trinkwasser. Verwendet wurde 1,1-Dimethylbiguanid Hydrochlorid des Herstellers Alfa Aesar (Kandel, Deutschland). Die Metformindosierung sollte sich an der Menge orientieren, die auch Schwangere zu sich nehmen. Diese liegt bei durchschnittlich 31 mg/kgKG/Tag (nach Angaben von Kooperationspartnerin Prof. Dr. Angela Königer, Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Uniklinik Regensburg) und entspricht bei der Maus umgerechnet 380 mg/kgKG/Tag nach der „human equivalent dose“ (HED)¹¹³. Zur korrekten Dosierung musste im Vorfeld die Trinkmenge der Mäuse durch tägliches Wiegen der Trinkflaschen bestimmt werden. Die Flaschen wurden speziell angefertigt, um Heraustropfen des Wassers und daraus resultierende Messungenauigkeiten zu vermeiden. Entsprechend konnte dann die nötige Metformindosierung im Trinkwasser ermittelt werden, um die tägliche Zieldosis von 380 mg/kgKG/Tag zu erreichen. Die Trinkflaschen wurden wöchentlich ausgetauscht. Damit eine artgerechte Haltung gewährleistet war, wurden die Metformin-behandelten Tiere in Zweier-

bzw. Dreiergruppen gehalten, die erhobenen Daten zur Wasseraufnahme wurden folglich pro Tierkäfig gemittelt.

3.7.3 Präparation, Probenentnahme und -aufbewahrung

An Gestationstag 15,5 (G15,5), der in etwa der Mitte des letzten Drittels der Tragezeit der Maus entspricht, wurde den Versuchstieren intraperitoneal 0,1 mg/kgKG Buprenorphin in 0,9 % NaCl-Lösung appliziert (Buprenovet 0,3 mg/ml Injektionslösung, Bayer, Leverkusen, Deutschland). Nach 30 min wurden die Tiere anschließend mittels CO₂-Inhalation euthanasiert. Postmortal wurde aus dem Herz Vollblut abgenommen. Außerdem wurde unter anderem das epigonadale Fettgewebe (egWAT, den Uterus umgebendes viszerales Fettgewebe) sowie eine Probe des subkutanen Fettgewebes (scWAT) entnommen. Ein Teil des Fettgewebes wurde für die histologische Analyse in Roti®-Histofix (4 %) fixiert, der Rest wurde auf flüssigem Stickstoff gefroren und später bei -80 °C gelagert, um es zur RNA-Isolation bzw. zur Proteinanalyse verwenden zu können. Das Blut wurde nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf Eis gegeben, anschließend 10 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert und das so gewonnene Serum ebenfalls bei -80 °C eingefroren.

3.7.4 Erhebung der phänotypischen Daten

Die Mäuse wurden am Tag der Verpaarung (G0) und am Tag der Probenentnahme (G15,5) gewogen. Außerdem wurde bei der Präparation die Körperlänge bestimmt und auch das entnommene egWAT gewogen.

3.8 Quantifizierung von Metformin

Die Metforminkonzentration im Serum und im Trinkwasser wurde mittels LC-MS/MS (Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung) gemessen. Alle hier beschriebenen Arbeiten wurden durch die MitarbeiterInnen der AG Gründemann des Zentrums für Pharmakologie der Uniklinik Köln erbracht.

Mehreren Behältern mit Leitungswasser wurde Metformin in einer Konzentration von 3,13 ng/ml zugegeben und sieben Tage bei RT stehen gelassen, um dessen Stabilität im Trinkwasser unter den Versuchsbedingungen zu bestimmen. An den Tagen 0, 1, 2, 4, 5 und 7 wurden aus den Behältern beispielhafte Proben entnommen und zwischenzeitlich eingefroren. Im Anschluss wurden stets die Metforminkonzentrationen zweier Proben eines Behälters getrennt gemessen, um Messungenauigkeiten zu verringern. Die Trinkwasserproben wurden unverdünnt für die LC-MS/MS verwendet, während die Serumproben der Versuchstiere vorher 1:100 mit Acetonitril verdünnt wurden. Jeweils 10 µl einer Probe wurden mithilfe eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers (4000 QTRAP, AB SCIEX) analysiert, dabei wurde eine Atmosphärendruckionisation mit positivem Elektrospray verwendet. Die LC (SLC-20AD

Prominence HPLC, Shimadzu) wurde mit einer SeQuant® ZIC®-HILIC-Säule (Dichrom) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Lösungsmittel	Puffer A (10 mM Ammoniumformiat, pH-Wert 3,75), Puffer B (Acetonitril), Gradientenfluss 0,2 ml/min, 80 % Puffer B bei 0 min, 20 % Puffer B bei 2 min, 20 % Puffer B bei 4 min, 80 % Puffer B bei 6 min, Stopp bei 8 min
selektierte Reaktionsüberwachung	130 m/z parent; 71 m/z fragment für Serumproben; 60 sowie 71 m/z fragment für Trinkwasserproben; 29 V Kollisionsenergie

Anschließend wurden die Peakflächen für jeden Analyten durch Integrieren der Intensität über dem Hintergrundrauschen gegenüber der Zeit im korrekten Elutionszeitintervall bestimmt. Die den Peakflächen entsprechenden Metforminkonzentrationen wurden dann durch Vergleich mit einer Eichreihe ermittelt. Diese bestand für die Trinkwasserproben aus Leitungswasser mit zugesetztem Metformin (0 - 100 ng/ml) und für die Serumproben aus verdünntem Serum (1:100 mit Acetonitril) mit zugesetztem Metformin (0 - 50 ng/ml).

3.9 Histologische Methoden

3.9.1 Einbetten und Schneiden

Nach dem Fixieren des Fettgewebes für 24 h in Roti®-Histofix (4 %) wurde es für mindestens 16 h in 70 % Isopropanol gegeben. Die anschließende Einbettung erfolgte im Gewebeeinfiltrationsautomaten (ASP300S), der Gewebe vollautomatisch entwässert und mit Paraffin infiltriert. Danach wurde es manuell in der Paraffinausgießstation (EG1150 H) in Paraffin-Blöcke gegossen.

Am Rotationsmikrotom (RM2255) wurden schließlich 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die nach kurzem Aufschwimmen im Warmwasserbad auf Objektträger aufgezogen wurden. Dabei wurden je nach Größe des Paraffinblocks zwei bis vier aufeinanderfolgende Schnitte auf jeden Objektträger übertragen, sofern zwischendurch keine beschädigten oder gestauchten Schnitte verworfen werden mussten. Bei diesem Arbeitsschritt wurden die Objektträger durch Zuordnung einer Nummer verblindet. Um die Qualität der Schnitte zu erhöhen, wurden die Präparate vorher über Nacht bei -20 °C im Kühlschrank gelagert und während des Schneidens immer wieder auf eine Kühlplatte (-5 °C) gelegt. Damit ein Gewebestück möglichst repräsentativ mithilfe der Schnitte erfasst werden konnte, wurden zwischen den einzelnen Objektträgern stets mehrere Schnitte verworfen, sodass insgesamt mindestens fünf auseinanderliegende Bereiche (je ein Bereich pro Objektträger) pro Präparat abgebildet

wurden. Die fertigen Objektträger wurden dann für mindestens 24 h bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet.

3.9.2 HE-Färbung

Alle Präparate wurden mittels HE-Färbung angefärbt, diese basiert auf den beiden Farbstoffen Hämatoxylin und Eosin. Dafür wurden die Schnitte dreimal für jeweils 20 min mittels Neo-Clear® entparaffiniert und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % EtOH, 96 % EtOH, 80 % EtOH, 70% EtOH, jeweils 1 min) und 1 min in VE-Wasser (vollentsalztes Wasser) rehydratisiert. Anschließend folgte die Färbung in Hämalaunlösung für 4 - 4,5 min. Nach einem kurzen Bad in VE-Wasser wurden die Schnitte für 5 min in Leitungswasser durch eine pH-Wert-Verschiebung gebläut, erneut kurz in VE-Wasser gegeben und dann für 2 min mit Eosin (plus einem Tropfen Essigsäure in 100 ml) gefärbt. Bei zwei weiteren kurzen Bädern in VE-Wasser wurden die Rückstände der Färbelösungen abgewaschen. Schließlich wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % EtOH, 80 % EtOH, 96 % EtOH, 100 % EtOH, jeweils 1 min) dehydratisiert und innerhalb von zweimal 5 min in Neo-Clear® wieder ins nicht-wasserlösliche Milieu überführt. Abschließend wurden einige Tropfen Neo-Mount® auf die Objektträger gegeben und die gefärbten Präparate mit Deckgläsern eingedeckt.

3.9.3 Auswertung der Fettzellgröße

Pro Gewebepreparat wurden fünf der gefärbten Schnitte digitalisiert und mithilfe einer Software in Bilder definierter Größe zerschnitten (s. Kapitel 3.9.3.1 und 3.9.3.2). Zu diesem Zweck wurden fünf Schnitte von unterschiedlichen Objektträgern ausgewählt, sodass stets fünf auseinanderliegende Bereiche eines Präparats zur weiteren Auswertung verwendet wurden. Daraus wiederum wurden zufällig fünf Bilder (jeweils ein Bild aus jedem der gescannten Schnitte) für die automatische Analyse im „ImageJ Fiji“-Plugin „Adiposoft“ ausgewählt. Hier wurden die Fettzellen automatisch markiert und deren Fläche und Durchmesser gemessen (s. Kapitel 3.9.3.3). Anschließend wurden die durchschnittliche Fläche und der Durchmesser der Fettzellen in den fünf ausgewerteten Bildern pro Gewebepreparat berechnet (s. Kapitel 3.9.3.4).

3.9.3.1 Digitalisierung im Slide Scanner

Für die Auswertung der Fettzellgröße sollten jeweils fünf Bildausschnitte pro Gewebepreparat (scWAT bzw. egWAT) ausgezählt werden. Zunächst wurden dafür pro Präparat fünf Schnitte von fünf verschiedenen Objektträgern in 40facher Vergrößerung aufgenommen, dazu wurde der Slide Scanner (Leica SCN400) der Imaging Facility des CECAD Cologne genutzt. Durch diese Auswahl der Schnitte wurde sichergestellt, dass fünf Querschnitte aus unterschiedlichen Bereichen des Gewebes zur weiteren Analyse verwendet wurden.

3.9.3.2 Zerschneiden in definierte Bilder

Um einen zufällig ausgewählten Bildausschnitt von jedem der auszuwertenden Schnitte zu erhalten, wurde die Bildanalyse-Software „QuPath“ genutzt. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Peter Zentis aus der CECAD Imaging Facility, der die notwendigen Skripte für die technische Umsetzung schrieb. Mithilfe der Software wurde das Gewebe umrandet und dann in Bilder einer Größe von 1200 mal 1200 Pixel zerschnitten (Abb. 2). Auf diese Weise erhielt man zu jedem Gewebeschnitt eine zugehörige Bilderkollektion mit den entstandenen Bildern. Bei der Wahl der Bildgröße wurde sich an dem Ausschnitt orientiert, der auch beim Blick durch ein Lichtmikroskop in 40facher Vergrößerung zu sehen ist.

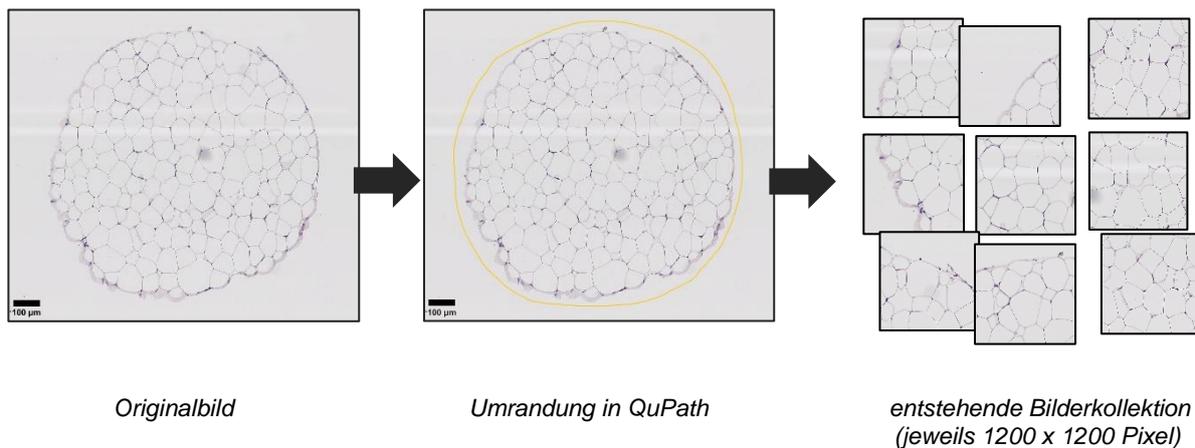


Abb. 2: Zerschneiden der gescannten histologischen Schnitte in QuPath

Es wurden 5 µm dicke Schnitte des Fettgewebes angefertigt, HE-gefärbt und in 40facher Vergrößerung digitalisiert. Beispielhaft gezeigt ist, wie ein egWAT-Gewebeausschnitt der HFD-Gruppe mithilfe der Software QuPath markiert und in Bilder mit 1200 Pixel Kantenlänge zerschnitten wird. Größenbalken 100 µm.

3.9.3.3 Analyse in „Adiposoft“

Aus jeder Kollektion wurde anschließend zufällig mithilfe der Internetseite „random.org“ ein Bild ausgewählt, das folgenden drei Kriterien entsprach: Kantenlänge von 1200 Pixel, das Bild wird komplett von Präparat bedeckt, es enthält mindestens drei auswertbare Fettzellen (laut der Software „Adiposoft“, notwendige Kriterien s. u.). Die Mindestanzahl von drei Zellen ergab sich nach dem Durchsehen von Bildern mit den größten erfassten Fettzellen, sodass diese von den Kriterien noch miteingeschlossen wurden (s. Kapitel 4.3.1, Abb. 8).

Das Zählen und Ausmessen der Fettzellen wurde mithilfe der Bildanalyse-Software „ImageJ Fiji“ und dem dazugehörigen Plugin „Adiposoft“ durchgeführt, das Fettzellen in histologischen Schnitten automatisch markieren, zählen und ausmessen kann. Es wurde bereits eine hohe Korrelation von manuellem Ausmessen und den Adiposoft-Ergebnissen gezeigt, bei insgesamt erheblich reduziertem Zeitaufwand¹⁰⁶.

Zur Analyse benötigt Adiposoft folgende Angaben: räumliche Auflösung der eingespeisten Bilder, Minstdurchmesser und Maximaldurchmesser einer Fettzelle. Die Auflösung betrug 0,25 µm/Pixel, der minimale (10 µm) und maximale Durchmesser (140 µm) wurden auf

Grundlage einer beispielhaften Analyse von Bildern mit sehr kleinen sowie sehr großen erfassten Fettzellen festgelegt (s. Kapitel 4.3.1). Adiposoft wurde im Einzelbild-Modus ausgeführt, alle angeschnittenen Fettzellen am Rand eines Bildes wurden automatisch ausgeschlossen. Anschließend wurde die daraus resultierende automatische Markierung der Fettzellen in jedem Bild manuell überprüft und Zell-Markierungen gelöscht, die augenscheinlich eines der folgenden Kriterien erfüllten: Markierung enthält keine Zelle, Zellgrenzen sind nicht klar erkennbar bzw. rekonstruierbar, Markierung unterteilt eine Zelle in mehrere Teile oder verbindet mehrere Zellen zu einer, Markierung weicht deutlich von den eigentlichen Zellgrenzen ab. Auf das manuelle Hinzufügen von Markierungen wurde verzichtet, um den Einfluss auf das erzielte Ergebnis möglichst geringzuhalten. Schließlich wurden Fläche und Durchmesser jeder Markierung in Form einer Tabelle ausgegeben. Erst nach der Auswertung in Adiposoft wurde die Verblindung aufgehoben, sodass alle Bilder in gleicher Weise behandelt wurden.

3.9.3.4 Berechnen der mittleren Fläche und des mittleren Durchmessers

Die mittlere Fläche und der mittlere Durchmesser der Fettzellen eines Gewebepreparats wurden wie folgt berechnet: Die Mittelwerte der fünf einzelnen Bilder wurden mit der jeweils erfassten Zellzahl multipliziert, diese fünf resultierenden Werte summiert und durch die Gesamtzellzahl aller Bilder geteilt.

$$\bar{x}_{\text{gesamt}} = \frac{(\bar{x}_{\text{Bild1}} \times Z_{\text{Bild1}}) + (\bar{x}_{\text{Bild2}} \times Z_{\text{Bild2}}) + (\bar{x}_{\text{Bild3}} \times Z_{\text{Bild3}}) + (\bar{x}_{\text{Bild4}} \times Z_{\text{Bild4}}) + (\bar{x}_{\text{Bild5}} \times Z_{\text{Bild5}})}{Z_{\text{gesamt}}}$$

\bar{x}_{gesamt} : mittlere Fläche bzw. mittlerer Durchmesser der Fettzellen eines Präparats,

\bar{x}_{Bild} : mittlere Fläche bzw. mittlerer Durchmesser der Fettzellen eines Bildes,

Z_{Bild} : erfasste Zellzahl eines Bildes,

Z_{gesamt} : gesamte erfasste Zellzahl aller 5 Bilder eines Präparats.

3.10 Fettgewebsquantifizierung mittels μ CT (Mikro-Computertomographie)

Dem „3R-Prinzip“ des Tierschutzes folgend, wurde der Adipositas-induzierende Effekt der HFD an den Mäusen untersucht, die während des Versuchs nicht tragend wurden. Nach der erfolglosen Verpaarung erhielten die nichttragenden SD+MF- und HFD+MF-Gruppen ebenso wie die tragenden Tiere das Medikament Metformin über ihr Trinkwasser (s. Kapitel 3.7.2). Die nichttragenden SD- und HFD-Gruppen erhielten weiterhin lediglich ihre jeweilige Diät. Nach 15 Tagen wurden die Tiere aller vier Gruppen durch zervikale Dislokation euthanasiert und für die nachfolgenden Untersuchungen bei -80 °C eingefroren. Die ganzen Mäuse wurden anschließend in einem μ CT-Scanner (SkyScan 1176) mit folgenden Einstellungen gescannt:

Voxelgröße	35,26 μm^3
Röntgeneinstellungen	45 kV, 475 μA mit 0,5 mm Aluminiumfilter
Rotation	360° mit 0,6°-Rotationsschritten und einer Bildmittelung von 2

Mithilfe der herstellereigenen Software „NRecon“, „CTAn“ und „CTVox“ wurden die Bilder im Anschluss rekonstruiert, analysiert und visualisiert. Um das Gesamtvolumen des Mäusekörpers und das Fettvolumen zu bestimmen, wurden die resultierenden Bilder anhand der Gewebedichte segmentiert. Das viszerale wurde vom subkutanen Fettgewebe abgegrenzt, indem bei der Segmentierung die Bauchmuskelwand als Orientierung genutzt wurde. Es wurden das Gesamtfettvolumen und das viszerale Fettvolumen bezogen auf das Körpervolumen (abzüglich des Lungenvolumens) der Mäuse berechnet. Die hier beschriebene Durchführung der Scans sowie die Analyse und Berechnung der Fettvolumina wurde durch die MitarbeiterInnen der Phenotyping Core Facility des Max-Planck-Instituts für Biologie des Alterns erbracht.

3.11 Molekularbiologische Methoden

3.11.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde das native, bei -80 °C gelagerte Fettgewebe (scWAT und egWAT) verwendet. Dazu wurde jeweils ein kleines Gewebestück (ca. 150 mg) mit 1,5 ml TRI-Reagent® versetzt. Dann wurden die Proben mit Zugabe einer sterilen Metallkugel in einer Schwingmühle (MM 400) für dreimal 30 s bei 30 Hertz homogenisiert. Dieser Vorgang wurde bis zu weitere fünf Mal wiederholt, wenn sich das Gewebestück nicht ausreichend zerkleinerte. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden jeweils 300 μl Chloroform hinzugegeben, 15 s intensiv gemischt und weitere 3 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Proben bei 13.680 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Es zeigte sich eine Phasentrennung in eine obere wässrige Phase mit gelöster RNA, eine DNA-haltige Zwischenphase und eine untere organische Phase mit enthaltenen Proteinen. Die obere Phase mit der RNA wurde abpipettiert und in einem neuen Gefäß mit 750 μl Isopropanol erneut gemischt. Anschließend wurde die RNA durch eine 20-minütige Inkubation auf Eis ausgefällt und erneut für 15 min bei 21.380 g und 4 °C zentrifugiert. Das Isopropanol wurde abpipettiert und das zurückbleibende RNA-Pellet zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 21.380 g und 4 °C zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in DEPC-H₂O (RNase-freiem Wasser) gelöst. Sofern die RNA nicht sofort weiterverwendet wurde, wurde sie bei -80 °C gelagert.

3.11.1.1 Bestimmung der Qualität und Quantität der RNA

Um die Reinheit der RNA spektralphotometrisch zu bestimmen und deren Konzentration für die spätere cDNA-Synthese zu ermitteln, wurde ein Mikrotiterplattenleser (NanoQuant infinite M200 Pro) mit der dazugehörigen Software „i-control“ verwendet. Durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm Wellenlänge, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, kann die RNA-Konzentration errechnet werden, dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 etwa 40 µg/ml einzelsträngiger RNA¹¹⁴. Zugleich wurde auch die OD bei 280 nm bestimmt, welche dem Absorptionsmaximum von Protein entspricht. Durch Bildung des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ aus beiden Werten kann auf die Reinheit der RNA geschlossen werden¹¹⁴. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 zeugt von einer reinen RNA-Lösung¹¹⁴, kleinere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Phenol oder Proteinen hin¹¹⁵.

3.11.2 Umschreibung in cDNA

Für die folgende qPCR musste die isolierte RNA zunächst in doppelsträngige cDNA umgeschrieben werden. Bei einem vorherigen qPCR-Testlauf erzielte eine RNA-Ausgangsmenge von 0,5 µg pro cDNA-Ansatz in insgesamt 8 µl H₂O die besten Ergebnisse (gegenüber 1 µg und 0,33 µg), sodass diese RNA-Menge als Standard festgelegt wurde. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich stets auf einen einzelnen cDNA-Ansatz. Zuerst wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um eventuelle Kontaminationen der RNA mit gDNA zu entfernen. Dazu wurden die Proben mit 1 µl DNase (RQ1 RNase-Free DNase) und 1 µl zugehörigem Puffer (RQ1 DNase 10X Reaction Buffer) für 15 min bei RT inkubiert und die Reaktion anschließend mit 1 µl Stop-Solution und 15-minütiger Inkubation bei 65 °C gestoppt. Im zweiten Schritt folgte die Zugabe der notwendigen Primer als Ansatzpunkte für die DNA-Polymerase, die für die reverse Transkription der RNA zu cDNA sorgt. Es wurden 0,4 µl Oligo-dT-Primer, 0,6 µl Random-Primer und 4 µl DEPC-H₂O hinzugefügt. Die Oligo-dT-Primer binden spezifisch an die Poly(A)-Schwänze am 3'-Ende der mRNA, während die Random-Primer in einer Vielzahl möglicher Kombinationen aus DNA-Basen vorhanden sind und so an vielen verschiedenen Stellen der RNA binden können. Alles zusammen wurde für 5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Im letzten Schritt erfolgte die reverse Transkription mithilfe der DNA-Polymerase „M-MLV RT“ (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) für 1 h bei 37 °C. Dafür wurden 1 µl M-MLV RT, 1 µl des zugehörigen Puffers (M-MLV RT 5X Buffer), 1,25 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP Mix), 0,5 µl RNase-Inhibitoren (RNasin® Ribonuclease Inhibitors) und 2,25 µl DEPC-H₂O hinzugefügt. Insgesamt wurden fünf cDNA-Ansätze jeder Probe hergestellt, die gewonnene cDNA wurde im Anschluss bei -20 °C gelagert.

3.11.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Quantifizierung der cDNA wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR) mithilfe eines Thermozyklers (7500 Real Time PCR System Thermocycler) und der dazugehörigen Software „7500 Software 2.0.6“ durchgeführt.

3.11.3.1 Prinzip der RT-qPCR

Bei der PCR werden definierte DNA-Abschnitte vervielfältigt. Diese Zielsequenzen werden durch entsprechende Auswahl der Primer festgelegt, die spezifisch am 3'- und 5'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs der DNA binden. Im ersten Schritt eines PCR-Zyklus werden die DNA-Doppelstränge denaturiert, dann erfolgt die spezifische Anlagerung der Primer und schließlich die Amplifikation durch eine DNA-Polymerase. Dieser Vorgang wird bis zu fünfzigmal wiederholt. Anfangs ist eine geringe DNA-Menge vorhanden, die dann exponentiell vervielfältigt wird, bis eine Plateau-Phase erreicht wird. Bei der RT-qPCR wird zusätzlich die amplifizierte DNA in Echtzeit gemessen.

In diesem Fall wurde das Taqman-Verfahren zur Fluoreszenz-gestützten Quantifizierung genutzt. Es basiert auf Hydrolisierungs-Primern (Taqman-Sonden), die innerhalb der Zielsequenz mit der DNA hybridisieren. Sie bestehen aus einer Nukleotidsequenz mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen: Einem Reporter-Farbstoff an einem Ende und einem sogenannten Quencher am anderen. Im Normalzustand unterdrückt dabei der Quencher die vom Reporter ausgehende Emission. Während der DNA-Elongation wird die Taqman-Sonde jedoch durch die Polymerase abgebaut, sodass der Reporter freigesetzt wird. Durch die resultierende räumliche Entfernung und entsprechend fehlende Unterdrückung durch den Quencher, steigt die Fluoreszenz-Emission des Reporters an. Diese Fluoreszenz wird während der PCR gemessen und ist proportional zu der Menge der amplifizierten DNA, auf diese Weise kann die Quantität der Zielsequenz bestimmt werden¹¹⁶. In dieser Arbeit wurde TAMRA als Quencher- und FAM als Reporter-Farbstoff eingesetzt.

PCR-Bedingungen:	2 min	50 °C	} für 50 Zyklen
	10 min	95 °C	
	15 s	95 °C	
	1 min	60 °C	

3.11.3.2 Vorbereitung und Ziel-Gene

Zuerst wurden pro qPCR-Ansatz 12,5 µl qPCR-SuperMix (Platinum® qPCR SuperMix-UDG mit ROX) und jeweils 0,5 µl der drei Zielgen-Primer (2 µmol/l taq-Primer, 6 µmol/l for- und rev-Primer) mit 8,5 µl HPLC-H₂O gemischt. Anschließend wurde ein Ansatz (22,5 µl) pro Vertiefung auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und jeweils 2,5 µl cDNA dazugegeben. Die Negativprobe erhielt HPLC-H₂O statt der cDNA. Dann wurde die Platte mit einer Folie versiegelt und für 3 min bei 338 g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Folgende Ziel-Gene wurden mittels RT-qPCR gemessen: IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , CXCL1, CXCL10, CYB-A, CYB-B, NCF1, NCF2, NOX4, SOD1, GPX1 und CAT. Als Housekeeping-Gene wurden β -Actin, 18S, HPRT, GUSB und GAPDH getestet, die in der Literatur als besonders geeignet für Fettgewebe gelten¹¹⁷. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer sind Tabelle 4 zu entnehmen.

3.11.3.3 Auswertung

Die anschließende Auswertung erfolgte mithilfe der „ $\Delta\Delta$ CT-Methode“¹¹⁸ im Tabellenkalkulationsprogramm „Microsoft Excel“. Sie nutzt den CT-Wert (Threshold Cycle = „Schwellenwert-Zyklus“) zum Vergleich der unterschiedlichen Genexpressionslevel. Dieser bezeichnet den Zyklus, in dem die gemessene Fluoreszenz zum ersten Mal die unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz signifikant übersteigt, und liegt in der exponentiellen Phase der DNA-Vervielfältigung. Zusätzlich wird zum Vergleich ein Housekeeping-Gen als Referenz genutzt. Dazu wird dessen Expressionsniveau ebenfalls mittels RT-qPCR quantifiziert, um anschließend das Expressionslevel des Ziel-Gens auf das des Housekeeping-Gens zu normalisieren. Somit kann dessen relatives mRNA-Expressionslevel im Vergleich zum Housekeeping-Gen ermittelt werden. Um die Auswirkungen der HFD-Fütterung und der Metformingabe darzustellen, wurden die resultierenden relativen mRNA-Expressionslevel dieser Gruppen (HFD, SD+MF bzw. HFD+MF) in Relation zur jeweiligen Vergleichsgruppe (SD bzw. HFD) berechnet, deren Expressionslevel dabei stets auf 1 gesetzt wurde.

3.12 Proteinanalytische Methoden (Proteomic Screen)

Alle in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten richteten sich nach den Protokollen der CECAD Proteomics Facility¹¹⁹.

3.12.1 Proteinisolation

Die Proteinisolation erfolgte aus dem nativen, bei -80 °C gelagerten egWAT. Hierzu wurde zu jedem kleinen Gewebestück 200 μ l modifizierter RIPA-Puffer (s. Tabelle 2; beinhaltet TRIS-Hydrochlorid, NaCl, IGEPAL®, Desoxycholsäure Natriumsalz, EDTA, Aprotinin, Pepstatin A, Leupeptin, PMSF, NaF und Na₃VO₄) gegeben, um es zu lysieren. Mithilfe von Mikro-Homogenisatoren wurde das Gewebe zerstoßen und anschließend für dreimal 20 s bei 50 % Energie sonifiziert (SONOPULS® HD 2070). Waren dann noch größere Gewebestücke vorhanden, wurde dieser Vorgang wiederholt. Im Anschluss wurden die Proben für 1 h auf Eis inkubiert und dann für 5 min bei 16.100 g und 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurde der proteinhaltige Überstand in ein neues Gefäß überführt. Dann folgte die Ausfällung der Proteine mittels eiskaltem Aceton (-20 °C), dafür wurde jeder Probe das Vierfache ihres eigenen Volumens zugegeben. Dann wurden die Proben 15 min bei -80 °C, dann 90 min bei -20 °C inkubiert und für 15 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das

zurückbleibende Protein-Pellet zweimal mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen (jeweils 5 min Zentrifugation bei 16.000 g bei 4 °C). Zum Schluss wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 200 µl Urea-Puffer (8 M) resuspendiert.

3.12.2 Proteinverdau

Die Proteine wurden durch Proteasen in eine definierte Anzahl von Peptiden charakteristischer Masse gespalten, die dann zur massenspektrometrischen Bestimmung des ursprünglichen Proteins verwendet werden konnten.

Dazu wurden im ersten Schritt 100 µl Urea-Puffer (8 M Urea, 50 mM TEAB) und 2 µl Protease-Inhibitoren (50fach konzentriert) zu jeder Probe hinzugefügt. Dadurch wurden die Proteine in Lösung gebracht, denaturiert und deren Abbau verhindert. Anschließend wurden sie für 10 min in einen Bioruptor® (Zyklus von 30 s an / 30 s Pause) gegeben, um das Chromatin aufzutrennen. Einige Proben wiesen zu diesem Zeitpunkt ein noch ungelöstes Pellet auf und wurden deshalb nach Zugabe von weiteren 100 µl Urea-Puffer sowie 2 µl Protease-Inhibitoren für 30 s sonifiziert (SONOPULS® HD 2070). Anschließend wurden alle Proben für 15 min bei 20.000 g zentrifugiert und deren Proteinkonzentration mithilfe eines Mikrotiterplatten-Photometers (Multiskan FC) bestimmt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden von jeder Probe 50 µg Protein in ein neues Gefäß überführt und mit Urea-Puffer (8 M Urea, 50 mM TEAB) auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Im nächsten Schritt erfolgte die Reduzierung. Dafür wurde Dithiothreitol (Endkonzentration 5 mM) hinzugegeben, gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Dieses reduzierte eventuelle Disulfidbrücken zwischen Aminosäureresten der Proteine. Zur Alkylierung der resultierenden Thiolreste wurde Chloracetamid (Endkonzentration 40 mM) zugefügt, erneut gemischt und für 30 min bei RT im Dunklen inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte der Proteinverdau mithilfe von Proteasen. Zuerst wurde Lys-C (Enzym-Substrat-Verhältnis 1:75) hinzugegeben, gefolgt von einer 4-stündigen Inkubation bei 37 °C. Dann wurden die Proben durch Zugabe von 300 µl 50 mM TEAB auf eine Urea-Konzentration unter 2 M verdünnt, um eine optimale Aktivität der zweiten Protease zu gewährleisten. Schließlich wurde Trypsin (Enzym-Substrat-Verhältnis 1:75) zugefügt und dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Enzymaktivität durch Ansäuern mit 10-prozentiger Ameisensäure (Endkonzentration 1 % des Probenvolumens) gestoppt.

3.12.3 Beladung der StageTips mit Protein

Für die nachfolgende massenspektrometrische Bestimmung wurden die Proteine auf sogenannte StageTips (stop-and-go-extraction tips) übertragen. Diese sind gewöhnliche Pipettenspitzen, in die eine Lage SDB (Poly-Styren-Divinylbenzen-Copolymer) und eine darüber liegende Lage C₁₈-Umkehrphasematerial eingebracht wurden. Beide sorgen für eine Fraktionierung der übertragenen Proteine, das Umkehrphasematerial besitzt zusätzlich eine entsalzende Funktion.

Zunächst wurden die StageTips äquilibriert. Dazu wurden nacheinander Methanol und verschiedene Puffer (Puffer A: 0,1 % Ameisensäure in H₂O, Puffer B: 0,1 % Ameisensäure in 80 % Acetonitril) hineingegeben und anschließend zentrifugiert, damit diese Reagenzien die zwei Material-Lagen durchdringen. Die austretende Flüssigkeit wurde in einem Auffanggefäß, in das jede Spitze gestellt wurde, gesammelt und stets verworfen. Folgende Schritte wurden dabei durchlaufen:

Zugabe von:	Zentrifugation (600 g)
20 µl Methanol	1 min
20 µl Puffer B	1 min
20 µl Puffer A	1,5 min
20 µl Puffer A	2 min

Nach diesem Prozedere sollte das Umkehrphasematerial noch von einer 1-2 mm dicken Schicht des Puffers A bedeckt sein. Bei einer größeren verbliebenen Menge wurde die Zentrifugation dieses StageTips wiederholt. Im nächsten Schritt erfolgte die Beladung mit den Proteinproben. Die Proben wurden dazu 5 min bei 16.100 g zentrifugiert und dann in die StageTips gegeben, die im Anschluss ebenfalls für 5 min bei 600 g zentrifugiert wurden. Dies sorgte für die Übertragung der Proteine auf das Umkehrphase- und SDB-Material in den StageTips. Danach wurden sie mit 30 µl Puffer A und anschließender Zentrifugation für 3 min bei 600 g gewaschen, dieser Vorgang wurde weitere zweimal mit Puffer B wiederholt. Zum Schluss wurden die StageTips getrocknet, indem Luft mithilfe einer Spritze hindurchgedrückt wurde. Bis zur Messung wurden sie dann bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.12.4 LC-MS (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden durch die CECAD Proteomics Facility erbracht. Es wurde eine LC-MS (Q Exactive Plus Orbitrap gekoppelt an EASY-nLC 1000, Thermo Scientific) durchgeführt, um die in den Proben enthaltenen Peptide zu detektieren. Alle Proben wurden mittels Puffer A auf die gepackte Analysensäule geladen (50 cm - 75 µm I.D., gefüllt mit 2,7 µm Poroshell 120 EC-C18, Agilent). Hier wurden die Peptide chromatographisch aufgetrennt, indem sie von dem anschließend hinzugegebenen Lösungsmittel (mobile Phase, Puffer B) durch die Säule (stationäre Phase) getragen wurden. Dabei laufen die Peptide aufgrund ihrer unterschiedlichen Wechselwirkungen mit der stationären Phase unterschiedlich schnell, sodass eine Auftrennung entsteht. Die zehn häufigsten Peptide wurden innerhalb eines 2,1-Th-Fensters isoliert (MS1 Scan) und einer HCD-Fragmentierung bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 27 % unterzogen. Die so entstehenden Ionen wurden im Orbitrap mit einer Auflösung von 17.500 detektiert (MS2 Scan). Vorläufer wurden für 25 s dynamisch ausgeschlossen.

LC-MS-Bedingungen:

Lösungsmittel (mit Gradienten)	1 min Gradient von 3 - 5 % Puffer B (0,1% Ameisensäure in 80 % Acetonitril), 119 min 5 - 30 % Puffer B, 19 min 30 - 50 % Puffer B, 1 min 50 - 95 % Puffer B, anschließend Waschen und Equilibrieren
Durchflussrate	konstant 250 nl/min
Modus	data-dependent acquisition
MS1 Scan	300 - 1750 m/z Scan Range, Auflösung von 70.000
AGC-Target	5e5
Maximale Injektionszeit	60 ms

3.12.5 Auswertung

Die gewonnenen massenspektrometrischen Rohdaten wurden mithilfe der Software „MaxQuant“ unter Verwendung der Standardeinstellungen verarbeitet. Dabei wurden die MS2-Spektren mit der Uniprot MOUSE.fasta-Datenbank verglichen, die auch eine Liste der häufigsten Kontaminanten berücksichtigt. Die Falscherkennungsrate auf Protein- und auf PSM-Ebene (peptide spectrum matches) wurde durch den Target-Decoy-Approach auf jeweils 1 % geschätzt. Die minimale Peptidlänge wurde als sieben Aminosäuren definiert. Als feste Modifikation wurde Carbamidomethylierung an Cysteinresten miteingeschlossen, ebenso wie Oxidation von Methionin und Acetyl (n-terminales Proteinende) als variable Modifikationen. Die „match-between-runs“-Option wurde aktiviert, die LFQ-Quantifizierung (label-free quantification) wurde bei Standardeinstellungen durchgeführt.

Zur weiteren statistischen Analyse wurde die Software „Perseus“ verwendet. Die LFQ-Werte wurden log₂-transformiert und Proteine, die als „potential contaminants“, „reverse“ oder „only identified by site“ gekennzeichnet waren, ausgeschlossen. Um nachfolgend statistische Tests durchführen zu können, mussten für Proben, bei denen ein Protein nicht detektiert wurde, Werte imputiert werden. Dafür wurden zufällig Werte aus dem Randbereich ($1,8 \pm 0,3 \sigma$ vom Mittelwert) der noch möglichen Detektion im Massenspektrometer ausgewählt. Die Anzahl der nicht imputierten Werte wurde als „valid values“ ausgegeben, sie entspricht folglich der Anzahl an Proben, in denen ein Protein erfolgreich detektiert werden konnte. Anschließend wurden folgende Gruppen mittels ungepaarter t-Tests untereinander verglichen: HFD vs. SD, HFD+MF vs. HFD sowie SD+MF vs. SD. Mithilfe einer Permutations-basierten Methode¹²⁰ wurden die p-Werte auf multiples Testen korrigiert, um die Zahl der falsch positiven Ergebnisse zu verringern. Daraus resultierten die entsprechend korrigierten q-Werte. Als signifikante Veränderungen wurden solche mit über 2^{0,59}-facher Hoch- bzw. Runterregulation ($\approx 1,5$ fach) und einem q-Wert kleiner 0,05 angesehen.

Um die Effekte auf die Proteinexpression zu visualisieren, wurde eine Hauptkomponentenanalyse in Perseus durchgeführt, außerdem wurden alle detektierten Proteine mithilfe der Software „RStudio“ in Volcano Plots dargestellt. In der weiteren Auswertung wurden die signifikant veränderten Proteine betrachtet, die entweder in allen Proben einer Gruppe nachgewiesen wurden (valid values = 5 für SD, HFD und SD+MF; valid values = 4 für HFD+MF) oder in keiner Probe einer Gruppe detektiert wurden (valid values = 0). Signifikante Veränderungen, die auf 0 valid values in beiden Vergleichsgruppen basierten, wurden ausgeschlossen. Zur Veranschaulichung von Überschneidungen zwischen den einzelnen Vergleichen (HFD vs. SD, HFD+MF vs. HFD, SD+MF vs. SD) wurden die signifikant veränderten Proteine in Venn-Diagrammen dargestellt (Software „FunRich 3.1.3“). Schließlich erfolgte eine Analyse potenzieller Interaktionen zwischen den signifikant veränderten Proteinen mithilfe der „STRING Database“ (basierend auf Experimenten und kuratierten Datenbanken), dabei wurden für nicht erkannte Protein-IDs homologe IDs aus der UniProt-Datenbank eingesetzt. Außerdem wurden die signifikant veränderten Proteine dabei auf sogenannte „functional enrichments“ bezüglich biologischer Prozesse, Zellkomponenten, Uniprot-Keywords sowie KEGG- bzw. Reactome-Pathways analysiert. Die STRING-Analyse-Settings wurden wie folgt festgelegt:

network type	full network
meaning of network edges	evidence
active interaction sources	experiments, databases
minimum required interaction score	medium confidence (0.400)
max number of interactors to show	1st shell: none, 2nd shell: none

3.13 Lipidanalytische Methoden (Lipidomic Screen)

Alle hier beschriebenen Arbeitsschritte wurden durch die CECAD Lipidomics/Metabolomics Facility durchgeführt.

3.13.1 Lipidextraktion

Zur Lipidextraktion aus dem Serum der nicht gefasteten Tiere wurde das „MPLEx-Verfahren“ (Metabolit-, Protein-, und Lipid-Extraktion) angewendet. Zu 10 µl jeder Serumprobe wurden 100 µl eiskalte Extraktionslösung (50 % MeOH mit 250 ppm BHT in H₂O, -20 °C) sowie 20 µl interne Standards (Myristinsäure-d₂₇; deuterierte Myristinsäure) gegeben. Letztere dienen später zur Normalisierung der Messergebnisse in der anschließenden Gas-Chromatographie. Das enthaltene BHT (Butylhydroxytoluol) fungierte als Antioxidans. Dann wurden 1500 µl eiskaltes Chloroform-Methanol-Gemisch (Verhältnis 2:1, -20 °C) hinzugefügt, 20 s gemischt und in 600 µl H₂O resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben erneut für 30 s intensiv gemischt und dann für 10 min bei 16.100 g und 4 °C

zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die untere, lipidhaltige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und im Reacti-Therm-III-Modul eingedampft, der zurückbleibende Überstand wurde verworfen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lipidpellets bei -20 °C gelagert.

3.13.2 Herstellung von Fettsäuremethylestern

Um die im Serum enthaltenen Fettsäuren chromatographisch zu bestimmen, wurden die Triglyceride des gewonnenen Lipidpellets in Fettsäuremethylester (FAMES; fatty acid methyl esters) überführt. Ein Triglycerid besteht aus einem Glycerin-Molekül, das mit drei Fettsäuren verestert ist. Bei der Umesterung mit Methanol wird das Glycerin durch Methanol ersetzt, sodass FAMES entstehen. Zu diesem Zweck wurden die Pellets jeweils in 500 µl Methanol-HCl-Gemisch (2 M HCl) gelöst. Die enthaltene Salzsäure katalysierte die Reaktion. Dazu wurde für 30 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert und die Proben anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Die entstandenen FAMES wurden mit etwas Hexan (1 - 2 Pasteurpipetten) extrahiert und die entstehende Hexan-Phase in einem neuen Gefäß eingedampft, um eine Aufkonzentration zu erreichen. Schließlich wurden die Proben wieder in 100 µl Hexan aufgenommen, in ein Vial-Gefäß mit Glasinsert überführt und dann direkt für die Gas-Chromatographie verwendet.

3.13.3 GC-MS (Gas-Chromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)

Zur Bestimmung und Quantifizierung der im Serum enthaltenen Fettsäuren wurde eine Detektion per GC-MS (7890A GC-System, gekoppelt an ein 5975 Inert XL EI/CI MSD, Agilent) durchgeführt. Dabei wurden die Proben jeweils nacheinander in einen Trägergasstrom gegeben, auf der Trennsäule (HP-5MS, Agilent) aufgetrennt und schließlich von einem massensensitiven Detektor (MSD) erfasst. Die Messparameter sind untenstehender Übersicht zu entnehmen, die Ionisierung erfolgte über Elektronenstoß.

Die Proben wurden über einen automatischen Probengeber (7693 Autosampler, Agilent) injiziert, diese im Inlet verdampft und von einem Trägergastrom (mobile Phase) über die Trennsäule transportiert. Die Säule befindet sich in einem beheizten Ofen und ist auf ihrer Innenseite mit einem flüssigen Polymerfilm (stationäre Phase; 5 % Phenyl, 95 % Methylpolysiloxan) bedeckt. Abhängig davon, wie die in der Probe enthaltenen Analyten mit der stationären Phase wechselwirken und wo ihr Siedepunkt liegt, bewegen sie sich unterschiedlich schnell durch die Säule. Dadurch werden sie aufgetrennt und verlassen die Säule nach ihrer spezifischen Retentionszeit. Sie werden in den massensensitiven Detektor geleitet, an dem sie durch Elektronenstoß ionisiert werden. Dadurch entstehen Fragmente und es wird ein elektrisches Signal erzeugt, das mit der eingetretenen Menge korreliert. Man erhält die Aufzeichnung des Total-Ionenstroms über die Zeit (s. Abb. 22).

GC-MS-Bedingungen:

Injizieren	1 µl im Splitless-Modus
Ofen	2 min 150 °C; Aufheizen auf 220 °C bis Minute 6,66; Aufheizen auf 300 °C bis Minute 18; konstant 300 °C bis Minute 23; 2 min 150 °C zur Re-Equilibrierung
GC/MSD-Verbindung	280 °C
Ionenquelle	230 °C
Quadrupol (Massenfilter)	150 °C
EI Ionisierung	70 eV
Detektor	50 - 550 m/z Scan Range

3.13.4 Auswertung

Die Software „AMDIS“ wurde genutzt, um einzelne Komponentenspektren aus dem Total-Ionenstrom zu extrahieren und durch Abgleich mit einer Referenzbibliothek (NIST 08 MS Library) der jeweiligen Ursprungs-Fettsäure zuzuordnen¹²¹. Auf diese Weise konnten die im Serum enthaltenen Fettsäuren identifiziert werden. Anschließend wurden diese Daten im R-Programm „RStudio“ mithilfe des „Metab-Packages“ weiterverarbeitet. Hier wurden alle signifikanten Ergebnisse auf den internen Standard (Myristinsäure-d₂₇) normalisiert. Dabei wurden die Fettsäuren quantifiziert, indem ein Quotient aus deren Peakflächen und denen des internen Standards gebildet wurde (Dimension der Ergebniswerte: Area ratio/10 ml Serum).

3.14 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde, sofern nicht anders angegeben, die Software „GraphPad Prism 8“ verwendet. Verglichen wurden stets HFD- und SD-Gruppe (HFD vs. SD) sowie diese beiden Diätgruppen mit ihrer jeweiligen Metformin-behandelten Interventionsgruppe (HFD+MF vs. HFD und SD+MF vs. SD). Eventuell signifikante Unterschiede im Vergleich anderer Gruppen wurden nicht berücksichtigt.

Zunächst wurde der D'Agostino-Pearson-Test verwendet, um alle Daten auf Normalverteilung zu testen. War in den zu vergleichenden Gruppen keine Normalverteilung anzunehmen, wurde anschließend der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Als entsprechender Mittelwert wird im Folgenden stets der Median mit Interquartilsabstand (IQR) gezeigt. Bei normalverteilten Daten wurde hingegen der ungepaarte t-Test angewendet, hier wird im Folgenden stets das arithmetische Mittel mit Standardabweichung angegeben.

Eine Ausnahme bildet die Analyse der histologischen Daten. Hierbei wurden ausschließlich ungepaarte t-Tests durchgeführt. Die resultierenden Ergebnisse werden als arithmetische Mittelwerte unter Berücksichtigung des Standardfehlers (SEM) angegeben, da sie auf den berechneten Mittelwerten der ausgezählten Bilder beruhen (s. Kapitel 3.9.3.4). Die Ergebnisse

der RT-qPCR wurden zusätzlich einem Grubbs-Test unterzogen, dabei wurde maximal ein detektierter signifikanter Ausreißer ($p < 0,05$) pro Gruppe ausgeschlossen.

Sofern nicht anders gekennzeichnet, zeigen Abbildungen stets das arithmetische Mittel mit Standardabweichung. Das Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert kleiner 0,05 festgelegt ($< 0,05 = *$; $< 0,01 = **$; $< 0,001 = ***$; $< 0,0001 = ****$).

4 Ergebnisse

Ein Auszug der Ergebnisse wurde Mai 2022 vorab als Artikel im MDPI-Journal Nutrients publiziert (s. Kapitel 8).

4.1 Metformin-Intervention

Ab der Trennung nach Verpaarung (G0,5) bis zum Ende des Versuchs (G15,5) erhielten die Mäuse der beiden Gruppen SD+MF und HFD+MF das Medikament Metformin über ihr Trinkwasser. Die Metformin-Zieldosis wurde der Dosierung angepasst, die auch Schwangere durchschnittlich einnehmen (31 mg/kgKG/Tag), daraus ergab sich nach Umrechnung mittels HED¹¹³ eine für Mäuse entsprechende Zieldosis von 380 mg/kgKG/Tag. Die tatsächliche Metforminaufnahme von beiden Metformin-behandelten Gruppen (HFD+MF 432,13 mg/kgKG/Tag; SD+MF 454,20 mg/kgKG/Tag) übertraf die Zieldosis (Tabelle 8). Dies entsprach einer vergleichbaren humanen Metforminaufnahme von 35,04 mg/kgKG/Tag für die HFD+MF-Mäuse und 36,83 mg/kgKG/Tag für die SD+MF-Mäuse.

Tabelle 8: Metformindosierung und -aufnahme

Im Vorfeld wurde die Trinkmenge der Mäuse durch tägliches Wiegen der Trinkflaschen bestimmt. Mithilfe des mittleren Körpergewichts der Versuchstiere wurde daraus die nötige Metformin-Dosierung im Trinkwasser berechnet, um eine Metforminaufnahme entsprechend der Zieldosis (380 mg/kgKG/Tag) zu erreichen. Zu sehen ist außerdem die tatsächliche Metforminaufnahme der Mäuse während des Versuchs und eine vergleichbare humane Metforminaufnahme (berechnet mittels HED).
kgKG = Kilogramm Körpergewicht.

	HFD+MF	SD+MF
Wasseraufnahme [ml/Tag]	2,18	4,30
mittleres Körpergewicht [kg]	0,0253	0,0228
Metformin-Dosierung im Trinkwasser [mg/ml]	5,0	2,4
Metforminaufnahme [mg/kgKG/Tag] (Zieldosis 380 mg/kgKG/Tag)	432,13	454,20
vergleichbare humane Metforminaufnahme [mg/kgKG/Tag] (Zieldosis 31 mg/kgKG/Tag)	35,04	36,83

Mittels LC-MS/MS wurde vor Beginn der Versuche die Stabilität des Medikaments in den Trinkflaschen über mindestens eine Woche nachgewiesen (Abb. 3a). Folglich genügte es, die Flaschen wöchentlich auszutauschen. Postmortal wurde auch die Metforminkonzentration im Serum der Versuchstiere an G15,5 durch LC-MS/MS bestimmt. Im Median betrug die Metforminkonzentration 0,71 µg/ml in der SD+MF-Gruppe und 2,24 µg/ml in der HFD+MF-Gruppe. Im Serum der unbehandelten Mäuse blieb der Nachweis aus (Abb. 3b). Die Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Dirk Gründemann durch seine Arbeitsgemeinschaft aus dem Institut für Pharmakologie der Uniklinik Köln.

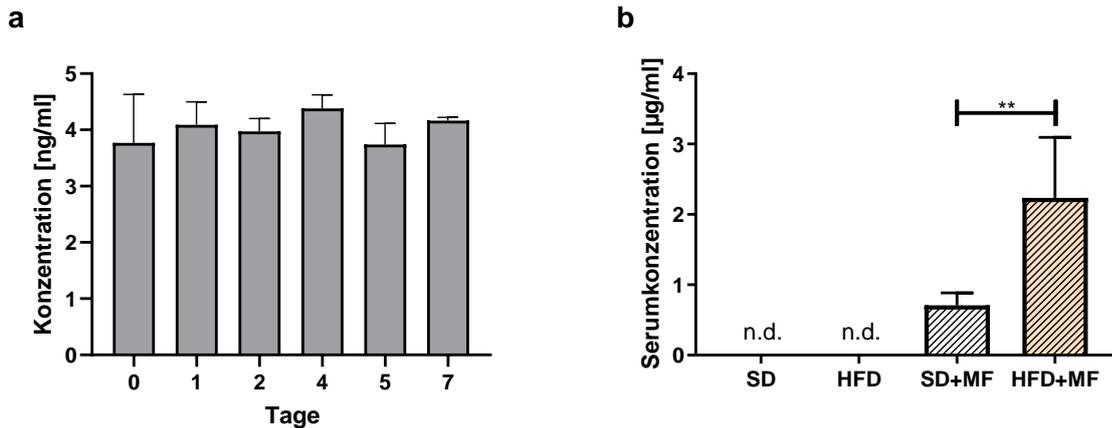


Abb. 3: Metforminstabilität im Trinkwasser und -Serumkonzentration an G15,5

Trinkflaschen (wie im Tierstall genutzt) wurde Metformin in einer Konzentration von 3,13 ng/ml zugegeben und 7 Tage bei RT stehen gelassen, um dessen Stabilität im Trinkwasser unter den Versuchsbedingungen zu bestimmen. Täglich wurden daraus Proben genommen und deren Metforminkonzentration in ng/ml mittels LC-MS/MS gemessen. Die Werte basieren auf 4 bis 8 gemessenen Trinkwasser-Proben pro Tag (0 - 7).

Postmortal wurde SD-, HFD- und Metformin-behandelten Tieren (SD+MF, HFD+MF) Vollblut aus dem Herz abgenommen und Serum gewonnen. Anschließend wurde die Metforminkonzentration [µg/ml] mittels LC-MS/MS gemessen. SD n = 5; HFD n = 5; SD+MF n = 8; HFD+MF n = 11. Mediane mit IQR. p < 0,01 **. n.d. = nicht detektierbar.

4.2 Phänotypische Veränderungen

Die Tiere wurden am Tag der Verpaarung (Alter von 12 - 20 Wochen) und am Tag der Probenentnahme (G15,5) gewogen. Dabei wurden an G15,5 auch die Feten mitgewogen, sodass ihr Gewicht mit in das Körpergewicht der Muttertiere einging. Da sich die Wurfgröße der vier Gruppen jedoch nicht signifikant voneinander unterschied (s. Anhang), wurde auf eine Normalisierung des Körpergewichts auf die Wurfgröße verzichtet. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme wiesen alle Muttertiere intakte Schwangerschaften mit mindestens einem intakten Fetus auf. Außerdem wurde die Körperlänge an G15,5 bestimmt und auch das entnommene epigonadale Fettgewebe gewogen.

4.2.1 Körpergewicht

Bei der Verpaarung waren die HFD-gefütterten Mäuse signifikant schwerer als die SD-gefütterten Mäuse (Abb. 4a). Ab G0,5 wurde jeweils eine Teilgruppe (SD+MF und HFD+MF) während der Tragezeit zusätzlich mit Metformin behandelt. Um das Körpergewicht an G15,5 auf die Körperlänge der Mäuse zu normalisieren, wurde der Quotient aus beiden Werten (g/cm) gebildet (Abb. 4b). Dieser war in der HFD-Gruppe an G15,5 mit $3,49 \pm 0,23$ g/cm signifikant größer als in der SD-Gruppe mit $3,24 \pm 0,12$ g/cm, dies entspricht einem Unterschied von 7,9 %. In der HFD+MF-Gruppe ($3,01 \pm 0,26$ g/cm) war er signifikant um 13,9 % geringer als die der HFD-Gruppe. Mit $3,13 \pm 0,16$ g/cm in der SD+MF-Gruppe war im Vergleich zur SD-Gruppe ein Trend zu einem geringeren Gewicht erkennbar (3,4 % geringer, p = 0,0944).

Die mittlere Gewichtszunahme während der Tragezeit war über alle Gruppen nahezu identisch mit Ausnahme der HFD+MF-Gruppe (Abb. 4c). Sie betrug im Mittel $9,82 \pm 1,96$ g in der SD-Gruppe und $9,58 \pm 1,88$ g in der SD+MF-Gruppe. In der HFD+MF-Gruppe war die Zunahme mit $5,82 \pm 2,23$ g signifikant geringer als in der HFD-Gruppe ($9,93 \pm 1,81$ g), das entspricht einer um 41,5 % geringeren Gewichtszunahme der HFD+MF-Mäuse im Vergleich zur HFD in der Tragezeit.

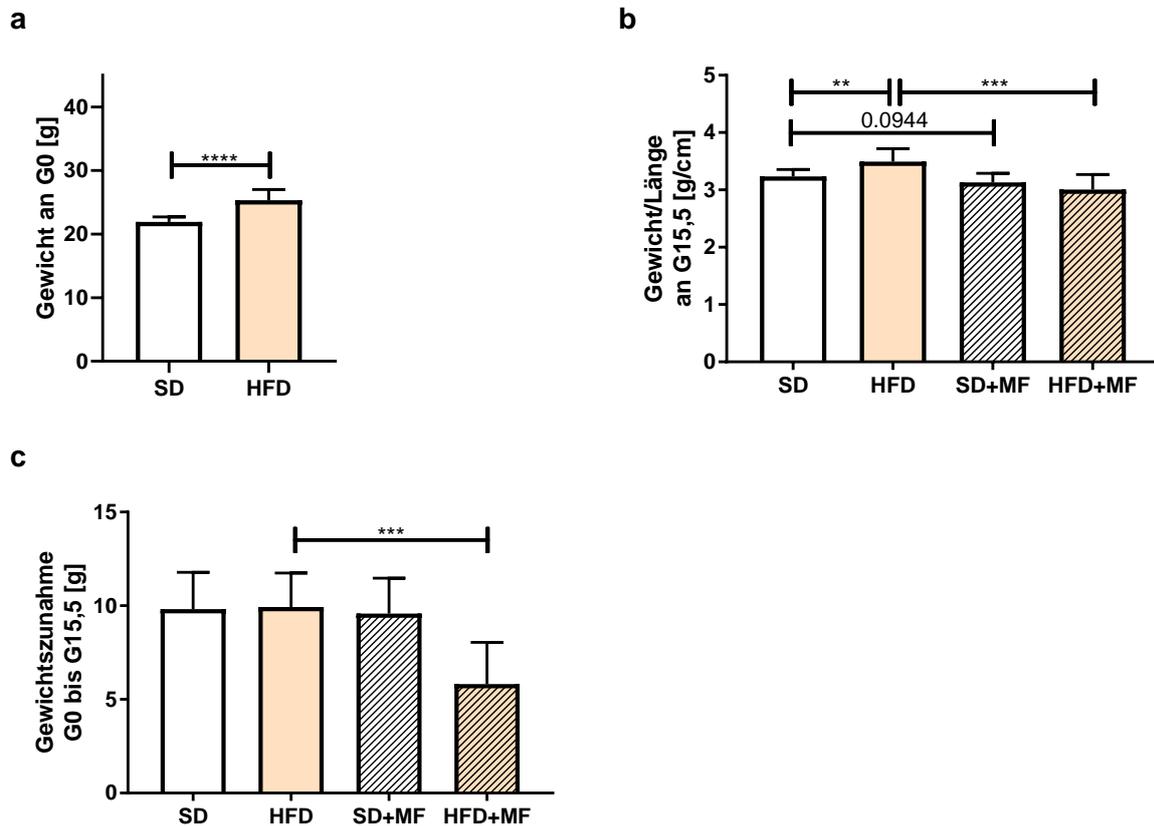


Abb. 4: Körpergewicht und Gewichtszunahme während der Tragezeit

SD-, HFD- und Metformin-behandelte Tiere (SD+MF, HFD+MF) wurden am Tag der Verpaarung (G0) und am Tag der Probenentnahme (G15,5) gewogen. Angegeben ist das Körpergewicht bei Verpaarung (G0) in Gramm (a), der Quotient aus Körpergewicht/Körperlänge an G15,5 in g/cm (b) und die Gewichtszunahme während der Tragezeit (G0 bis G15,5) in Gramm (c). (a) SD n = 22; HFD n = 22. (b) SD n = 12; HFD n = 11; SD+MF n = 9; HFD+MF n = 8. (c) SD n = 13; HFD n = 11; SD+MF n = 9; HFD+MF n = 11. $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***; $p < 0,0001$ ****.

4.2.2 Gewicht des epigonadalen Fettgewebes

Um das Gewicht des entnommenen egWATs auf das Gesamtkörpergewicht der Mäuse zu normalisieren, wurde der Quotient aus beiden Gewichten (egWAT-Gewicht/Körpergewicht bei Probenentnahme) gebildet (Abb. 5). Dieser war in der HFD-Gruppe ($0,0272 \pm 0,0081$) signifikant größer als in der SD-Gruppe ($0,0094 \pm 0,0023$), was einer Erhöhung um 190,0 % gegenüber der SD entspricht. Der Gewichtsquotient war in der HFD+MF-Gruppe mit $0,0172 \pm 0,0066$ signifikant um 36,9 % reduziert gegenüber der HFD. Die SD+MF-Gruppe unterschied sich mit $0,0099 \pm 0,0013$ nicht signifikant im Vergleich zur SD-Kontrollgruppe.

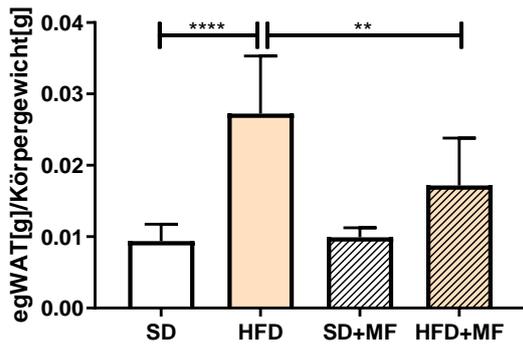


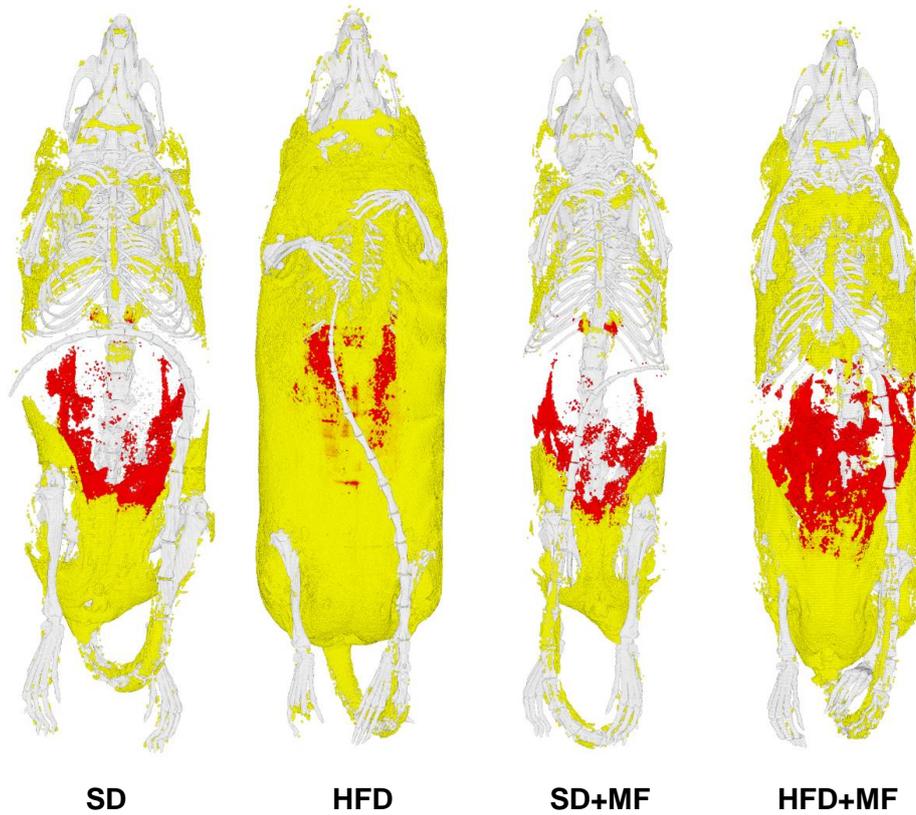
Abb. 5: egWAT-Gewicht an G15,5

An G15,5 wurde das Gewicht der SD-, HFD- und Metformin-behandelten Tiere (SD+MF, HFD+MF) sowie des entnommenen egWATs bestimmt. Zu sehen ist der Quotient aus egWAT-Gewicht und Körpergewicht. SD n = 13; HFD n = 8; SD+MF n = 9; HFD+MF n = 11. $p < 0,01$ **; $p < 0,0001$ ****.

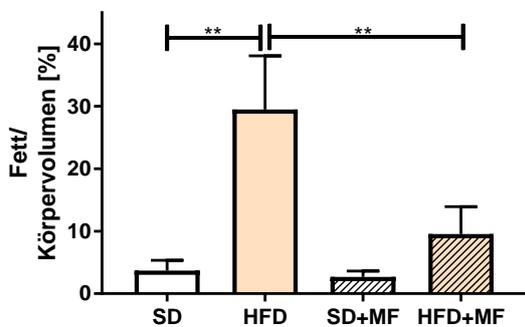
4.2.3 Fettgewebsquantifizierung an nichttragenden Tieren

Der Adipositas-induzierende Effekt der HFD sowie der gewichtsreduzierende Effekt unter Metforminbehandlung wurden zusätzlich an nichttragenden, weiblichen Mäusen mittels μ CT-Analysen untersucht. Es zeigte sich eine gesteigerte subkutane (gelb) und viszerale Fettmasse (rot) der HFD-Tiere im Vergleich zu den SD-Tieren, sowie eine Reduktion dieser beiden Fettdepots in beiden Metformin-behandelten Gruppen (SD+MF, HFD+MF) (Abb. 6a). Das Gesamtfettvolumen bezogen auf das Körpervolumen (Abb. 6b) der HFD-Mäuse (29,51 %) war signifikant größer als das der SD-Mäuse (3,70 %). Unter der Metforminbehandlung war das Gesamtfettvolumen der HFD+MF-Mäuse mit 9,54 % signifikant geringer als das der HFD-Mäuse, was einer 67,67-prozentigen Reduktion entspricht. Auch in der SD+MF-Gruppe (2,67 %) zeigte sich ein Trend zu einem um 27,8 % reduzierten Gesamtfettvolumen im Vergleich zur SD, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant ($p = 0,1775$). Die gleichen Beobachtungen konnten auch bezüglich des viszeralen Fettvolumens (Abb. 6c) gemacht werden. Bezogen auf das Körpervolumen wies die HFD-Gruppe (10,16 %) ein signifikant erhöhtes viszerales Fettvolumen gegenüber der SD-Gruppe (1,19 %) auf, des Weiteren war das viszerales Fettvolumen der HFD+MF-Gruppe (3,23 %) signifikant geringer als in der HFD-Gruppe. Hier war ebenfalls ein Trend ($p = 0,1775$) zu einem geringeren viszeralen Fettvolumen in der SD+MF-Gruppe (0,88 %) im Vergleich zur SD zu beobachten.

a



b



c

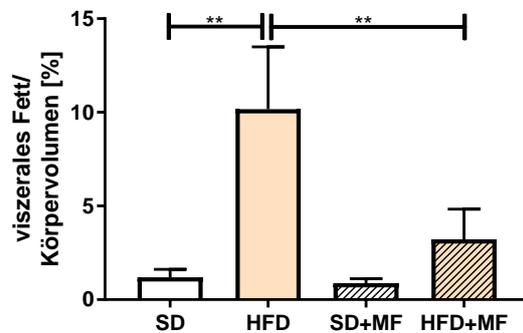


Abb. 6 Gesamtfettvolumen und viszerale Fettvolumen der nichttragenden Mäuse

Nichttragende SD-, HFD- und 15 Tage mit Metformin behandelte Mäuse (SD+MF, HFD+MF) wurden postmortal in einem μ CT-Scanner gescannt. Um das Gesamtvolumen des Mäusekörpers und das Fettvolumen zu bestimmen, wurden die erhaltenen Bilder anhand der Gewebedichte segmentiert. Dabei wurde die Bauchmuskelwand als Orientierung genutzt, um das viszerale vom subkutanen Fettgewebe abzugrenzen. Gezeigt sind repräsentative μ CTs (gelb = subkutanes Fettgewebe, rot = viszerale Fettgewebe) (a), das Gesamtfettvolumen in Prozent des Körpervolumens (b) und das viszerale Fettvolumen in Prozent des Körpervolumens (c). SD n = 5; HFD n = 6; SD+MF n = 6; HFD+MF n = 8. Mediane mit IQR. p < 0,01 **.

4.3 Fettgewebsmorphologie

Fläche und Durchmesser der Fettzellen im scWAT und egWAT wurden in histologischen Präparaten untersucht. Dazu wurden fünf zufällige Bilder aus fünf verschiedenen Bereichen jedes Präparats mithilfe des „ImageJ Fiji“-Plugins „Adiposoft“ analysiert, das die Fettzellen automatisch markiert und deren Fläche und Durchmesser misst (s. Kapitel 3.9.3).

4.3.1 Methodenetablierung zur Analyse der Fettzellgröße

Ein Mindestdurchmesser von 10 μm stellte sich als am trennschärfsten heraus, um mittels Adiposoft zwar möglichst viele kleine Zellen zu identifizieren, aber gleichzeitig nur wenige falsche Markierungen zu erhalten, die sich nicht auf eine Fettzelle bezogen (Abb. 7). Bei einem Mindestdurchmesser von 5 μm nahm die Zahl falscher Markierungen deutlich zu, während nur vereinzelt weitere Fettzellen zusätzlich erfasst werden konnten. Eine Festlegung auf 15 μm sorgte hingegen dafür, dass eine Großzahl der kleinen Zellen nicht identifiziert wurden. Der Maximaldurchmesser wurde auf 140 μm festgelegt, sodass die größten, augenscheinlich als Fettzelle zu identifizierenden Zellen von der automatischen Markierung noch miterfasst wurden (Abb. 8).

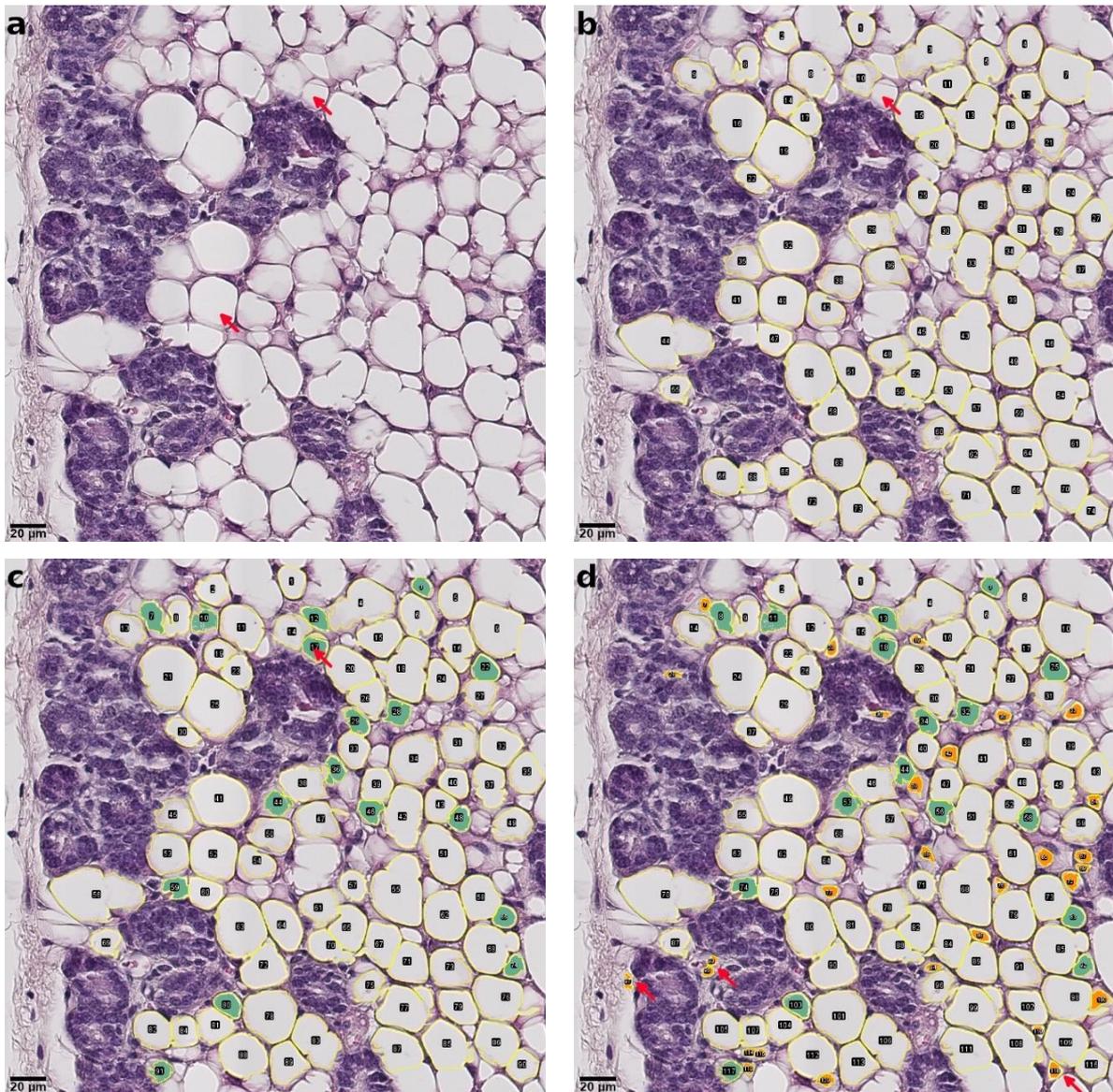


Abb. 7: Festlegung des Mindestdurchmessers einer Fettzelle

Aus WAT wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, anschließend HE-gefärbt und in 40facher Vergrößerung digitalisiert. Durch die Software Adiposoft wurden die Fettzellen automatisiert markiert und ausgemessen, die gesetzten Markierungen sind hier gelb zu sehen. Pfeile, grüne und orange Hervorhebungen wurden nachträglich hinzugefügt. Gezeigt ist die beispielhafte Analyse eines Bildes aus scWAT der SD-Gruppe mit verschiedenen gewählten Mindestdurchmessern (5, 10 und 15 µm). Größenbalken 20 µm.

- a **Bild vor der Analyse durch Adiposoft.** Es enthält repräsentative mittelgroße und kleine Fettzellen (s. rote Pfeile).
- b **Durch Adiposoft markierte Fettzellen bei Mindestdurchmesser 15 µm.** Ein Großteil der Fettzellen wird durch die gesetzten Markierungen (gelb) erfasst, jedoch werden insbesondere kleine Zellen zum Teil nicht markiert (s. roter Pfeil).
- c **Durch Adiposoft markierte Fettzellen bei Mindestdurchmesser 10 µm.** Alle hinzugekommenen Markierungen enthalten eindeutig als Fettzelle zu identifizierende Bereiche (grün). Es werden deutlich mehr kleine Fettzellen erkannt als bei der Festsetzung auf 15 µm (s. roter Pfeil).
- d **Durch Adiposoft markierte Fettzellen bei Mindestdurchmesser 5 µm.** Eine Vielzahl weiterer Markierungen kommt hinzu (orange). Die meisten beziehen sich jedoch auf Bereiche, die nicht eindeutig als Fettzelle zu identifizieren sind. Nur Wenige beziehen weitere Fettzellen ein (s. rote Pfeile).

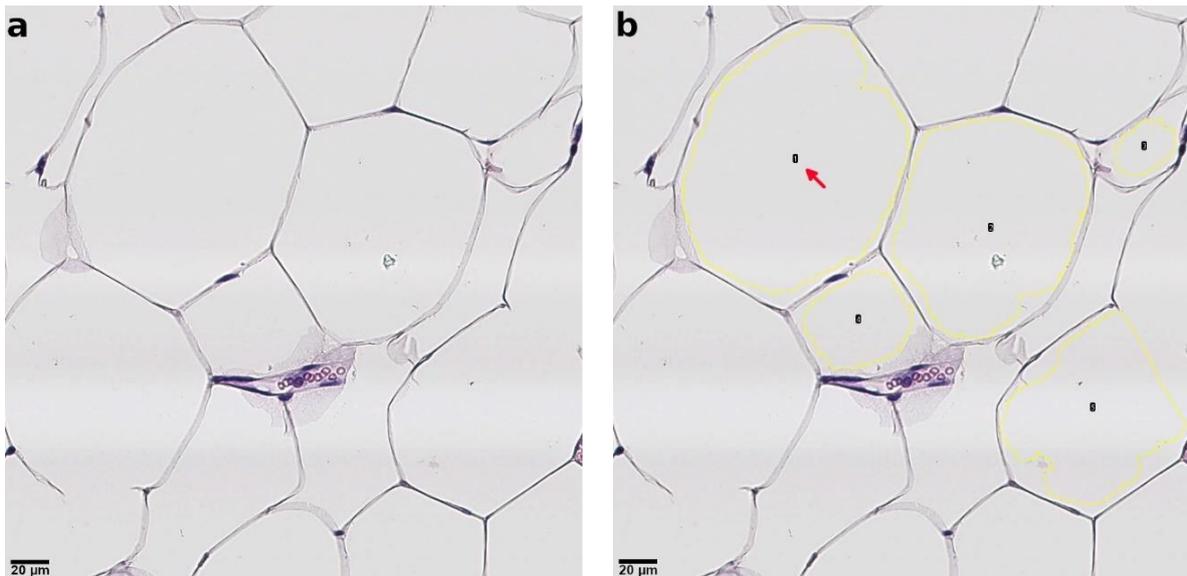


Abb. 8: Festlegung des Maximaldurchmessers einer Fettzelle

Aus WAT wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, anschließend HE-gefärbt und in 40facher Vergrößerung digitalisiert. Durch die Software Adiposoft wurden die Fettzellen automatisiert markiert und ausgemessen, die gesetzten Markierungen sind hier gelb zu sehen. Gezeigt ist die beispielhafte Analyse eines Bildes aus egWAT der HFD-Gruppe. Größenbalken 20 µm.

- a** **Ursprungsbild zur Festlegung des Maximaldurchmessers.** Es enthält beispielhafte besonders große Fettzellen.
- b** **Durch Adiposoft markierte Fettzellen bei Maximaldurchmesser 140 µm.** Die größte Fettzelle (s. roter Pfeil) wird erst ab einer Festlegung des Maximaldurchmessers auf 130 µm erfasst. Um Zellen dieser Größe sicher miteinzubeziehen, wurde dieser auf 140 µm festgelegt.

4.3.2 Fettzellgröße des scWATs

Sowohl die mittlere Fläche als auch der mittlere Durchmesser der Fettzellen im scWAT waren in der HFD-Gruppe signifikant größer als in der SD-Gruppe und in der HFD+MF-Gruppe signifikant geringer als in der HFD-Gruppe (Abb. 9): Die mittlere Fläche (Abb. 9a) war in der HFD-Gruppe ($1729,0 \pm 252,3 \mu\text{m}^2$) signifikant größer als in der SD-Gruppe ($822,2 \pm 110,2 \mu\text{m}^2$). In der HFD+MF-Gruppe ($1003,0 \pm 108,5 \mu\text{m}^2$) war sie signifikant geringer als in der HFD-Gruppe. Das entspricht einer um 110,3 % größeren Fläche in der HFD-Gruppe gegenüber der SD, sowie einer um 42,0 % geringeren Fläche in der HFD+MF-Gruppe gegenüber der HFD. Mit $678,9 \pm 102,7 \mu\text{m}^2$ unterschied sich die mittlere Fläche der SD+MF-Gruppe nicht signifikant von ihrer SD-Kontrollgruppe. Der mittlere Durchmesser der Fettzellen (Abb. 9b) verhielt sich in gleicher Weise. In der HFD-Gruppe ($44,33 \pm 3,05 \mu\text{m}$) war er signifikant um 47,7 % größer als in der SD-Gruppe ($30,01 \pm 2,01 \mu\text{m}$). Ebenso zeigten die Fettzellen der HFD+MF-Mäuse ($33,75 \pm 1,72 \mu\text{m}$) einen signifikant um 23,9 % geringeren Durchmesser im Vergleich zu den HFD-Mäusen. In der SD+MF-Gruppe betrug der mittlere Durchmesser $27,17 \pm 2,02 \mu\text{m}$ und unterschied sich damit nicht signifikant von der SD-Gruppe.

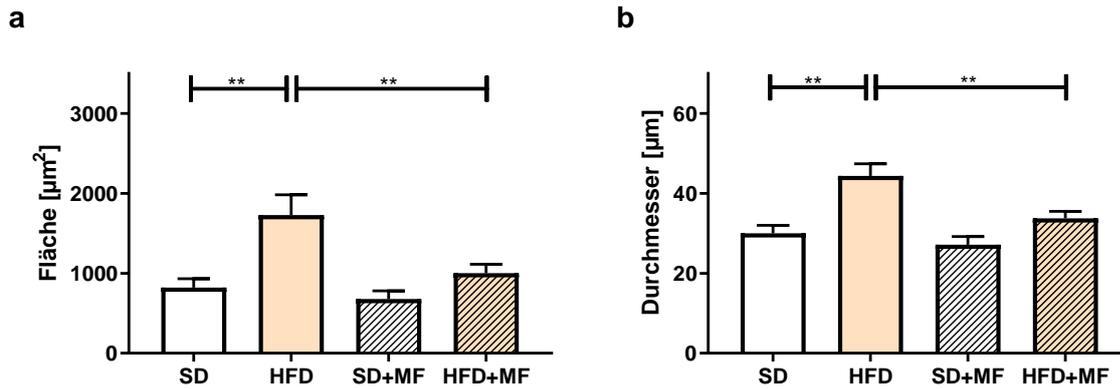


Abb. 9: Fläche und Durchmesser der Fettzellen im scWAT an G15,5

Von jedem scWAT-Präparat wurden histologische Schnitte ($5 \mu\text{m}$) angefertigt, in 40facher Vergrößerung digitalisiert, daraus fünf Bilder zufällig ausgewählt und die Fettzellen mithilfe des ImageJ-Plugins Adiposoft automatisch ausgemessen. Die Messwerte innerhalb eines Bildes wurden gemittelt und auf die Gesamtzahl der gezählten Zellen normalisiert, anschließend wurde ein Gesamt-Mittelwert aus den Mittelwerten aller fünf Bilder eines Präparats gebildet. Angegeben ist die mittlere Fläche der Fettzellen in μm^2 (a) und der mittlere Durchmesser in μm (b). SD n = 13; HFD n = 6; SD+MF n = 9; HFD+MF n = 11. Mittelwerte mit SEM. $p < 0,01$ **.

4.3.3 Fettzellgröße des egWATs

Im egWAT unterschieden sich die mittlere Fläche und der mittlere Durchmesser der Fettzellen (Abb. 10) nur bei den HFD-Mäusen signifikant von der SD. Im Vergleich mit der HFD war ein Trend der HFD+MF-Mäuse zu einer geringeren Fläche und einem geringeren Durchmesser der Fettzellen zu erkennen: Die mittlere Fläche (Abb. 10a) war in der HFD-Gruppe ($2624,0 \pm 211,60 \mu\text{m}^2$) um 125,2 % größer als in der SD-Gruppe ($1165,0 \pm 79,31 \mu\text{m}^2$). In der HFD+MF-Gruppe ($2101,0 \pm 194,20 \mu\text{m}^2$) zeigte sich im Vergleich zur HFD ein Trend zu einer um 19,9 % verringerten Fläche ($p = 0,0834$). Die SD+MF-Gruppe ($1280,0 \pm 90,51 \mu\text{m}^2$) unterschied sich nicht signifikant von der SD-Kontrollgruppe. Der mittlere Durchmesser der Fettzellen (Abb. 10b) in der HFD-Gruppe ($54,04 \pm 2,20 \mu\text{m}$) war ebenfalls signifikant um 47,9 % größer als in der SD-Gruppe ($36,54 \pm 1,51 \mu\text{m}$). In der HFD+MF-Gruppe ($48,94 \pm 2,36 \mu\text{m}$) war ein Trend zu einem um 9,4 % geringeren Durchmesser als in der HFD-Gruppe zu beobachten ($p = 0,1302$). Ein signifikanter Unterschied der SD+MF-Gruppe ($38,71 \pm 1,39 \mu\text{m}$) zur SD-Gruppe bestand nicht.

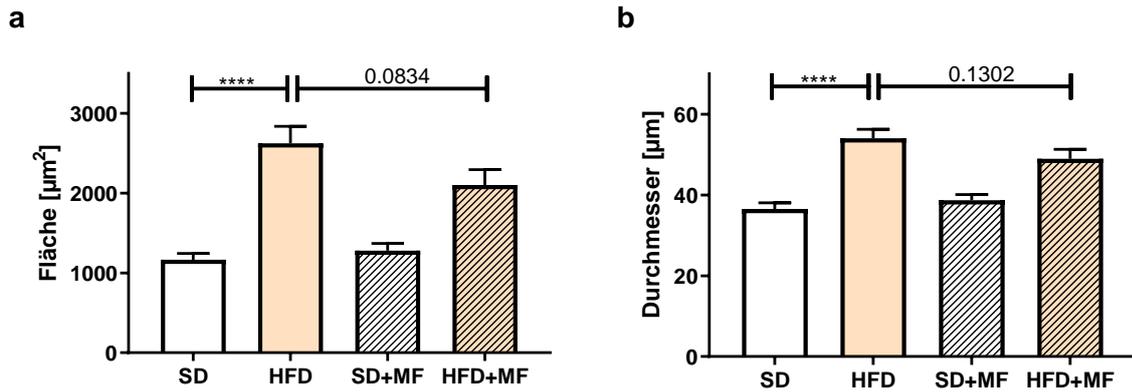


Abb. 10: Fläche und Durchmesser der Fettzellen im egWAT an G15,5

Von jedem egWAT-Präparat wurden histologische Schnitte (5 μm) angefertigt, in 40facher Vergrößerung digitalisiert, daraus fünf Bilder zufällig ausgewählt und die Fettzellen mithilfe des ImageJ-Plugins Adiposoft automatisch ausgemessen. Die Messwerte innerhalb eines Bildes wurden gemittelt und auf die Gesamtzahl der gezählten Zellen normalisiert, anschließend wurde ein Gesamt-Mittelwert aus den Mittelwerten aller fünf Bilder eines Präparats gebildet. Angegeben ist die mittlere Fläche der Fettzellen in μm^2 (a) und der mittlere Durchmesser in μm (b). SD n = 14; HFD n = 11; SD+MF n = 9; HFD+MF n = 11. Mittelwerte mit SEM. $p < 0,0001$ ****.

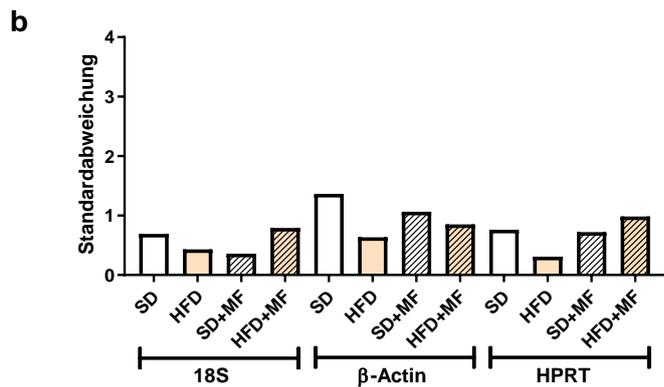
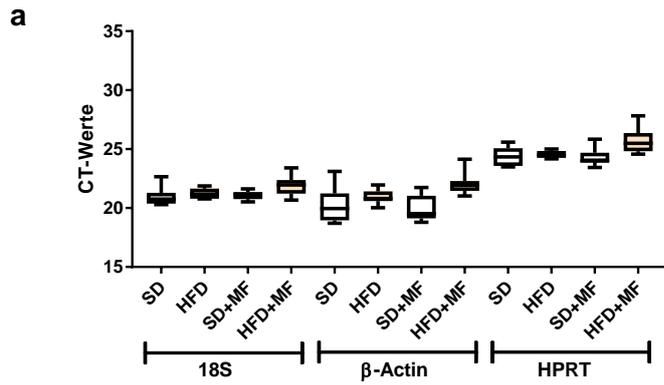
4.4 mRNA-Expression von Entzündungsfaktoren und oxidativen Stressmarkern im WAT

Die mRNA-Expressionslevel der Entzündungsfaktoren IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , CXCL1 sowie CXCL10 und der pro-oxidativen Stressmarker CYB-A, CYB-B, NCF1, NCF2 sowie NOX4 und der anti-oxidativen Stressmarker SOD1, GPX1 sowie CAT wurden im scWAT und egWAT gemessen.

4.4.1 Auswahl der Housekeeping-Gene

Zunächst wurden verschiedene mögliche Housekeeping-Gene getestet, die sich in der Literatur als besonders geeignet für Fettgewebe herausgestellt haben¹¹⁷: β -Actin, 18S, HPRT, GUSB und GAPDH. Dadurch sollte ein Referenz-Gen mit einer möglichst geringen Standardabweichung über alle vier Gruppen ausgewählt werden. Im scWAT wurde im Folgenden 18S als Housekeeping-Gen zur Normalisierung der Ziel-Gene verwendet, weil es im Vergleich zu β -Actin und HPRT die geringste Streuung der gemessenen CT-Werte in der RT-qPCR zeigte (Abb. 11a-b). Da im egWAT HPRT im Vergleich zu 18S, β -Actin, GUSB und GAPDH die geringste Streuung der CT-Werte über alle Gruppen aufwies (Abb. 11c-d), wurde es hier als Housekeeping-Gen verwendet.

scWAT



egWAT

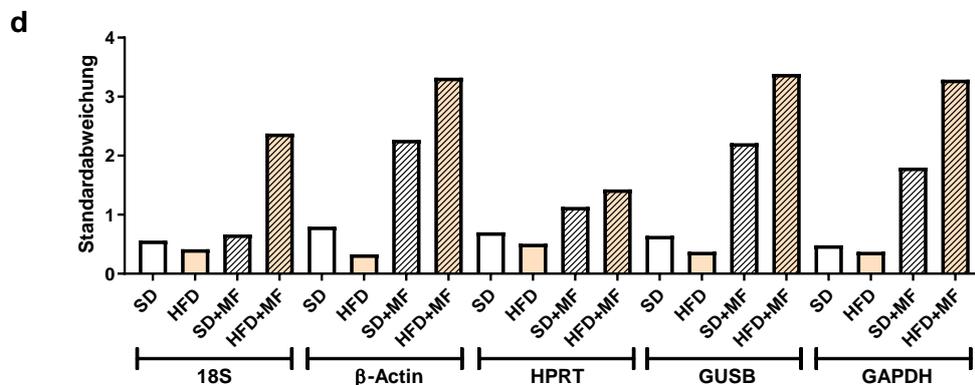
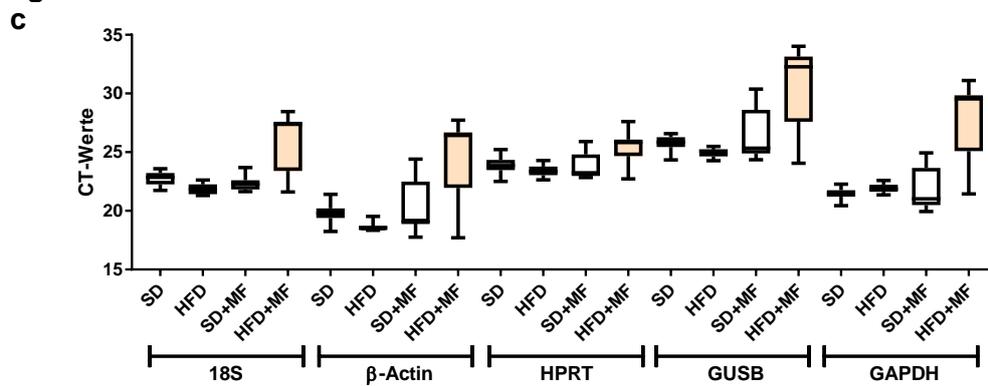


Abb. 11: RT-qPCR von Housekeeping-Genen im WAT

Zur Normalisierung der Ziel-Gene wurden 18S, β -Actin und HPRT im scWAT sowie zusätzlich GUSB und GAPDH im egWAT getestet. Gezeigt sind jeweils die CT-Werte und deren Standardabweichung. (a-b) SD n = 12; HFD n = 6; SD+MF n = 9; HFD+MF n = 10. (c-d) SD n = 14; HFD n = 11; SD+MF n = 7 - 9; HFD+MF n = 11.

4.4.2 Entzündungsfaktoren und oxidative Stressmarker im scWAT

Die mRNA-Expression der Entzündungsfaktoren zeigte im Vergleich der verschiedenen Gruppen kaum signifikante Unterschiede, lediglich IL-1 β war in der HFD-Gruppe signifikant geringer exprimiert als in der SD-Gruppe. Es bestand insgesamt ein Trend zu einer verringerten Expression von Entzündungsfaktoren im scWAT der HFD-Mäuse gegenüber dem der SD-Mäuse (Abb. 12).

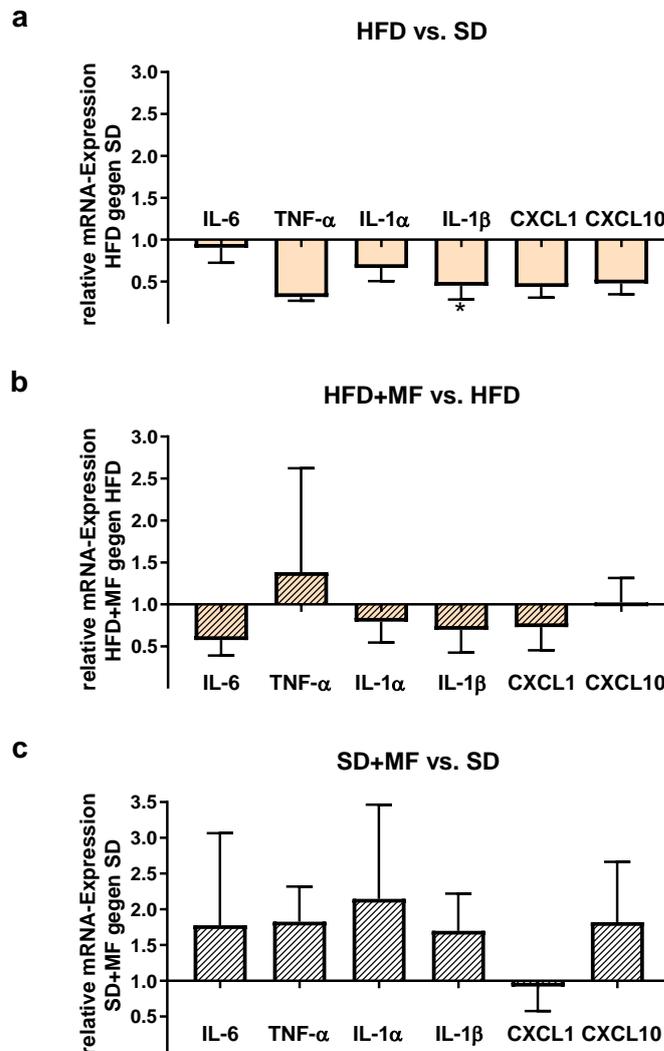


Abb. 12: mRNA-Expression von Entzündungsfaktoren im scWAT an G15,5

Die relative Genexpression von Entzündungsfaktoren (IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , CXCL1, CXCL10) im scWAT wurde mittels RT-qPCR bestimmt und anschließend mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode unter Einbezug der Messwerte des Housekeeping-Gens 18S berechnet. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression in Bezug auf die jeweilige Vergleichsgruppe (HFD vs. SD, HFD+MF vs. HFD, SD+MF vs. SD; Vergleichsgruppe wurde jeweils auf 1 gesetzt). SD n = 10 - 11; HFD n = 5 - 6; SD+MF n = 8 - 9; HFD+MF n = 8 - 10. Mediane mit IQR. p < 0,05*.

Auch die mRNA-Expression der oxidativen Stressmarker unterschied sich nur in wenigen Vergleichen signifikant. In der HFD-Gruppe waren die pro-oxidative CYB-A und die antioxidative CAT signifikant geringer exprimiert als in der SD-Gruppe. Im Vergleich der HFD+MF-Gruppe mit der HFD zeigte sich eine signifikant geringere Expression der antioxidativen Marker SOD1 und GPX1. Insgesamt war ein Trend zu geringer exprimierten

oxidativen Stressmarkern im scWAT der Mäuse unter HFD gegenüber SD zu erkennen (Abb. 13).

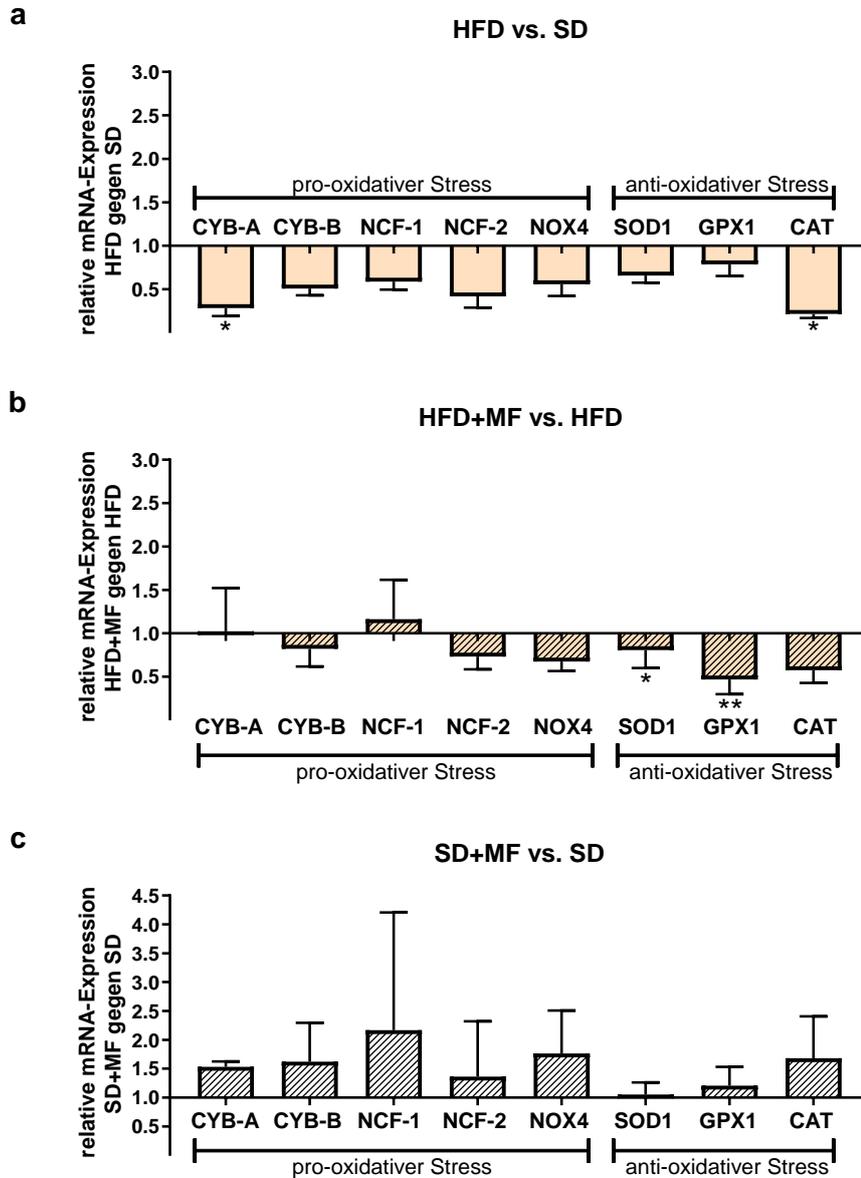


Abb. 13: mRNA-Expression von oxidativen Stressmarkern im scWAT an G15,5

Die relative Genexpression von oxidativen Stressmarkern (CYB-A, CYB-B, NCF-1, NCF-2, NOX4, SOD1, GPX1, CAT) im scWAT wurde mittels RT-qPCR bestimmt, und anschließend mithilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode unter Einbezug der Messwerte des Housekeeping-Gens 18S berechnet. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression in Bezug auf die jeweilige Vergleichsgruppe (HFD vs. SD, HFD+MF vs. HFD, SD+MF vs. SD; Vergleichsgruppe wurde jeweils auf 1 gesetzt). SD n = 11; HFD n = 5 - 6; SD+MF n = 9; HFD+MF n = 9 - 10. Mediane mit IQR. $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **.

4.4.1 Entzündungsfaktoren und oxidative Stressmarker im egWAT

Die mRNA-Expression der Entzündungsfaktoren zeigte kaum signifikante Veränderungen im Vergleich der verschiedenen Gruppen, nur TNF- α war in der HFD+MF-Gruppe signifikant geringer exprimiert als in der HFD-Gruppe. Außerdem war ein Trend zu einer geringeren Expression von CXCL10 im egWAT der HFD+MF- gegenüber der HFD-Gruppe zu erkennen ($p = 0,132$) (Abb. 14).

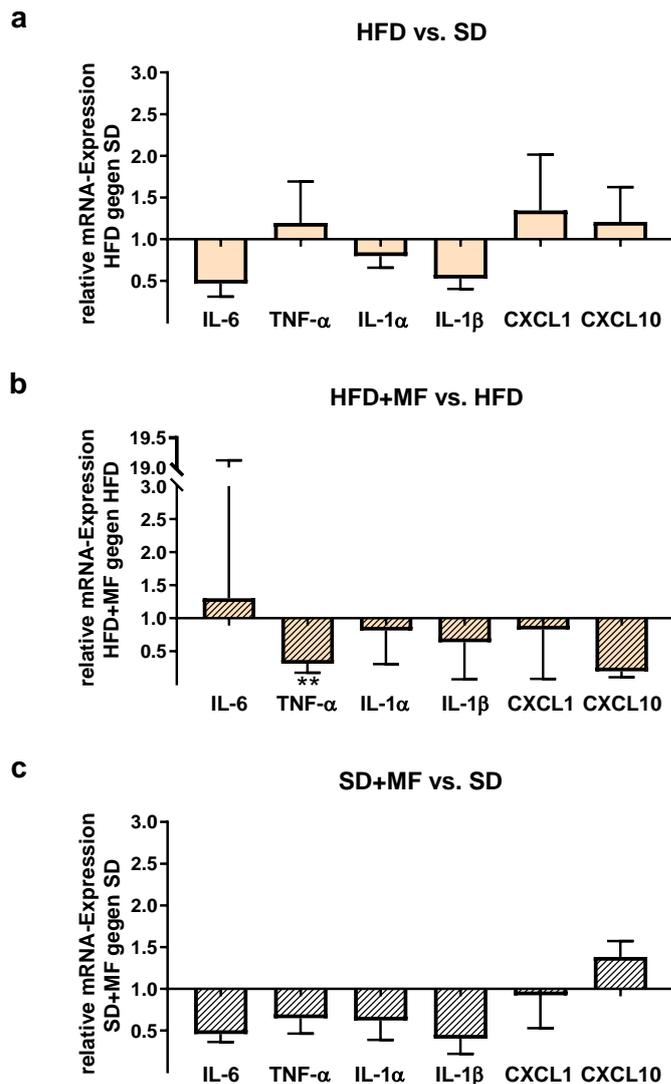


Abb. 14: mRNA-Expression von Entzündungsfaktoren im egWAT an G15,5

Die relative Genexpression von Entzündungsfaktoren (IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , CXCL1, CXCL10) im egWAT wurde mittels RT-qPCR bestimmt und anschließend mithilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode unter Einbezug der Messwerte des Housekeeping-Gens HPRT berechnet. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression in Bezug auf die jeweilige Vergleichsgruppe (HFD vs. SD, HFD+MF vs. HFD, SD+MF vs. SD; Vergleichsgruppe wurde jeweils auf 1 gesetzt). SD n = 12 - 14; HFD n = 10 - 11; SD+MF n = 6 - 7; HFD+MF n = 8 - 9. Mediane mit IQR. p < 0,01 **.

Im Vergleich von HFD-Gruppe mit SD-Gruppe und von HFD+MF-Gruppe mit HFD-Gruppe zeigten sich deutliche signifikante Veränderungen in Bezug auf die mRNA-Expression von oxidativen Stressmarkern. Im egWAT der HFD-Mäuse waren die pro-oxidativen Marker CYB-A, CYB-B, NCF-1, NCF-2 und NOX4 sowie die antioxidative GPX1 signifikant gegenüber der SD hochreguliert, während die antioxidative SOD1 herunterreguliert war. In der HFD+MF-Gruppe zeigten sich hingegen alle pro- und anti-oxidativen Stressmarker signifikant herunterreguliert gegenüber der HFD. Solche signifikanten Veränderungen waren im Vergleich von SD+MF-Gruppe mit SD-Gruppe nicht zu beobachten (Abb. 15).

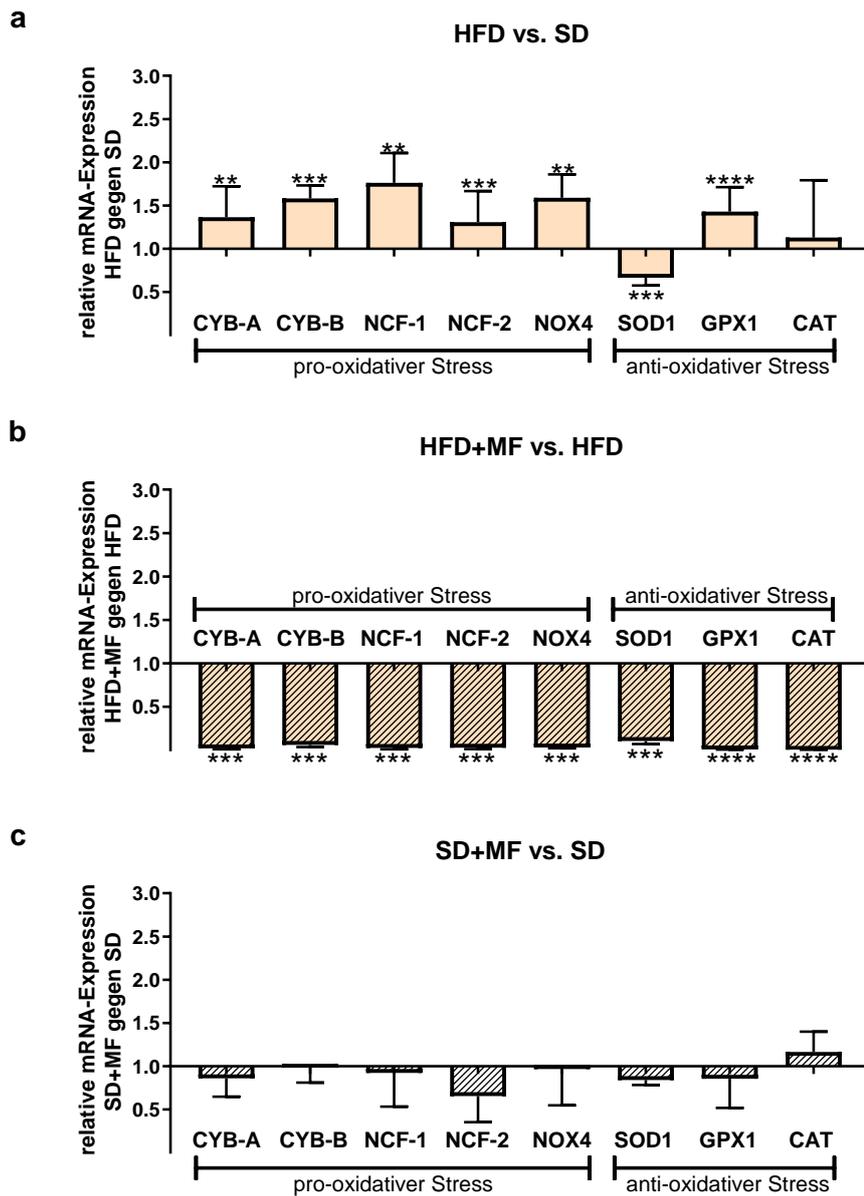


Abb. 15: mRNA-Expression von oxidativen Stressmarkern im egWAT an G15,5

Die relative Genexpression von oxidativen Stressmarkern (CYB-A, CYB-B, NCF-1, NCF-2, NOX4, SOD1, GPX1, CAT) im egWAT wurde mittels RT-qPCR bestimmt, und anschließend mithilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode unter Einbezug der Messwerte des Housekeeping-Gens HPRT berechnet. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression in Bezug auf die jeweilige Vergleichsgruppe (HFD vs. SD, HFD+MF vs. HFD, SD+MF vs. SD; Vergleichsgruppe wurde jeweils auf 1 gesetzt). SD n = 13 - 14; HFD n = 11; SD+MF n = 7 - 8; HFD+MF n = 10 - 11. Mediane mit IQR. p < 0,01 **, p < 0,001 ***, p < 0,0001 ****.

4.5 Proteom-Analyse des egWATs

Da egWAT im Gegensatz zu scWAT metabolisch deutlich aktiver ist, verstärkt inflammatorische Faktoren sekretiert und im engen Zusammenhang mit Adipositas-assoziierten Erkrankungen steht (s. Kapitel 2.2.5), wurde egWAT der vier Vergleichsgruppen einer Proteom-Analyse unterzogen. Als signifikante Veränderungen wurden solche mit über 2^{0,59}-facher Hoch- bzw. Runterregulation ($\approx 1,5$ fach) und einem q-Wert kleiner 0,05 angesehen (s. Kapitel 3.12.5). In der weiteren Auswertung wurden die signifikant veränderten Proteine betrachtet, die entweder in allen Proben einer Gruppe nachgewiesen wurden (valid values = 5 für SD, HFD und SD+MF; valid values = 4 für HFD+MF) oder in keiner Probe einer Gruppe detektiert wurden (valid values = 0). Da eine Probe der HFD+MF-Gruppe nicht analysiert werden konnte, waren es dort nur vier statt fünf Proben. Daraus ergaben sich folgende Vergleiche, aus denen die signifikant veränderten Proteine in diesem Kapitel näher betrachtet werden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht über betrachtete Vergleiche der signifikant veränderten Proteine

Pro Gruppe wurden 5 Proben analysiert. Eine Probe der HFD+MF-Gruppe konnte nicht analysiert werden, deshalb können hier nur n = 4 Proben ausgewertet werden, wodurch sich hier eine maximale Anzahl von 4 valid values ergibt. Valid values = Anzahl der Proben, in denen ein Protein nachgewiesen wurde.

Gruppen	betrachtete Vergleiche [valid values]
SD vs. HFD	5 vs. 5 (Protein in allen Proben beider Gruppen detektiert) 0 vs. 5 (Protein in keiner SD-Probe detektiert) 5 vs. 0 (Protein in keiner HFD-Probe detektiert)
HFD+MF vs. HFD	4 vs. 5 (Protein in allen Proben beider Gruppen detektiert) 0 vs. 5 (Protein in keiner HFD+MF-Probe detektiert) 4 vs. 0 (Protein in keiner HFD-Probe detektiert)
SD+MF vs. SD	5 vs. 5 (Protein in allen Proben beider Gruppen detektiert) 0 vs. 5 (Protein in keiner SD+MF-Probe detektiert) 5 vs. 0 (Protein in keiner SD-Probe detektiert)

4.5.1 Hauptkomponentenanalyse

Insgesamt wurden 3577 verschiedene Proteine in den unterschiedlichen Gruppen nachgewiesen. Die Hauptkomponentenanalyse aller dieser Proteine (Abb. 16) zeigt das unterschiedliche globale Proteinexpressionsmuster im egWAT der Mäuse der vier Vergleichsgruppen. Insbesondere im Vergleich der HFD mit SD waren deutliche Unterschiede zu erkennen, zudem grenzten sie sich auch sichtbar von ihren zugehörigen Metformin-behandelten Gruppen (SD+MF, HFD+MF) ab. SD+MF und HFD+MF bildeten hingegen zwei eng benachbarte Cluster.

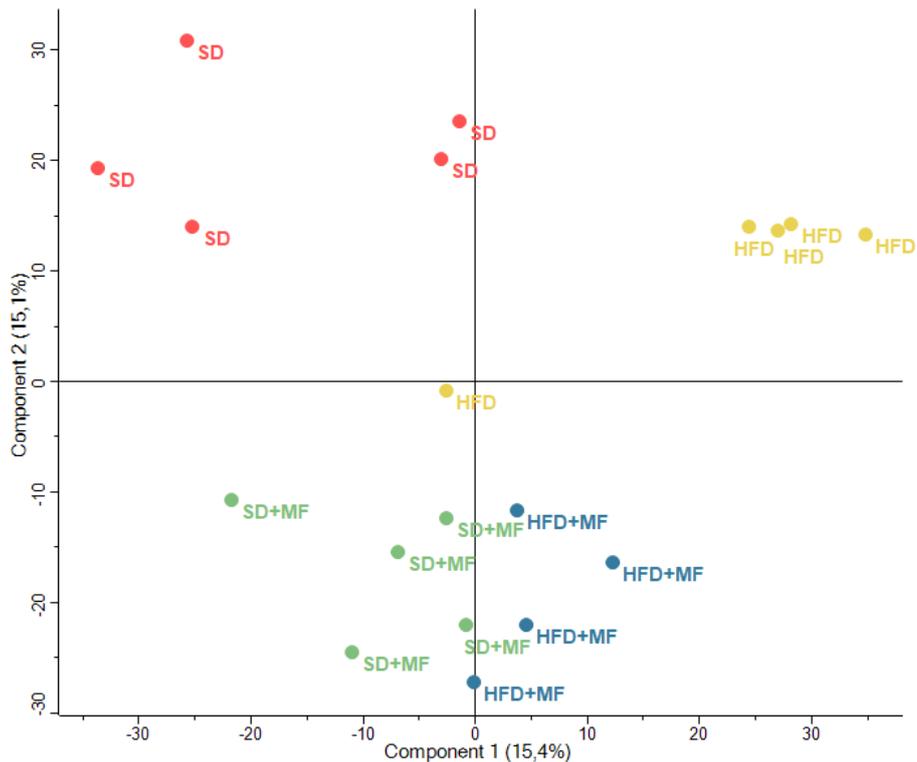


Abb. 16: Hauptkomponentenanalyse aller detektierten Proteine aus egWAT an G15,5

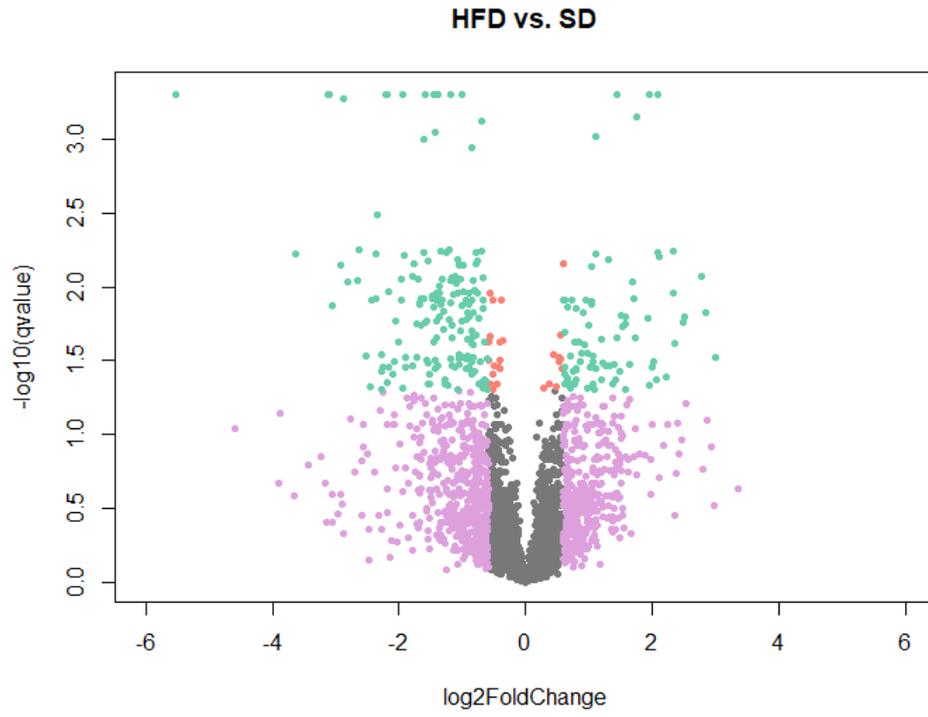
Aus egWAT wurden die enthaltenen Proteine isoliert, durch LC-MS detektiert und mithilfe der Software MaxQuant identifiziert. Zu sehen ist eine Hauptkomponentenanalyse, die mit der Perseus-Software erstellt wurde. SD rot, HFD gelb, SD+MF grün, HFD+MF blau. SD n = 5; HFD n = 5; SD+MF n = 5; HFD+MF n = 4.

4.5.2 Volcano Plots

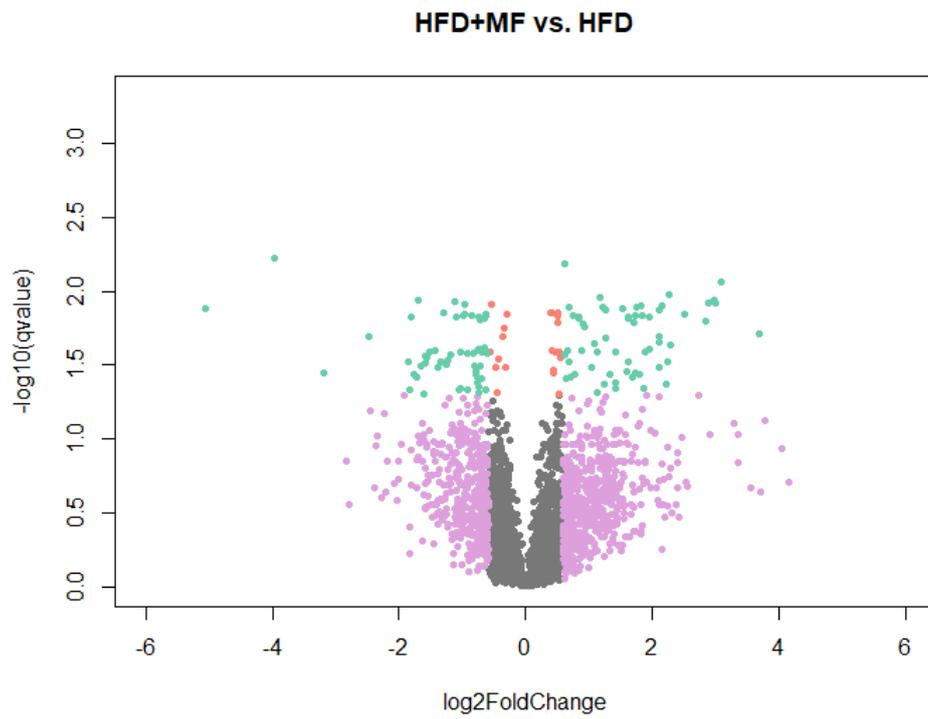
Durch die Darstellung der 3577 Proteine in Volcano Plots lassen sich die Effekte auf die Proteinexpression in den verschiedenen Vergleichen visualisieren. Signifikant regulierte Proteine mit über 1,5fachem Fold Change ($\pm 0,59 \log_2\text{FoldChange}$) und einem q-Wert kleiner 0,05 ($\geq 1,3 -\log_{10}(\text{qvalue})$) werden grün hervorgehoben. Andere Farben codieren Proteine mit geringerem Fold Change oder größerem q-Wert (Abb. 17).

Die Diagramme zeigen, dass im Vergleich HFD vs. SD (Abb. 17a) die höchste Anzahl signifikant veränderter Proteine vorzufinden war, außerdem war auch die Menge an q-Werten kleiner 0,01 ($\geq 2,0 -\log_{10}(\text{qvalue})$) deutlich höher als in den anderen Vergleichen. Des Weiteren zeigte der Vergleich HFD+MF vs. HFD (n = 4; 5) (Abb. 17b) etwas weniger signifikant regulierte Proteine als SD+MF vs. SD (n = 5; 5) (Abb. 17c).

a



b



c

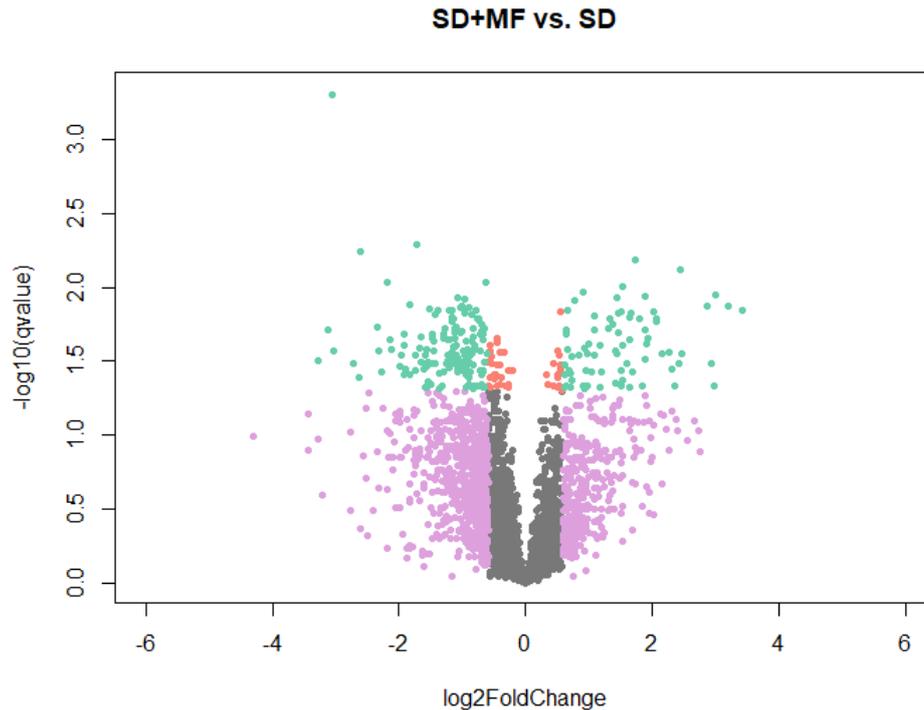


Abb. 17: Volcano Plots aller detektierten Proteine im egWAT an G15,5

Aus egWAT wurden die enthaltenen Proteine isoliert, durch LC-MS detektiert und mithilfe der Software MaxQuant identifiziert. Die weitere statistische Analyse erfolgte in Perseus. Dargestellt sind alle identifizierten Proteine zweier Vergleichsgruppen mit ihrem Fold Change (Vielfaches der Hoch- bzw. Runterregulation) und q-Wert (auf multiples Testen korrigierter p-Wert) in Log-Transformation. Als signifikant veränderte Proteine werden solche mit mindestens 1,5facher Hoch- bzw. Runterregulation und einem q-Wert $< 0,05$ angesehen (grün). Anders farbige Punkte (grau, lila, orange) repräsentieren Proteine, deren Fold Change $< 1,5$ liegt oder deren q-Wert $> 0,05$ beträgt. Für q-Werte $< 0,0005$ gibt Perseus einen Wert = 0 aus, zur logarithmischen Darstellung dieser Werte wurden sie hier gleich 0,0005 gesetzt (entsprechend $\approx 3,3$ $-\log_{10}(\text{qvalue})$). Eine 1,5fache Veränderung entspricht einem $\log_2\text{FoldChange}$ von $\pm 0,59$, ein q-Wert von 0,05 entspricht einem $-\log_{10}(\text{qvalue})$ von 1,3. SD n = 5; HFD n = 5; SD+MF n = 5; HFD+MF n = 4.

Legende: grün Fold Change $> 1,5$ & q-Wert $< 0,05$ (= signifikant verändert); grau Fold Change $< 1,5$ & q-Wert $> 0,05$; lila Fold Change $> 1,5$ & q-Wert $> 0,05$; orange Fold Change $< 1,5$ & q-Wert $< 0,05$.

4.5.3 Venn-Diagramm

Im Folgenden werden nun die signifikant regulierten Proteine (Fold Change $> 1,5$ und q-Wert $< 0,05$) näher betrachtet, die entweder in allen Proben oder in keiner Probe einer Gruppe detektiert wurden. Im Vergleich HFD mit SD waren dies 196 Proteine, in der SD+MF-Gruppe gegenüber SD 181 und bei HFD+MF verglichen mit HFD 103 Proteine (Abb. 18).

Außerdem waren Überschneidungen von Proteinen zu beobachten, die in zwei verschiedenen Vergleichen signifikant reguliert waren. 34 Proteine waren sowohl in HFD vs. SD als auch in SD+MF vs. SD zu finden, alle diese Proteine waren in beiden Vergleichen in dieselbe Richtung verändert. Bei einer Hochregulation eines Proteins in HFD gegenüber SD war es in SD+MF gegenüber SD ebenfalls hochreguliert, bei einer Runterregulation ebenfalls runterreguliert. Dem gegenüber gab es nur fünf Proteine, in denen sich HFD vs. SD und HFD+MF vs. HFD überschneiden. Vier dieser Proteine waren gegengleich reguliert, eins wies hingegen eine Veränderung in dieselbe Richtung auf. Weitere 16 Proteine waren in den beiden Metformin-

behandelten Gruppen gegenüber ihren Vergleichsgruppen verändert (SD+MF vs. SD und HFD+MF vs. HFD), dabei bestand bei allen eine Regulation in dieselbe Richtung. Es gab keine Proteine, die in allen drei Vergleichen signifikant verändert waren.

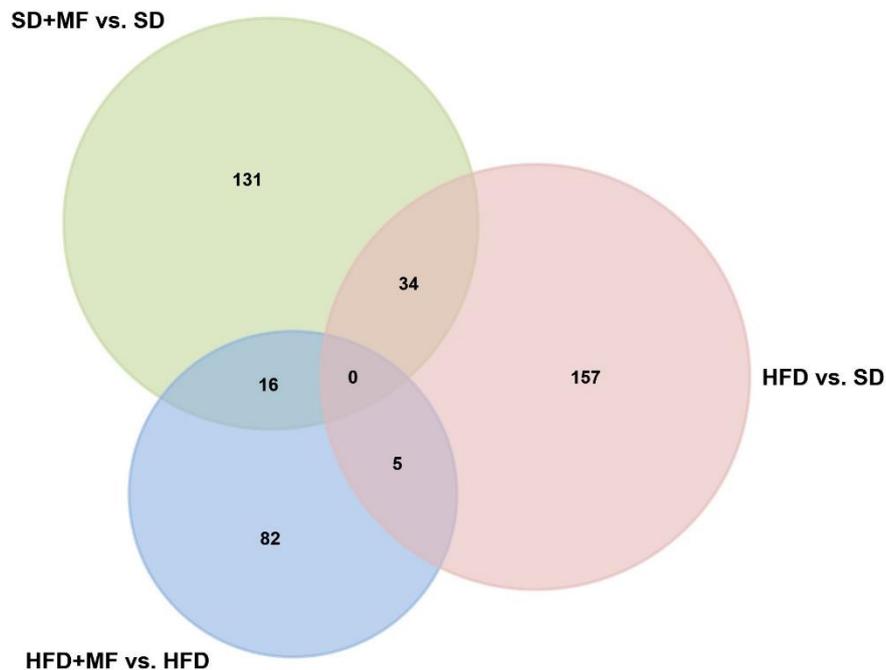


Abb. 18: Venn-Diagramm der signifikant veränderten Proteine aus egWAT an G15,5

Aus egWAT wurden die enthaltenen Proteine isoliert, durch LC-MS detektiert und mithilfe der Software MaxQuant identifiziert. Die weitere statistische Analyse erfolgte in Perseus. Dargestellt sind alle signifikant veränderten Proteine (Fold Change > 1,5, q-Wert < 0,05), die entweder in allen Proben einer Vergleichsgruppe nachgewiesen wurden (valid values = 5 für SD, HFD und SD+MF; valid values = 4 für HFD+MF) oder in keiner Probe einer Gruppe detektiert wurden (valid values = 0). SD n = 5; HFD n = 5; SD+MF n = 5; HFD+MF n = 4.

4.5.4 String-Analysen

Mithilfe der „STRING Database“ können potenzielle Interaktionen zwischen den signifikant regulierten Proteinen und sogenannte „functional enrichments“ ermittelt werden, die basierend auf verschiedenen Datenbanken Hinweise auf die Funktion der Veränderungen geben. Im Folgenden werden potenziell interagierende Proteine ausführlicher betrachtet, um aus der Vielzahl der veränderten Proteine solche mit ähnlichen Funktionen herauszufiltern und eventuell beeinflusste Signal- und Stoffwechselwege zu identifizieren.

4.5.4.1 HFD vs. SD

Im Vergleich HFD vs. SD waren 53 Proteine signifikant hochreguliert und 143 Proteine signifikant runterreguliert. Zwischen 20 dieser hochregulierten Proteine (Abb. 19a) sowie 85 der runterregulierten Proteine (Abb. 19b) wurden potenzielle Interaktionen gezeigt. Ein Protein (Ndufb1, runterreguliert) wurde durch die STRING Database nicht erkannt und somit nicht in der Analyse berücksichtigt.

Unter den hochregulierten Proteinen gehörten 16 aus 20 dem biologischen Prozess der Organisation von Zellkomponenten bzw. der Zytoskelettorganisation an (Abb. 19c grün und

blau). Elf Proteine sind selbst Teil des Zytoskeletts oder beteiligen sich an seiner Organisation (Sptan1, Sptbn1, Prkcdp, Vim, Cald1, Itgb5, Tln2, Tpm4, Myh10, Arrb1, Anxa1), ein Großteil davon gehört zum Aktin-Zytoskelett (Abb. 19a). Eine Gruppe aus sieben Proteinen (Sptbn1, Tmed3, Arrb1, Vamp3, Gak, Anxa1, Anxa2) trägt zum Vesikel-Transport bei. Weitere sieben Proteine wirken an Zelladhäsionsprozessen mit (Sptan1, Lamc1, Itgb5, Itga6, Tln2, Myh10, Gak). In Form von Laminin (Lamc1) war zudem eine Komponente der Basallamina und damit ein Bestandteil der extrazellulären Matrix hochreguliert.

Mit 54 aus 85 waren unter den runterregulierten Proteinen besonders viele mitochondriale Proteine (Abb. 19c rot). Im Gegensatz zu den hochregulierten Proteinen war keins am Zytoskelett oder der extrazellulären Matrix beteiligt. Es waren Proteine aller fünf Komplexe der Atmungskette runterreguliert (Abb. 19b I - V). 13 Proteine waren Komplex I zuzuordnen, drei Proteine gehörten zu Komplex IV und von den Komplexen II, III und IV waren jeweils zwei Proteine runterreguliert. Mit der Pyruvat-Carboxylase (Pcx) war das katalysierende Enzym für die initiale Reaktion der De-novo-Lipogenese und der Glukoneogenese runterreguliert. Zusätzlich war Pdk2 (Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2) als regulatorisches Protein des Glukose- und Lipidmetabolismus runterreguliert. Ebenso zeigte sich eine Runterregulation zahlreicher weiterer Proteine des Lipidmetabolismus, wie der De-novo-Lipogenese (Acy, Fasn, Acaca, Acss2, Acss3, Acsf3, Mlycd), der Lipogenese-Regulation (Thrsp, Mid1ip1; Abb. 19b %) und der β -Oxidation (Acat2, Mlycd, Acadsb, Acox1, Gcdh). Vier glykolytische Proteine (Pkm, Gpi, Hk2, Pfk1) und verschiedene Proteine multipler anderer Stoffwechselwege, wie der Acetyl-CoA-Synthese, des Pyruvat- und Glutamat-Metabolismus, sowie des Pentosephosphatwegs, zeigten sich ebenfalls runterreguliert (Pdha1, Dld, Me1, Aldh4a1, Glul, Tkt). Auch fünf Proteine des Glykogenmetabolismus waren runterreguliert, die sowohl die Glykogensynthese als auch die Glykogenolyse betrafen (Gys1, Gbe1, Ugp2, Agl, Pygl). Mit der Aldehyddehydrogenase-2 (Aldh2; Abb. 19b \$) und Thioredoxin-2 (Txn2; Abb. 19b §) waren zwei mitochondriale Proteine runterreguliert, die oxidativem Stress entgegenwirken. Ergänzend waren auch zwei Thioredoxin-Reduktasen (Txnrd1, Txnrd2) und das durch Thioredoxin aktivierte Antioxidans Mpst runterreguliert (Abb. 19b §).

c

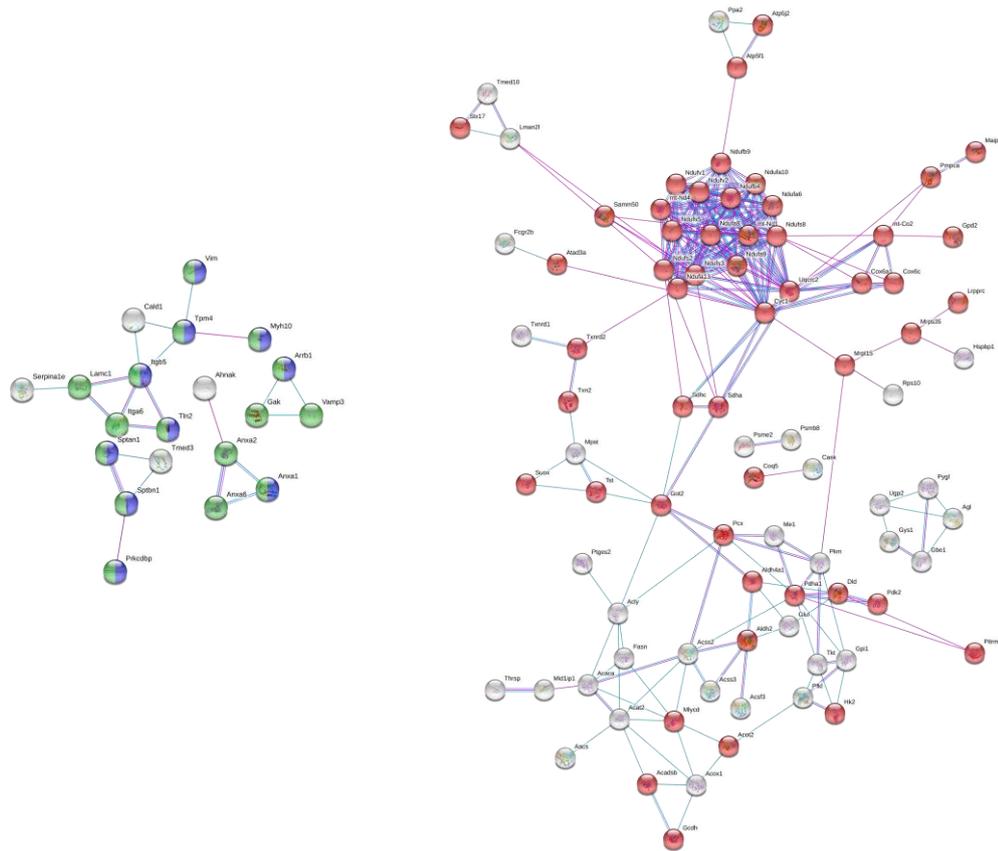


Abb. 19: Potenziell interagierende Proteine im Vergleich HFD vs. SD

Aus egWAT wurden die enthaltenen Proteine isoliert, durch LC-MS detektiert und mithilfe der Software MaxQuant identifiziert. Die weitere statistische Analyse erfolgte in Perseus. Alle signifikant veränderten Proteine (Fold Change > 1,5, q-Wert < 0,05), die entweder in allen Proben einer Vergleichsgruppe nachgewiesen wurden (valid values = 5) oder in keiner Probe einer Gruppe detektiert wurden (valid values = 0), wurden einer String-Analyse unterzogen. Dargestellt sind hochregulierte (a) und runterregulierte Proteine (b) mit potenziellen Interaktionen, sowie farblich hervorgehobene functional enrichments der hoch- und runterregulierten Proteine (c) im Vergleich von HFD mit SD. Nicht konnectierte Knoten wurden ausgeblendet. SD n = 5; HFD n = 5. Legende: Farbige Verbindungslinien = Interaktionen (basierend auf kuratierten Datenbanken **hellblau**/ experimentell bestimmt **pink**/ Protein-Homologie **lila**); (b) I, II, III, IV und V = Komplex 1 - 5 der Atmungskette; Proteine der Atmungskette und mitochondriale Proteine rot, des Glykogen-Metabolismus blau, des Lipid-Metabolismus gelb sowie des Glukose-Metabolismus und anderen grün unterlegt; % für Thrsp & Mid1ip1, \$ für Aldh2, § für Txn2, Txnr1, Txnr2 & Mpst; (c) Organisation von Zellkomponenten **grün**, Zytoskelett-Organisation **blau**, mitochondriale Proteine **rot**.

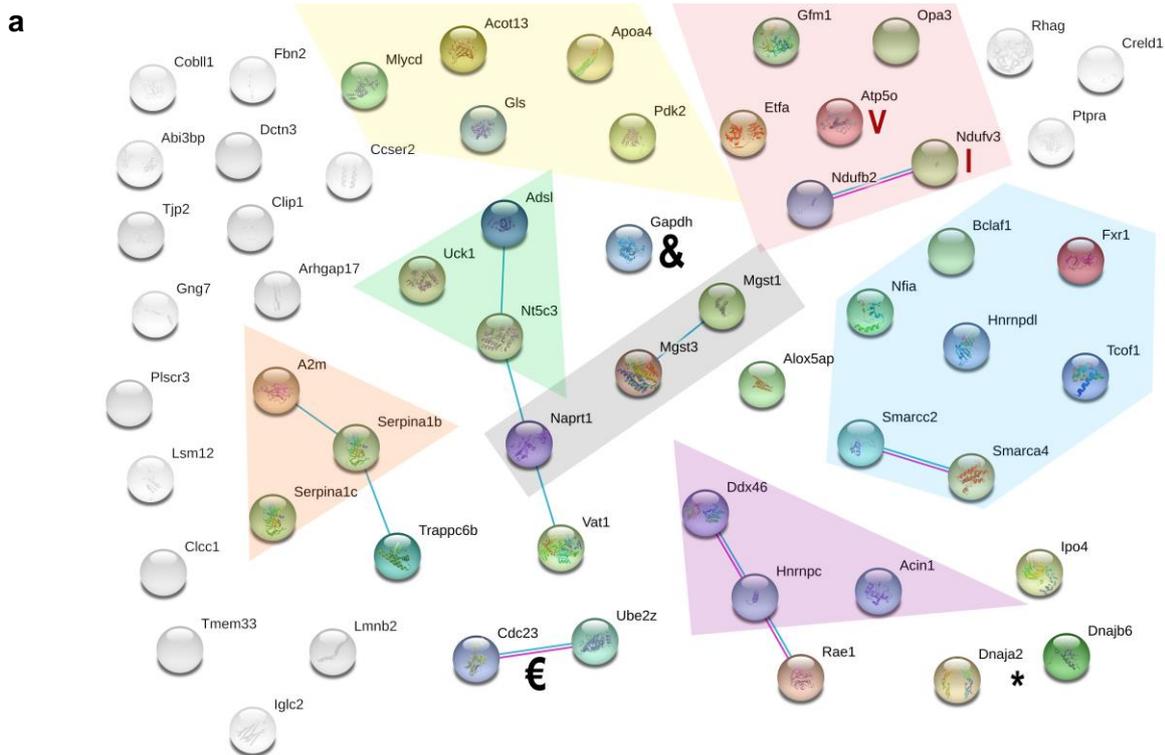
4.5.4.2 HFD+MF vs. HFD

Im Vergleich HFD+MF vs. HFD waren 58 Proteine signifikant hochreguliert und 45 Proteine signifikant runterreguliert. Darunter zeigten 18 hochregulierte (Abb. 20a) sowie 16 runterregulierte Proteine (Abb. 20b) potenzielle Interaktionen.

Mit 30 aus 58 waren die meisten der hochregulierten Proteine dem Zellkern zuzuordnen (Abb. 20c gelb), zwölf Proteine gehörten zum Mitochondrium (Abb. 20c rot). Sieben Proteine, die die Transkription (Smarca4, Smarcc2, Nfia, Hnrnpdl, Bclaf1) und Translation (Fxr1, Tcof1) regulieren, waren hochreguliert (Abb. 20a blau). Dazu war auch eine Hochregulation von Adsl, Nt5c3a und Uck1 zu sehen (Abb. 20a grün), die an der Ribonukleotid-Synthese beteiligt sind. Zudem waren auch drei Proteine (Hnrnpc, Acin1, Ddx46) hochreguliert, die als Bestandteile

des Spleißosoms beim RNA-Spleißen mitwirken (Abb. 20a lila). Proteine aus Komplex I (Ndufv3, Ndufb2) und Komplex V (Atp5o) der Atmungskette, sowie weitere Proteine der Mitochondrien-Organisation (Opa3, Etfa, Gfm1) waren ebenfalls hochreguliert (Abb. 20a rot). Mit Mgst1, Mgst3 und Naprt waren drei Proteine hochreguliert, die oxidativen Stress reduzieren (Abb. 20a grau). Zusätzlich war auch eine Hochregulation von Proteinen der Immunantwort (A2m, Serpina1b, Serpina1c) zu sehen (Abb. 20a orange). Verschiedene Proteine des Lipid-Metabolismus (Mlycd, Acot13, APOA4, Pdk2) waren hochreguliert (Abb. 20a gelb), ebenso wie das glykolytisch wirkende Gapdh (Abb. 20a &). Schließlich waren noch zwei Proteine hochreguliert, die an der Ubiquitinierung beteiligt sind (Abb. 20a €), sowie Proteine, die an der Faltung von Proteinen (Dnaja2, Dnajb6) und der DNA-Organisation (Ipo4) mitwirken (Abb. 20a *).

Die Analyse der runterregulierten Proteine ergab nur wenige functional enrichments. Es wurde lediglich ein UniProt Keyword erkannt (Acetylierung), außerdem konnten 14 der 45 Proteine dem endoplasmatischen Retikulum (Abb. 20c pink) zugeordnet werden, drei davon zeigten zusätzlich eine Golgi-Assoziation (Abb. 20c hellblau).



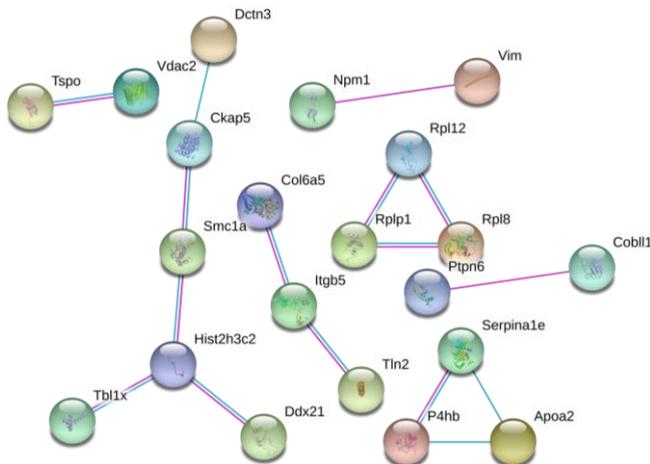
4.5.4.3 SD+MF vs. SD

Im Vergleich SD+MF vs. SD waren 66 Proteine signifikant hochreguliert sowie 115 Proteine signifikant runterreguliert. Zwischen 21 der hochregulierten (Abb. 21a) und 45 der runterregulierten Proteine (Abb. 21b) wurden potenzielle Interaktionen erkannt. Zwei Proteine (Ig kappa chain V-V region HP 93G7, hochreguliert; Ndufb1, runterreguliert) wurden durch die STRING Database nicht erkannt und wurden somit nicht in der Analyse berücksichtigt.

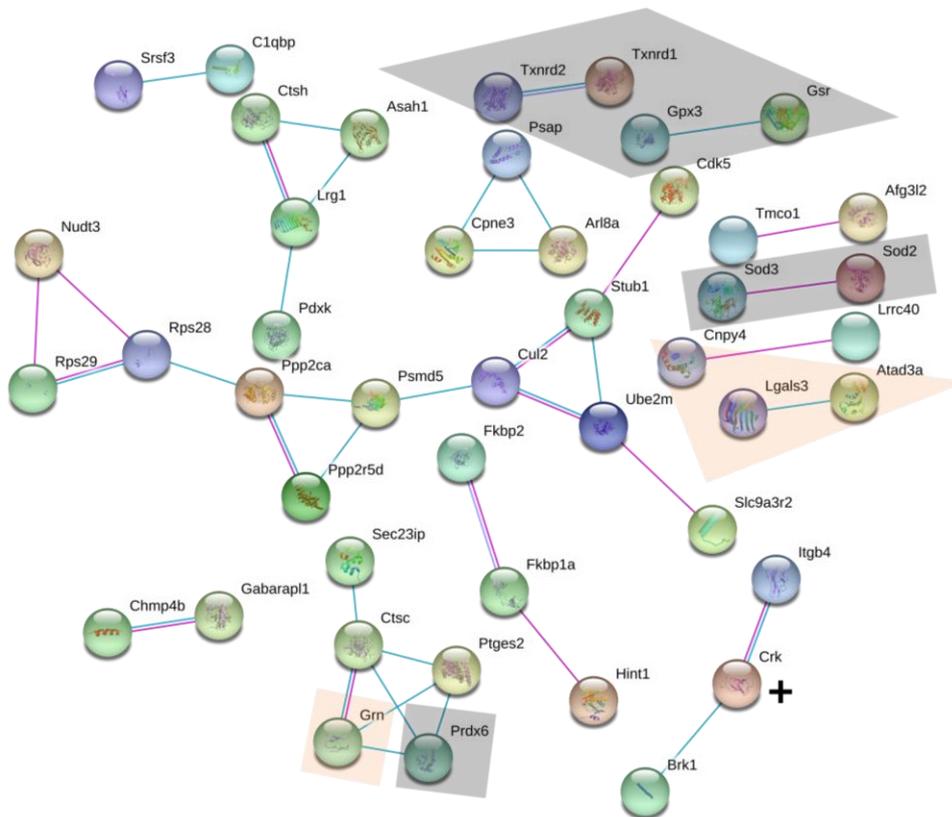
Drei der hochregulierten Proteine (Abb. 21a) waren an der Zelladhäsion beteiligt (Col6a5, Itgb5, Tln2), sowie am Zytoskelett (Vim) und dessen Organisation (Ckap5), das runterregulierte Dctn3 fungiert als Motorprotein. Des Weiteren war eine Runterregulation einer Gruppe ribosomaler Proteine (Rpl12, Rplp1, Rpl8) und zweier Proteine, die die RNA-Transkription beeinflussen (Tbl1x, Ddx21), zu beobachten.

Unter den 45 interagierenden runterregulierten Proteine waren sieben lysosomale Proteine (Abb. 21c braun) und zehn Proteine des endoplasmatischen Retikulums (Abb. 21c pink). Außerdem waren 16 Proteine mit den Reactome-Pathways des angeborenen Immunsystems (Abb. 21c orange) bzw. der neutrophilen Granulation (Abb. 21c lila) assoziiert. Zusätzlich waren vier weitere Proteine (Cnpy4, Lgals3, Atad3a, Grn) runterreguliert, die an Immunprozessen beteiligt sind (Abb. 21b orange). Mit Txnrd1, Txnrd2, Gpx3, Gsr, Sod2, Sod3 und Prdx6 waren sieben Proteine runterreguliert, die oxidativem Stress entgegenwirken (Abb. 21b grau). Schließlich war eine Runterregulation von drei Proteinen (Itgb4, Crk, Brk1; Abb. 21b +) zu beobachten, die am Zytoskelett bzw. der Zelladhäsion mitwirken.

a



b



c

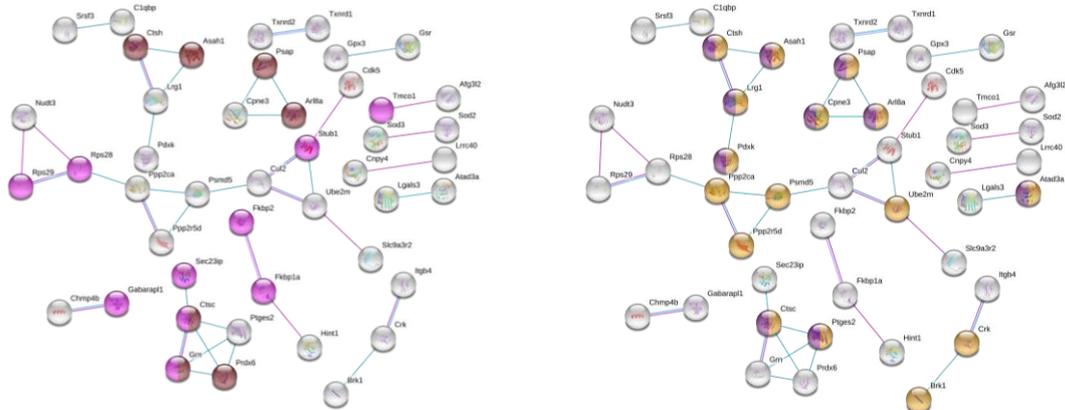


Abb. 21: Potenziell interagierende Proteine im Vergleich SD+MF vs. SD

Aus egWAT wurden die enthaltenen Proteine isoliert, durch LC-MS detektiert und mithilfe der Software MaxQuant identifiziert. Die weitere statistische Analyse erfolgte in Perseus. Alle signifikant veränderten Proteine (Fold Change > 1,5, q-Wert < 0,05), die entweder in allen Proben einer Vergleichsgruppe nachgewiesen wurden (valid values = 5) oder in keiner Probe einer Gruppe detektiert wurden (valid values = 0), wurden einer String-Analyse unterzogen. Dargestellt sind hochregulierte (a) und runterregulierte Proteine (b) mit potenziellen Interaktionen, sowie farblich hervorgehobene functional enrichments der runterregulierten Proteine (c) im Vergleich von SD+MF mit SD. Nicht konnectierte Knoten wurden ausgeblendet. SD n = 5; SD+MF n = 5.

Legende: Farbige Verbindungslinien = Interaktionen (basierend auf kuratierten Datenbanken [hellblau](#)/ experimentell bestimmt [pink](#)/ Protein-Homologie [lila](#)); (b) Proteine der oxidativen Stress-Regulation grau, sowie an Immunprozessen beteiligte Proteine orange unterlegt; + für Itgb4, Crk & Brk1; (c) lysosomale Proteine [braun](#), Proteine des endoplasmatischen Retikulums [pink](#), assoziiert mit angeborenem Immunsystem [orange](#), assoziiert mit neutrophiler Granulation [lila](#).

4.5.5 Übersichtstabellen der signifikant regulierten Proteine

Dieses Kapitel enthält eine tabellarische Übersicht über alle signifikant veränderten Proteine (Fold Change > 1,5, q-Wert < 0,05) in den drei verschiedenen Vergleichen, die entweder in allen Proben oder in keiner Probe einer Gruppe nachgewiesen wurden. Zudem ist eine Übersicht der gleichzeitig in beiden Metformin-behandelten Gruppen signifikant regulierten Proteine sowie der gleichzeitig durch HFD als auch durch HFD+MF signifikant regulierten Proteine enthalten.

4.5.5.1 HFD vs. SD

Tabelle 10: Signifikant hochregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in HFD vs. SD

53 Proteine waren in HFD verglichen mit SD signifikant hochreguliert (Fold Change > 1,5 & q-Wert < 0,05). Angegeben sind Protein-ID, Proteinname, Gen, q-Wert (auf multiples Testen korrigierter p-Wert), Fold Change (Vielfaches der Veränderung) und valid values beider Vergleichsgruppen (= Anzahl der Proben, in denen ein Protein nachgewiesen wurde). Die Übersicht ist nach ihrem Fold Change sortiert. Pro Gruppe wurden 5 Proben analysiert.

ID	Proteinname	Gen	q-Wert	Fold Change	valid values HFD	valid values SD
P27601	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	Gna13	< 0,01	6,92	5	0
Q6PGH2	Hematological and neurological expressed 1-like protein	Hn1l	< 0,05	5,72	5	0
Q0PD20	Ras-related protein Rab-34	Rab34	< 0,01	5,04	5	0
A0A0R4J0F6	Cyclin-G-associated kinase	Gak	< 0,0005	4,27	5	0
Q9WTQ5	A-kinase anchor protein 12	Akap12	< 0,01	4,23	5	5
Q9Z0F7	Gamma-synuclein	Sncg	< 0,05	4,03	5	5
P26645	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Marcks	< 0,05	4,03	5	5
Q3THG9	Alanyl-tRNA editing protein Aarsd1	Aarsd1	< 0,0005	3,88	5	0
Q8CG16	Complement C1r-A subcomponent	C1ra	< 0,05	3,83	5	0
Q6PE70	Integrin beta-5	Itgb5	< 0,001	3,35	5	0
Q8K0C9	GDP-mannose 4,6 dehydratase	Gmds	< 0,05	3,27	5	0
E9PUM4	Talin-2	Tln2	< 0,01	3,20	5	5
E9QA16	Caldesmon 1	Cald1	< 0,05	2,98	5	5
Q8BH58	TIP41-like protein	Tipr1	< 0,05	2,90	5	0
P06728	Apolipoprotein A-IV	Apoa4	< 0,0005	2,73	5	5
Q3UH59	Myosin-10	Myh10	< 0,05	2,69	5	5
O88492	Perilipin-4	Plin4	< 0,05	2,61	5	5
P17439	Glucosylceramidase	Gba	< 0,01	2,49	5	0
Q9DCC5	Chromobox protein homolog 3	Cbx3	< 0,05	2,32	5	5
Q63918	Serum deprivation-response protein	Sdpr	< 0,05	2,31	5	5
P10107	Annexin A1	Anxa1	< 0,001	2,16	5	5
P63024	Vesicle-associated membrane protein 3	Vamp3	< 0,05	2,15	5	5
B1AQF4	Dual specificity protein phosphatase 3	Dusp3	< 0,05	2,13	5	5
Q9Z0P4	Paralemmin-1	Palm	< 0,05	2,10	5	5
Q91VJ2	Protein kinase C delta-binding protein	Prkcdbp	< 0,05	2,09	5	5
Q9DBX6	Cytochrome P450 2S1	Cyp2s1	< 0,05	2,09	5	5

Q00898	Alpha-1-antitrypsin 1-5	Serpina1e	< 0,05	2,05	5	5
P07356	Annexin A2	Anxa2	< 0,01	2,04	5	5
Q61792	LIM and SH3 domain protein 1	Lasp1	< 0,05	2,04	5	5
Q8BGD9	Eukaryotic translation initiation factor 4B	Eif4b	< 0,05	2,01	5	5
Q8BJW6	Eukaryotic translation initiation factor 2A	Eif2a	< 0,05	1,98	5	5
P27546	Microtubule-associated protein 4	Map4	< 0,05	1,92	5	5
O54724	Polymerase I and transcript release factor	Ptrf	< 0,05	1,90	5	5
A0A0R4J034	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	Pdxdc1	< 0,05	1,89	5	5
P31324	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit	Prkar2b	< 0,05	1,83	5	5
Q61739	Integrin alpha-6	Itga6	< 0,05	1,81	5	5
P48036	Annexin A5	Anxa5	< 0,05	1,79	5	5
Q78IS1	Transmembrane emp24 domain-containing protein 3	Tmed3	< 0,05	1,75	5	5
E9Q8I9	Protein furry homolog	Fry	< 0,05	1,74	5	0
J3QNU6	Beta-arrestin-1	Arrb1	< 0,05	1,73	5	5
Q8R2Y2	Cell surface glycoprotein MUC18	Mcam	< 0,05	1,70	5	5
F8VQJ3	Laminin subunit gamma-1	Lamc1	< 0,05	1,70	5	5
Q6IRU2	Tropomyosin alpha-4 chain	Tpm4	< 0,05	1,66	5	5
Q9JIW9	Ras-related protein Ral-B	Ralb	< 0,05	1,64	5	5
A2AVJ7	Ribosome-binding protein 1	Rrbp1	< 0,05	1,63	5	5
P20152	Vimentin	Vim	< 0,05	1,60	5	5
F7AAP4	Calcium-transporting ATPase	Atp2b4	< 0,05	1,59	5	5
A3KGU7	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	Sptan1	< 0,05	1,58	5	5
E9Q616	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	Ahnak	< 0,05	1,54	5	5
Q62261	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	Sptbn1	< 0,05	1,54	5	5
P47955	60S acidic ribosomal protein P1	Rplp1	< 0,05	1,54	5	5
Q9CWF2	Tubulin beta-2B chain	Tubb2b	< 0,05	1,53	5	5
F8WIT2	Annexin A6	Anxa6	< 0,05	1,53	5	5

Tabelle 11: Signifikant runterregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in HFD vs. SD

143 Proteine waren in HFD verglichen mit SD signifikant runterreguliert (Fold Change > 1,5 & q-Wert < 0,05). Angegeben sind Protein-ID, Proteinname, Gen, q-Wert (auf multiples Testen korrigierter p-Wert), Fold Change (Vielfaches der Veränderung) und valid values beider Vergleichsgruppen (= Anzahl der Proben, in denen ein Protein nachgewiesen wurde). Die Übersicht ist nach ihrem Fold Change sortiert. Pro Gruppe wurden 5 Proben analysiert.

ID	Proteinname	Gen	q-Wert	Fold Change	valid values HFD	valid values SD
Q62264	Thyroid hormone-inducible hepatic protein	Thrsp	< 0,01	12,47	5	5
Q9JK42	Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2	Pdk2	< 0,0005	8,76	0	5
Q3V117	ATP-citrate synthase	Acly	< 0,0005	8,52	5	5
F8VPN4	4-alpha-glucanotransferase	Agl	< 0,05	8,32	5	5
Q5SWU9	Acetyl-CoA carboxylase 1	Acaca	< 0,001	7,32	5	5
Q80Y98	Phospholipase DDHD2	Ddhd2	< 0,01	6,98	5	5

Q99J39	Malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial	Mlycd	< 0,01	6,34	0	5
Q8R2U6	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 2	Nudt4	< 0,05	5,36	0	5
Q3TJZ6	Protein FAM98A	Fam98a	< 0,05	5,17	0	5
A2AQN4	Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic	Acss2	< 0,01	5,15	5	5
A0A1B0GT63	Transmembrane protein 143	Tmem143	< 0,01	5,09	0	5
Q9CQ20	Mid1-interacting protein 1	Mid1ip1	< 0,05	4,85	0	5
Q8BGS7	Choline/ethanolaminophosphotransferase 1	Cept1	< 0,05	4,81	0	5
P19096	Fatty acid synthase	Fasn	< 0,0005	4,64	5	5
Q64521	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	Gpd2	< 0,0005	4,58	5	5
Q9CXI0	2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase, mitochondrial	Coq5	< 0,05	4,29	0	5
A2AQZ2	Phytanoyl-CoA dioxygenase domain-containing protein 1	Phyhd1	< 0,05	4,15	0	5
Q9CR26	Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	Vta1	< 0,05	4,05	0	5
B7ZMP1	Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3	Xpnpep3	< 0,05	3,93	0	5
G3UZY2	Thioredoxin, mitochondrial	Txn2	< 0,01	3,88	0	5
Q8K0Z7	Translational activator of cytochrome c oxidase 1	Taco1	< 0,0005	3,83	0	5
P06801	NADP-dependent malic enzyme	Me1	< 0,01	3,78	5	5
D3Z4P2	VIP36-like protein	Lman2l	< 0,01	3,47	0	5
Q8BHE8	Uncharacterized protein C2orf47 homolog, mitochondrial	Maip1	< 0,01	3,41	0	5
P70444	BH3-interacting domain death agonist	Bid	< 0,01	3,25	0	5
Q9D2R0	Acetoacetyl-CoA synthetase	Aacs	< 0,05	3,17	5	5
Q99LB7	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial	Sardh	< 0,05	3,17	5	5
O08528	Hexokinase-2	Hk2	< 0,05	3,07	5	5
P13516	Acyl-CoA desaturase 1	Scd1	< 0,01	3,07	5	5
A2AKN9	Major urinary protein 6	Mup4	< 0,01	3,04	5	5
P52196	Thiosulfate sulfurtransferase	Tst	< 0,0005	2,99	5	5
Q9CZB0	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial	Sdhc	< 0,05	2,97	5	5
A0A1L1SRX2	AMP deaminase 3	Ampd3	< 0,05	2,93	5	5
Q8JZU2	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	Slc25a1	< 0,01	2,92	5	5
Q8VHY0	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	Cspg4	< 0,05	2,90	5	5
A0A0R4J0L6	28S ribosomal protein S35, mitochondrial	Mrps35	< 0,05	2,88	0	5
A2A848	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	Acox1	< 0,05	2,87	5	5
E9PXY1	Cullin-4B	Cul4b	< 0,05	2,80	0	5
A0A140T8R8	DCN1-like protein	Dcun1d1	< 0,05	2,76	0	5
Q8R086	Sulfite oxidase, mitochondrial	Suox	< 0,0005	2,72	5	5
Q9D024	Coiled-coil domain-containing protein 47	Ccdc47	< 0,05	2,71	5	5
Q9D6M3	Mitochondrial glutamate carrier 1	Slc25a22	< 0,001	2,69	5	5
Q922B1	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase MACROD1	MacroD1	< 0,05	2,68	5	5
P30115	Glutathione S-transferase A3	Gsta3	< 0,05	2,67	5	5

P40142	Transketolase	Tkt	< 0,05	2,66	5	5
Q9DCW5	Cytochrome c oxidase subunit 6A, mitochondrial	Cox6a1	< 0,05	2,65	5	5
S4R225	WD repeat-containing protein 13	Wdr13	< 0,05	2,64	0	5
Q8K3J1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial	Ndufs8	< 0,05	2,64	5	5
Q8K411	Presequence protease, mitochondrial	Pitrm1	< 0,05	2,63	5	5
Q9D6Y9	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	Gbe1	< 0,0005	2,60	5	5
Q9D023	Mitochondrial pyruvate carrier 2	Mpc2	< 0,05	2,60	5	5
Q8CFR5	Dystrobrevin	Dtna	< 0,05	2,59	0	5
Q99LY9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	Ndufs5	< 0,05	2,59	5	5
A0A0R3P9C8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	Ndufa9	< 0,05	2,59	5	5
Q9CYV5	Transmembrane protein 135	Tmem135	< 0,01	2,58	0	5
A0A0B4J1G1	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II	Fcgr2b	< 0,05	2,56	0	5
Q3URE1	Acyl-CoA synthetase family member 3, mitochondrial	Acsf3	< 0,05	2,56	5	5
J3QMN4	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	Txnrd2	< 0,01	2,55	5	5
A0A0R4J023	Methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial	Auh	< 0,05	2,52	5	5
Q9QZA0	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial	Ca5b	< 0,01	2,48	5	5
Q8CAY6	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	Acat2	< 0,05	2,47	5	5
Q8R164	Valacyclovir hydrolase	Bphl	< 0,05	2,46	5	5
Q9D0I4	Syntaxin-17	Stx17	< 0,05	2,44	0	5
O70589	Peripheral plasma membrane protein CASK	Cask	< 0,05	2,43	0	5
Q9CPR5	39S ribosomal protein L15, mitochondrial	Mrpl15	< 0,05	2,42	0	5
Q9CQZ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	Ndufa6	< 0,01	2,39	5	5
E9QLB2	Lysophospholipase-like protein 1	Lyplal1	< 0,05	2,34	5	5
Q9DBL1	Short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acadsb	< 0,01	2,33	5	5
Q9CPQ1	Cytochrome c oxidase subunit 6C	Cox6c	< 0,05	2,30	5	5
E9QNL5	Sulfotransferase	Sult1a1	< 0,05	2,29	5	5
Q91VM9	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial	Ppa2	< 0,05	2,28	5	5
Q9CR62	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	Slc25a11	< 0,0005	2,27	5	5
Q8BWM0	Prostaglandin E synthase 2	Ptges2	< 0,01	2,27	5	5
G5E8R3	Pyruvate carboxylase	Pcx	< 0,05	2,25	5	5
F8WIU1	UPF0687 protein C20orf27 homolog	1700037 H04Rik	< 0,05	2,25	5	5
Q9CQC7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	Ndufb4	< 0,01	2,25	5	5
Q8K0C4	Lanosterol 14-alpha demethylase	Cyp51a1	< 0,05	2,23	0	5
Q505D7	Optic atrophy 3 protein homolog	Opa3	< 0,05	2,20	0	5
Q9ET01	Glycogen phosphorylase, liver form	Pygl	< 0,01	2,17	5	5
A0A0R4J1R7	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase 2	Pcbd2	< 0,05	2,17	5	5
P0DN34	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1	Ndufb1	< 0,01	2,14	5	5

D3YUM1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	Ndufv1	< 0,05	2,10	5	5
O88696	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial	Clpp	< 0,01	2,10	5	5
Q9ERS2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	Ndufa13	< 0,05	2,10	5	5
Q99JR6	Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase 3	Nmnat3	< 0,05	2,09	0	5
Q9D7J9	Enoyl-CoA hydratase domain-containing protein 3, mitochondrial	Echdc3	< 0,01	2,08	5	5
Q99LS3	Phosphoserine phosphatase	Psph	< 0,05	2,07	5	5
Q91WD5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	Ndufs2	< 0,05	2,07	5	5
Q9CQQ7	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	Atp5f1	< 0,01	2,06	5	5
A0A1B0GT92	Glycogen [starch] synthase, muscle	Gys1	< 0,05	2,03	5	5
Q99LC3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	Ndufa10	< 0,0005	2,02	5	5
Q14DH7	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3, mitochondrial	Acss3	< 0,05	2,01	5	5
P56135	ATP synthase subunit f, mitochondrial	Atp5j2	< 0,05	2,00	5	5
Q9CQJ8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	Ndufb9	< 0,05	2,00	5	5
Q7TMG8	Protein NipSnap homolog 2	Gbas	< 0,01	1,99	5	5
P00405	Cytochrome c oxidase subunit 2	mt-Co2	< 0,05	1,99	5	5
Q99P31	Hsp70-binding protein 1	Hspbp1	< 0,05	1,93	0	5
Q91ZJ5	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Ugp2	< 0,05	1,91	5	5
Q8CHT0	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	Aldh4a1	< 0,05	1,91	5	5
A0A0A0MQ68	Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Gcdh	< 0,05	1,91	5	5
Q9DBL7	Bifunctional coenzyme A synthase	Coasy	< 0,05	1,90	5	5
P35486	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	Pdha1	< 0,05	1,88	5	5
Q9DCT2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial	Ndufs3	< 0,05	1,87	5	5
P03911	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4	mt-Nd4	< 0,05	1,87	5	5
P52480	Pyruvate kinase PKM	Pkm	< 0,05	1,86	5	5
Q9QZD8	Mitochondrial dicarboxylate carrier	Slc25a10	< 0,05	1,85	5	5
Q8BGC4	Zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing protein 2	Zadh2	< 0,05	1,82	5	5
Q91VT4	Carbonyl reductase family member 4	Cbr4	< 0,05	1,82	5	5
Q8CG76	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	Akr7a2	< 0,05	1,81	5	5
P97372	Proteasome activator complex subunit 2	Psme2	< 0,05	1,80	5	5
P03888	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	mt-Nd1	< 0,05	1,80	5	5
Q9QYR9	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial	Acot2	< 0,05	1,80	5	5
Q9D0M3	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial	Cyc1	< 0,01	1,79	5	5
Q9DC61	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	Pmpca	< 0,05	1,79	5	5
P14142	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4	Slc2a4	< 0,05	1,79	5	5
P05202	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	Got2	< 0,05	1,78	5	5

Q9DCJ5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	Ndufa8	< 0,05	1,77	5	5
Q9DB77	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Uqcrc2	< 0,01	1,77	5	5
Q92511	ATPase family AAA domain-containing protein 3	Atad3	< 0,05	1,76	5	5
Q8CGK3	Lon protease homolog, mitochondrial	Lonp1	< 0,05	1,74	5	5
Q8K2B3	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Sdha	< 0,01	1,72	5	5
P06745	Glucose-6-phosphate isomerase	Gpi	< 0,01	1,72	5	5
Q3UW66	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	Mpst	< 0,05	1,72	5	5
P55302	Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein	Lrpap1	< 0,05	1,70	5	5
P12382	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	Pfkl	< 0,01	1,70	5	5
Q6PB66	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	Lrprrc	< 0,05	1,67	5	5
Q9R1J0	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	Nsdhl	< 0,05	1,67	5	5
Q9D172	ES1 protein homolog, mitochondrial	D10Jhu81e	< 0,05	1,64	5	5
Q9DAR7	m7GpppX diphosphatase	Dcps	< 0,01	1,63	5	5
P47738	Aldehyddehydrogenase-2	Aldh2	< 0,05	1,62	5	5
Q8BQ47	Protein canopy homolog 4	Cnpy4	< 0,001	1,62	5	5
Q9JMH6	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	Txnrd1	< 0,01	1,60	5	5
Q9D1D4	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	Tmed10	< 0,05	1,60	5	5
Q9D6J6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	Ndufv2	< 0,05	1,60	5	5
O08749	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	Dld	< 0,05	1,59	5	5
P63325	40S ribosomal protein S10	Rps10	< 0,05	1,58	5	5
Q8BGH2	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	Samm50	< 0,05	1,58	5	5
P15105	Glutamine synthetase	Glul	< 0,05	1,58	5	5
Q03958	Prefoldin subunit 6	Pfdn6	< 0,05	1,56	5	5
Q8R0Y6	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Aldh111	< 0,05	1,55	5	5
Q9CY27	Very-long-chain enoyl-CoA reductase	Tecr	< 0,05	1,54	5	5
P28063	Proteasome subunit beta type-8	Psmb8	< 0,05	1,52	5	5
Q9R0X4	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	Acot9	< 0,05	1,52	5	5

4.5.5.2 HFD+MF vs. HFD

Tabelle 12: Signifikant hochregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in HFD+MF vs. HFD

58 Proteine waren in HFD+MF verglichen mit HFD signifikant hochreguliert (Fold Change > 1,5 & q-Wert < 0,05). Angegeben sind Protein-ID, Proteinname, Gen, q-Wert (auf multiples Testen korrigierter p-Wert), Fold Change (Vielfaches der Veränderung) und valid values beider Vergleichsgruppen (= Anzahl der Proben, in denen ein Protein nachgewiesen wurde). Die Übersicht ist nach ihrem Fold Change sortiert. Es wurden 4 HFD+MF-Proben und 5 HFD-Proben analysiert.

ID	Proteinname	Gen	q-Wert	Fold Change	valid values HFD+MF	valid values HFD
S4R211	Serine-rich coiled-coil domain-containing protein 2	Ccser2	< 0,05	13,01	4	0
Q9Z0Y1	Dynactin subunit 3	Dctn3	< 0,01	8,53	4	0

Q61555	Fibrillin-2	Fbn2	< 0,05	8,00	4	0
B1AZ15	Cordon-bleu protein-like 1	Cobll1	< 0,05	7,94	4	0
Q9CQR4	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	Acot13	< 0,05	7,46	4	0
Q99J39	Malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial	Mlycd	< 0,05	7,19	4	0
Q8K019	Bcl-2-associated transcription factor 1	Bclaf1	< 0,05	5,71	4	0
Q8K0D5	Elongation factor G, mitochondrial	Gfm1	< 0,05	4,87	4	0
D3YEQ3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	Hnrnpdl	< 0,05	4,80	4	0
Q99JC1	Ig lambda-2 chain C region	Iglc2	< 0,05	4,73	4	0
Q9QUT0	Ammonium transporter Rh type A	Rhag	< 0,05	4,69	4	0
Q59IW6	ABI gene family, member 3 (NESH)-binding protein	Abi3bp	< 0,05	4,44	4	0
Q9JK42	Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2	Pdk2	< 0,05	4,35	4	0
Q9D0R8	Protein LSM12 homolog	Lsm12	< 0,05	4,35	4	0
Q6GQT1	Alpha-2-macroglobulin-P	A2m	< 0,05	4,29	4	5
G3X9Q2	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	Gng7	< 0,05	4,29	4	0
P52623	Uridine-cytidine kinase 1	Uck1	< 0,05	3,87	4	0
A0A0R4J1Z3	Transmembrane protein 33	Tmem33	< 0,05	3,86	4	0
Q9CPU2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 2, mitochondrial	Ndufb2	< 0,05	3,71	4	0
Q61584	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	Fxr1	< 0,05	3,57	4	0
Q569Z5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	Ddx46	< 0,05	3,55	4	0
B1AUB9	Nuclear factor 1-A	Nfia	< 0,05	3,48	4	0
A0A0G2JER9	DnaJ homolog subfamily B member 6	Dnajb6	< 0,05	3,36	4	0
Q8CC86	Nicotinate phosphoribosyltransferase	Naprt	< 0,05	3,35	4	0
Q9D020	Cytosolic 5-nucleotidase 3A	Nt5c3a	< 0,05	3,34	4	0
F6RJ39	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	Acin1	< 0,05	3,34	4	0
H3BL37	Treacle protein	Tcof1	< 0,05	3,30	4	0
Q3UE37	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z	Ube2z	< 0,05	3,21	4	0
A0A0R4J1W7	Cell division cycle protein 23 homolog	Cdc23	< 0,05	3,08	4	0
Q9JIZ9	Phospholipid scramblase 3	Plscr3	< 0,05	3,08	4	0
Q3U422	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial	Ndufv3	< 0,05	3,04	4	5
Q9D289	Trafficking protein particle complex subunit 6B	Trappc6b	< 0,05	2,88	4	5
D3Z2Z1	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	Clip1	< 0,05	2,69	4	0
Q8VI75	Importin-4	Ipo4	< 0,05	2,69	4	5
Q9CPU4	Microsomal glutathione S-transferase 3	Mgst3	< 0,05	2,66	4	5
Q8C570	mRNA export factor	Rae1	< 0,05	2,40	4	0
Q3UID0	SWI/SNF complex subunit SMARCC2	Smarcc2	< 0,05	2,39	4	5
Q91V35	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase	Ptptra	< 0,05	2,38	4	0
D3Z7P3	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	Gls	< 0,05	2,31	4	5
A0A0R4J0X5	Alpha-1-antitrypsin 1-3	Serpina1c	< 0,05	2,25	4	5

P30355	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	Alox5ap	< 0,05	2,20	4	0
A2AEM2	Chloride channel CLIC-like protein 1	Clcc1	< 0,05	2,19	4	0
Q91VS7	Microsomal glutathione S-transferase 1	Mgst1	< 0,05	2,11	4	5
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	Serpina1b	< 0,05	2,05	4	5
P06728	Apolipoprotein A-IV	Apoa4	< 0,05	1,91	4	5
A0A0R4J170	Transcription activator BRG1	Smarca4	< 0,05	1,86	4	0
Q3UIA2	Rho GTPase-activating protein 17	Arhgap17	< 0,05	1,85	4	5
Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	Etfb	< 0,05	1,79	4	5
Q9Z0U1	Tight junction protein ZO-2	Tjp2	< 0,05	1,78	4	0
Q505D7	Optic atrophy 3 protein homolog	Opa3	< 0,05	1,71	4	0
Q9Z204	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	Hnrnpc	< 0,05	1,69	4	5
Q91XD7	Cysteine-rich with EGF-like domain protein 1	Creld1	< 0,05	1,64	4	5
Q9DB20	ATP synthase subunit O, mitochondrial	Atp5o	< 0,05	1,61	4	5
Q9QYJ0	DnaJ homolog subfamily A member 2	Dnaja2	< 0,05	1,61	4	5
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	< 0,05	1,58	4	5
P21619	Lamin-B2	Lmnb2	< 0,05	1,56	4	5
P54822	Adenylosuccinate lyase	Adsl	< 0,05	1,54	4	5
Q62465	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Vat1	< 0,01	1,53	4	5

Tabelle 13: Signifikant runterregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in HFD+MF vs. HFD

45 Proteine waren in HFD+MF verglichen mit HFD signifikant runterreguliert (Fold Change > 1,5 & q-Wert < 0,05). Angegeben sind Protein-ID, Proteinname, Gen, q-Wert (auf multiples Testen korrigierter p-Wert), Fold Change (Vielfaches der Veränderung) und valid values beider Vergleichsgruppen (= Anzahl der Proben, in denen ein Protein nachgewiesen wurde). Die Übersicht ist nach ihrem Fold Change sortiert. Es wurden 4 HFD+MF-Proben und 5 HFD-Proben analysiert.

ID	Proteinname	Gen	q-Wert	Fold Change	valid values HFD+MF	valid values HFD
P20065	Thymosin beta-4	Tmsb4x	< 0,05	33,30	0	5
A0A0U1RNP7	Perilipin-1	Plin1	< 0,01	15,75	0	5
Q9ERT9	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1A	Ppp1r1a	< 0,05	9,09	0	5
P58044	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	Idi1	< 0,05	5,57	0	5
G5E870	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	Trip12	< 0,05	3,60	0	5
Q9Z0J0	Epididymal secretory protein E1	Npc2	< 0,05	3,49	4	5
Q91XL1	Leucine-rich HEV glycoprotein	Lrg1	< 0,05	3,40	4	5
Q62356	Follistatin-related protein 1	Fstl1	< 0,05	3,16	4	5
Q9QXC1	Fetuin-B	Fetub	< 0,05	2,60	4	5
Q8QZR5	Alanine aminotransferase 1	Gpt	< 0,05	2,39	4	5
Q9DBX6	Cytochrome P450 2S1	Cyp2s1	< 0,05	2,33	4	5
P51855	Glutathione synthetase	Gss	< 0,05	2,28	4	5
P67984	60S ribosomal protein L22	Rpl22	< 0,05	2,07	4	5
Q9D1X0	Nucleolar protein 3	Nol3	< 0,05	2,05	4	5

Q9QZ06	Toll-interacting protein	Tollip	< 0,05	2,03	4	5
Q9CXR1	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	Dhrs7	< 0,05	1,97	4	5
P62897	Cytochrome c, somatic	Cycs	< 0,05	1,96	4	5
Q9R099	Transducin beta-like protein 2	Tbl2	< 0,05	1,93	4	5
Q9CQS8	Protein transport protein Sec61 subunit beta	Sec61b	< 0,05	1,90	4	5
Q9ERE7	LDLR chaperone MESD	Mesdc2	< 0,05	1,89	4	5
Q8R317	Ubiquilin-1	Ubqln1	< 0,05	1,77	4	5
P63330	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	Ppp2ca	< 0,05	1,74	4	5
Q9CQ65	S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase	Mtap	< 0,05	1,72	4	5
Q922Q8	Leucine-rich repeat-containing protein 59	Lrrc59	< 0,05	1,72	4	5
P17563	Selenium-binding protein 1	Selenbp1	< 0,05	1,71	4	5
P70296	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	Pebp1	< 0,05	1,71	4	5
A0A0B4J1E7	Importin subunit alpha-3	Kpna4	< 0,05	1,70	4	5
Q9Z1Z2	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Strap	< 0,05	1,69	4	5
Q61035	Histidine--tRNA ligase, cytoplasmic	Hars	< 0,05	1,68	4	5
O08915	AH receptor-interacting protein	Aip	< 0,05	1,67	4	5
Q3UGR5	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	Hdhd2	< 0,05	1,67	4	5
P68037	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	Ube2l3	< 0,05	1,66	4	5
Q91YJ2	Sorting nexin-4	Snx4	< 0,05	1,64	4	5
O35945	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	Aldh1a7	< 0,05	1,63	4	5
P57759	Endoplasmic reticulum resident protein 29	Erp29	< 0,05	1,61	4	5
E9Q137	Testis-expressed gene 264	Tex264	< 0,05	1,61	4	5
Q9QZ88	Vacuolar protein sorting-associated protein 29	Vps29	< 0,05	1,58	4	5
O70274	Protein tyrosine phosphatase type IVA 2	Ptp4a2	< 0,05	1,58	4	5
Q9DAK9	14 kDa phosphohistidine phosphatase	Phpt1	< 0,05	1,57	4	5
Q91V41	Ras-related protein Rab-14	Rab14	< 0,05	1,56	4	5
O35598	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	Adam10	< 0,05	1,55	4	5
Q07797	Galectin-3-binding protein	Lgals3	< 0,05	1,55	4	5
Q8BKE6	Cytochrome P450 20A1	Cyp20a1	< 0,05	1,55	4	5
Q8JZN1	Macrophage galactose N-acetyl-galactosamine-specific lectin 2	Mgl2	< 0,05	1,54	4	5
Q02819	Nucleobindin-1	Nucb1	< 0,05	1,52	4	5

SD+MF vs. SD

Tabelle 14: Signifikant hochregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in SD+MF vs. SD

66 Proteine waren in SD+MF verglichen mit SD signifikant hochreguliert (Fold Change > 1,5 & q-Wert < 0,05). Angegeben sind Protein-ID, Proteinname, Gen, q-Wert (auf multiples Testen korrigierter p-Wert), Fold Change (Vielfaches der Veränderung) und valid values beider Vergleichsgruppen (= Anzahl der Proben, in denen ein Protein nachgewiesen wurde). Die Übersicht ist nach ihrem Fold Change sortiert. Pro Gruppe wurden 5 Proben analysiert.

ID	Proteinname	Gen	q-Wert	Fold Change	valid values SD+MF	valid values SD
Q8R404	Protein QIL1	Qil1	< 0,05	10,70	5	0
Q9Z0Y1	Dynactin subunit 3	Dctn3	< 0,05	9,17	5	0
Q3U3V1	Coagulation factor X	F10	< 0,05	8,02	5	0
Q9DAW9	Calponin-3	Cnn3	< 0,05	7,32	5	0
Q9CU62	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	Smc1a	< 0,05	5,50	5	0
Q8CFV9	Riboflavin kinase	Rfk	< 0,01	5,45	5	0
E9Q9C5	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	Atp6v0c	< 0,05	5,36	5	0
B1ARU4	Microtubule-actin cross-linking factor 1	Macf1	< 0,05	4,84	5	0
H3BL37	Treacle protein	Tcof1	< 0,05	4,49	5	0
O55201	Transcription elongation factor SPT5	Supt5h	< 0,05	4,21	5	0
Q569Z5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	Ddx46	< 0,05	4,17	5	0
B1AZ15	Cordon-bleu protein-like 1	Cobl1	< 0,05	4,08	5	0
Q8BSL7	ADP-ribosylation factor 2	Arf2	< 0,05	3,77	5	0
Q61191	Host cell factor 1	Hcfc1	< 0,05	3,73	5	0
A0A0R4J0F6	Cyclin-G-associated kinase	Gak	< 0,05	3,69	5	0
Q8BH58	TIP41-like protein	Tipr1	< 0,05	3,68	5	0
Q6PGF7	Exocyst complex component 8	Exoc8	< 0,05	3,51	5	0
Q8K482	EMILIN-2	Emilin2	< 0,01	3,33	5	0
Q9QXE7	F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1X	Tbl1x	< 0,05	3,24	5	0
Q9JIK5	Nucleolar RNA helicase 2	Ddx21	< 0,05	3,15	5	0
Z4YL78	Cytoskeleton-associated protein 5	Ckap5	< 0,05	3,15	5	0
Q9CPS6	Histidine triad nucleotide-binding protein 3	Hint3	< 0,05	3,15	5	0
Q3UE37	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z	Ube2z	< 0,05	3,12	5	0
P01645	Ig kappa chain V-V region HP 93G7		< 0,05	3,02	5	0
P47955	60S acidic ribosomal protein P1	Rplp1	< 0,05	2,91	5	5
Q80VD1	Protein FAM98B	Fam98b	< 0,01	2,88	5	0
P50543	Protein S100-A11	S100a11	< 0,05	2,87	5	5
Q8VE88	Protein FAM114A2	Fam114a2	< 0,05	2,86	5	0
Q9CZC8	Secernin-1	Scrn1	< 0,05	2,85	5	0
Q00898	Alpha-1-antitrypsin 1-5	Serpina1e	< 0,05	2,78	5	5
P29351	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	Ptpn6	< 0,05	2,76	5	0
Q3THG9	Alanyl-tRNA editing protein Aarsd1	Aarsd1	< 0,05	2,73	5	0
Q9R0P5	Destrin	Dstn	< 0,05	2,73	5	5
D3YYT1	Putative oxidoreductase GLYR1	Glyr1	< 0,05	2,69	5	0

Q3UZ39	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1	Lrrfip1	< 0,05	2,67	5	0
A0A0R4J0I1	Serine protease inhibitor A3K	Serpina3k	< 0,05	2,61	5	5
E9Q3Z5	Supervillin	Svil	< 0,05	2,52	5	0
P50637	Translocator protein	Tspo	< 0,05	2,48	5	5
Q9WTQ5	A-kinase anchor protein 12	Akap12	< 0,05	2,28	5	5
A0A140T8W1	Collagen alpha-5(VI) chain	Col6a5	< 0,05	2,27	5	5
Q6PE70	Integrin beta-5	Itgb5	< 0,05	2,25	5	0
Q9Z0P4	Paralemmin-1	Palm	< 0,05	2,14	5	5
A0A0R4J0X5	Alpha-1-antitrypsin 1-3	Serpina1c	< 0,05	2,12	5	5
Q63918	Serum deprivation-response protein	Sdpr	< 0,05	2,12	5	5
G5E829	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	Atp2b1	< 0,05	2,06	5	5
Q99JY0	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	Hadhb	< 0,05	2,00	5	5
P62918	60S ribosomal protein L8	Rpl8	< 0,05	1,97	5	5
A0A1W2P768	Histone H3.2	Hist1h3b	< 0,05	1,93	5	5
E9PUM4	Talin-2	Tln2	< 0,05	1,90	5	5
P18760	Cofilin-1	Cfl1	< 0,05	1,90	5	5
Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	Etfa	< 0,05	1,89	5	5
Q9JLQ0	CD2-associated protein	Cd2ap	< 0,05	1,80	5	5
P09103	Protein disulfide-isomerase	P4hb	< 0,05	1,72	5	5
Q8BGD9	Eukaryotic translation initiation factor 4B	Eif4b	< 0,05	1,66	5	5
Q60930	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	Vdac2	< 0,05	1,66	5	5
P09813	Apolipoprotein A-II	Apoa2	< 0,05	1,64	5	5
P63038	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspd1	< 0,05	1,63	5	5
P20152	Vimentin	Vim	< 0,05	1,60	5	5
P35979	60S ribosomal protein L12	Rpl12	< 0,05	1,59	5	5
Q61937	Nucleophosmin	Npm1	< 0,05	1,57	5	5
P80313	T-complex protein 1 subunit eta	Cct7	< 0,05	1,57	5	5
O54724	Polymerase I and transcript release factor	Ptrf	< 0,05	1,57	5	5
Q91VJ2	Protein kinase C delta-binding protein	Prkcdbp	< 0,05	1,57	5	5
A2ATI9	Golgi reassembly-stacking protein 2	Gorasp2	< 0,05	1,54	5	5
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	< 0,05	1,54	5	5
P10107	Annexin A1	Anxa1	< 0,05	1,54	5	5

Tabelle 15: Signifikant runterregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in SD+MF vs. SD

115 Proteine waren in SD+MF verglichen mit SD signifikant runterreguliert (Fold Change > 1,5 & q-Wert < 0,05). Angegeben sind Protein-ID, Proteinname, Gen, q-Wert (auf multiples Testen korrigierter p-Wert), Fold Change (Vielfaches der Veränderung) und valid values beider Vergleichsgruppen (= Anzahl der Proben, in denen ein Protein nachgewiesen wurde). Die Übersicht ist nach ihrem Fold Change sortiert. Pro Gruppe wurden 5 Proben analysiert.

ID	Proteinname	Gen	q-Wert	Fold Change	valid values SD+MF	valid values SD
Q9JMG1	Endothelial differentiation-related factor 1	Edf1	< 0,0005	8,33	0	5

B7ZMP1	Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3	Xpnpep3	< 0,01	6,11	0	5
H7BWY6	Retinol-binding protein 4	Rbp4	< 0,01	4,54	5	5
D5MCW4	Protein CutA	Cuta	< 0,05	4,40	0	5
P26883	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	Fkbp1a	< 0,05	3,91	5	5
Q8K2H2	OTU domain-containing protein 6B	Otud6b	< 0,05	3,81	0	5
A2A864	Integrin beta-4	Itgb4	< 0,05	3,78	0	5
Q8JZU0	Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 13	Nudt13	< 0,05	3,65	0	5
P62274	40S ribosomal protein S29	Rps29	< 0,05	3,56	5	5
Q924L1	LETM1 domain-containing protein 1	Letmd1	< 0,05	3,55	5	5
Q05117	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	Acp5	< 0,05	3,34	5	5
Q8BQ47	Protein canopy homolog 4	Cnpy4	< 0,01	3,31	5	5
Q3U9N4	Granulins	Grn	< 0,05	3,22	5	5
I1E4X7	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase 1	Nudt3	< 0,05	3,03	0	5
A0A1B0GRP7	Proline synthase co-transcribed bacterial homolog protein	Prosc	< 0,05	2,97	5	5
Q91XL1	Leucine-rich HEV glycoprotein	Lrg1	< 0,05	2,93	5	5
Q9D1E6	Tubulin-folding cofactor B	Tbcb	< 0,05	2,92	5	5
J3QMN4	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	Txnr2	< 0,05	2,79	5	5
Q8BX70	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	Vps13c	< 0,05	2,78	5	5
Q9D0S9	Histidine triad nucleotide-binding protein 2, mitochondrial	Hint2	< 0,05	2,76	5	5
Q9CPU0	Lactoylglutathione lyase	Glo1	< 0,05	2,68	5	5
Q99JR6	Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase 3	Nmnat3	< 0,05	2,68	0	5
P45878	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2	Fkbp2	< 0,05	2,58	5	5
Q8C253	Galectin-3-binding protein	Lgals3	< 0,05	2,45	5	5
P04925	Major prion protein	Prnp	< 0,05	2,45	5	5
P97821	Dipeptidyl peptidase 1	Ctsc	< 0,05	2,42	5	5
Q64282	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Ifit1	< 0,05	2,39	0	5
A0A0R4J0W6	Leucine-rich repeat-containing protein 40	Lrrc40	< 0,05	2,35	0	5
Q8QZR5	Alanine aminotransferase 1	Gpt	< 0,05	2,33	5	5
A0A140LHL5	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	Sirt2	< 0,05	2,31	5	5
A2AKN9	Major urinary protein 6	Mup4	< 0,05	2,30	5	5
Q9WV54	Acid ceramidase	Asah1	< 0,05	2,28	5	5
P62627	Dynein light chain roadblock-type 1	Dynlrb1	< 0,05	2,26	5	5
Q9D1X0	Nucleolar protein 3	Nol3	< 0,05	2,25	5	5
Q8R086	Sulfite oxidase, mitochondrial	Suox	< 0,05	2,24	5	5
Q9CZP5	Mitochondrial chaperone BCS1	Bcs1l	< 0,05	2,23	5	5
Q91X72	Hemopexin	Hpx	< 0,05	2,23	5	5
P63330	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	Ppp2ca	< 0,05	2,23	5	5
Q9QZZ6	Dermatopontin	Dpt	< 0,05	2,21	5	5
P70697	Uroporphyrinogen decarboxylase	Urod	< 0,05	2,20	5	5

Q3TVK3	Aspartyl aminopeptidase	Dnpep	< 0,05	2,19	5	5
Q9D4H8	Cullin-2	Cul2	< 0,05	2,19	5	5
P56135	ATP synthase subunit f, mitochondrial	Atp5j2	< 0,05	2,18	5	5
Q8R3R8	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1	Gabarapl1	< 0,05	2,17	5	5
Q5PR72	cGMP-dependent 3,5-cyclic phosphodiesterase	Pde2a	< 0,05	2,14	5	5
A0A1D5RLL3	Protein EFR3 homolog A	Efr3a	< 0,05	2,14	5	5
Q9QZA0	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial	Ca5b	< 0,05	2,14	5	5
P62748	Hippocalcin-like protein 1	Hpcal1	< 0,05	2,12	5	5
Q11136	Xaa-Pro dipeptidase	Pepd	< 0,05	2,11	5	5
Q8CGN5	Perilipin-1	Plin1	< 0,05	2,11	5	5
P70349	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	Hint1	< 0,05	2,10	5	5
P22907	Porphobilinogen deaminase	Hmbs	< 0,05	2,10	5	5
Q3UE92	Xaa-Pro aminopeptidase 1	Xpnpep1	< 0,05	2,10	5	5
Q9EPL9	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 3	Acox3	< 0,05	2,09	5	5
Q91VR8	Protein BRICK1	Brk1	< 0,05	2,06	5	5
P49935	Pro-cathepsin H	Ctsh	< 0,05	2,06	5	5
P17563	Selenium-binding protein 1	Selenbp1	< 0,05	2,04	5	5
E9PZ00	Prosaposin	Psap	< 0,05	2,02	5	5
Q9R069	Basal cell adhesion molecule	Bcam	< 0,05	2,01	5	5
Q8BP48	Methionine aminopeptidase 1	Metap1	< 0,05	2,00	5	5
P48428	Tubulin-specific chaperone A	Tbca	< 0,05	1,98	5	5
P24668	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6pr	< 0,05	1,97	5	5
Q6GT24	Peroxiredoxin-6	Prdx6	< 0,05	1,96	5	5
Q3THS6	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	Mat2a	< 0,05	1,95	5	5
Q8VEH3	ADP-ribosylation factor-like protein 8A	Arl8a	< 0,05	1,95	5	5
Q9D8B3	Charged multivesicular body protein 4b	Chmp4b	< 0,05	1,93	5	5
F6RPJ9	Insulin-degrading enzyme	Ide	< 0,05	1,93	5	5
P47791	Glutathione reductase, mitochondrial	Gsr	< 0,05	1,92	5	5
Q64462	Cytochrome P450 4B1	Cyp4b1	< 0,05	1,91	5	5
P0DN34	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 1	Ndufb1	< 0,05	1,91	5	5
Q3B7Z2	Oxysterol-binding protein 1	Osbp	< 0,05	1,91	5	5
Q9D517	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gamma	Agpat3	< 0,05	1,90	5	5
P10605	Cathepsin B	Ctsb	< 0,05	1,90	5	5
A0A1B0GT92	Glycogen [starch] synthase, muscle	Gys1	< 0,05	1,88	5	5
Q9Z1Z2	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Strap	< 0,05	1,87	5	5
Q64010	Adapter molecule crk	Crk	< 0,05	1,87	5	5
O09164	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod3	< 0,05	1,86	5	5
G3UYV7	40S ribosomal protein S28	Rps28	< 0,05	1,86	5	5
Q9DBL7	Bifunctional coenzyme A synthase	Coasy	< 0,05	1,86	5	5

Q8R5L1	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	C1qbp	< 0,05	1,85	5	5
Q8BWM0	Prostaglandin E synthase 2	Ptges2	< 0,05	1,84	5	5
Q9D172	ES1 protein homolog, mitochondrial	D10Jhu81e	< 0,05	1,82	5	5
Q9D1P4	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	Chordc1	< 0,05	1,81	5	5
Q6NSR8	Probable aminopeptidase NPEPL1	Npepl1	< 0,05	1,81	5	5
A0A0A6YVS2	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1	Tmco1	< 0,05	1,81	5	5
Q9D023	Mitochondrial pyruvate carrier 2	Mpc2	< 0,05	1,79	5	5
P49615	Cyclin-dependent-like kinase 5	Cdk5	< 0,05	1,78	5	5
Q9DBE0	Cysteine sulfinic acid decarboxylase	Csad	< 0,05	1,78	5	5
Q9JMH6	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	Txnrd1	< 0,05	1,77	5	5
P46412	Glutathione peroxidase 3	Gpx3	< 0,05	1,76	5	5
Q91V01	Lysophospholipid acyltransferase 5	Lpcat3	< 0,05	1,74	5	5
A0A0R4IZX2	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2	Slc9a3r2	< 0,05	1,73	5	5
Q8BT60	Copine-3	Cpne3	< 0,05	1,72	5	5
Q9WUD1	STIP1 homology and U box-containing protein 1	Stub1	< 0,05	1,70	5	5
Q8BG51	Mitochondrial Rho GTPase 1	Rhot1	< 0,05	1,67	5	5
P84104	Serine/arginine-rich splicing factor 3	Srsf3	< 0,05	1,67	5	5
Q8JZQ2	AFG3-like protein 2	Afg3l2	< 0,05	1,65	5	5
P09671	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	Sod2	< 0,05	1,65	5	5
G3UYJ7	Predicted gene 20441	Gm20441	< 0,05	1,65	5	5
Q9DAR7	m7GpppX diphosphatase	Dcps	< 0,05	1,64	5	5
Q9CR62	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	Slc25a11	< 0,05	1,63	5	5
Q8K183	Pyridoxal kinase	Pdxk	< 0,05	1,62	5	5
Q91V89	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit	Ppp2r5d	< 0,05	1,62	5	5
Q11011	Puromycin-sensitive aminopeptidase	Npepps	< 0,05	1,61	5	5
Q60737	Casein kinase II subunit alpha	Csnk2a1	< 0,05	1,61	5	5
P24547	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase 2	Impdh2	< 0,05	1,60	5	5
Q80UJ7	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	Rab3gap1	< 0,05	1,60	5	5
Q92511	ATPase family AAA domain-containing protein 3	Atad3	< 0,05	1,60	5	5
P61082	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	Ube2m	< 0,05	1,60	5	5
G3X928	SEC23-interacting protein	Sec23ip	< 0,05	1,59	5	5
Q8C483	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	Sars	< 0,05	1,58	5	5
Q9CQC7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4	Ndufb4	< 0,05	1,57	5	5
P68037	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	Ube2l3	< 0,05	1,56	5	5
Q8BJY1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	Psmd5	< 0,01	1,55	5	5
Q8BU33	Acetolactate synthase-like protein	Ilvbl	< 0,05	1,52	5	5

4.5.5.3 SD+MF vs. SD & HFD+MF vs. HFD

Tabelle 16: Signifikant hochregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in SD+MF vs. SD und HFD+MF vs. HFD
Acht Proteine waren sowohl in SD+MF verglichen mit SD als auch in HFD+MF verglichen mit HFD signifikant hochreguliert (Fold Change > 1,5 & q-Wert < 0,05). Angegeben sind Protein-ID, Proteinname, Gen, q-Wert (auf multiples Testen korrigierter p-Wert) und Fold Change (Vielfaches der Veränderung). Die Übersicht ist nach dem Fold Change in HFD+MF vs. HFD sortiert. Es wurden 4 HFD+MF-Proben sowie 5 Proben der SD, HFD und SD+MF analysiert.

ID	Proteinname	Gen	SD+MF vs. SD		HFD+MF vs. HFD	
			q-Wert	Fold Change	q-Wert	Fold Change
Q9Z0Y1	Dynactin subunit 3	Dctn3	< 0,05	9,17	< 0,01	8,53
B1AZ15	Cordon-bleu protein-like 1	Cobl1	< 0,05	4,08	< 0,05	7,94
Q569Z5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	Ddx46	< 0,05	4,17	< 0,05	3,55
H3BL37	Treacle protein	Tcof1	< 0,05	4,49	< 0,05	3,30
Q3UE37	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z	Ube2z	< 0,05	3,12	< 0,05	3,21
A0A0R4J0X5	Alpha-1-antitrypsin 1-3	Serpina1c	< 0,05	2,12	< 0,05	2,25
Q99LC5	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	Etfp	< 0,05	1,89	< 0,05	1,79
P16858	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	< 0,05	1,54	< 0,05	1,58

Tabelle 17: Signifikant runterregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in SD+MF vs. SD und HFD+MF vs. HFD
Acht Proteine waren sowohl in SD+MF verglichen mit SD als auch in HFD+MF verglichen mit HFD signifikant runterreguliert (Fold Change > 1,5 & q-Wert < 0,05). Angegeben sind Protein-ID, Proteinname, Gen, q-Wert (auf multiples Testen korrigierter p-Wert) und Fold Change (Vielfaches der Veränderung). Die Übersicht ist nach dem Fold Change in HFD+MF vs. HFD sortiert. Es wurden 4 HFD+MF-Proben sowie 5 Proben der SD, HFD und SD+MF analysiert.

ID	Proteinname	Gen	SD+MF vs. SD		HFD+MF vs. HFD	
			q-Wert	Fold Change	q-Wert	Fold Change
Q8CGN5 / A0A0U1RNP7	Perilipin-1	Plin1	< 0,05	2,11	< 0,05	15,75
Q91XL1	Leucine-rich HEV glycoprotein	Lrg1	< 0,05	2,93	< 0,05	3,40
Q8QZR5	Alanine aminotransferase 1	Gpt	< 0,05	2,33	< 0,05	2,39
Q9D1X0	Nucleolar protein 3	Nol3	< 0,05	2,25	< 0,05	2,05
P63330	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	Ppp2ca	< 0,05	2,23	< 0,05	1,74
P17563	Selenium-binding protein 1	Selenbp1	< 0,05	2,04	< 0,05	1,71
Q9Z1Z2	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Strap	< 0,05	1,87	< 0,05	1,69
P68037	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	Ube2l3	< 0,05	1,56	< 0,05	1,66

4.5.5.4 HFD vs. SD & HFD+MF vs. HFD

Tabelle 18: signifikant hoch- bzw. runterregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in HFD vs. SD und HFD+MF vs. HFD

Fünf Proteine waren sowohl in HFD verglichen mit SD als auch in HFD+MF verglichen mit HFD signifikant hoch- bzw. runterreguliert (Fold Change > 1,5 & q-Wert < 0,05). Angegeben sind Protein-ID, Proteinname, Gen, Richtung der Regulation (↑ hoch, ↓ runter), q-Wert (auf multiples Testen korrigierter p-Wert) und Fold Change (Vielfaches der Veränderung). Die Übersicht ist nach dem Fold Change in HFD+MF vs. HFD sortiert. Es wurden 4 HFD+MF-Proben sowie 5 Proben der SD und HFD analysiert.

ID	Proteinname	Gen	HFD vs. SD		HFD+MF vs. HFD			
			Richtung	q-Wert	Fold Change	q-Wert	Fold Change	
Q99J39	Malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial	Mlycd	↓	< 0,01	6,34	↑	< 0,05	7,19
Q9JK42	Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2	Pdk2	↓	< 0,0005	8,76	↑	< 0,05	4,35
Q505D7	Optic atrophy 3 protein homolog	Opa3	↓	< 0,05	2,20	↑	< 0,05	1,71
Q9DBX6	Cytochrome P450 2S1	Cyp2s1	↑	< 0,05	2,09	↓	< 0,05	2,33
P06728	Apolipoprotein A-IV	Apoa4	↑	< 0,0005	2,73	↑	< 0,05	1,91

4.6 Analyse des Blut-Fettsäureprofils

Seren der Mäuse aller vier Vergleichsgruppen wurden an G15,5 im Hinblick auf ihr Fettsäureprofil untersucht. Dazu wurden die enthaltenen Lipide extrahiert, anschließend in FAMES überführt und mittels GC-MS detektiert (Abb. 22).

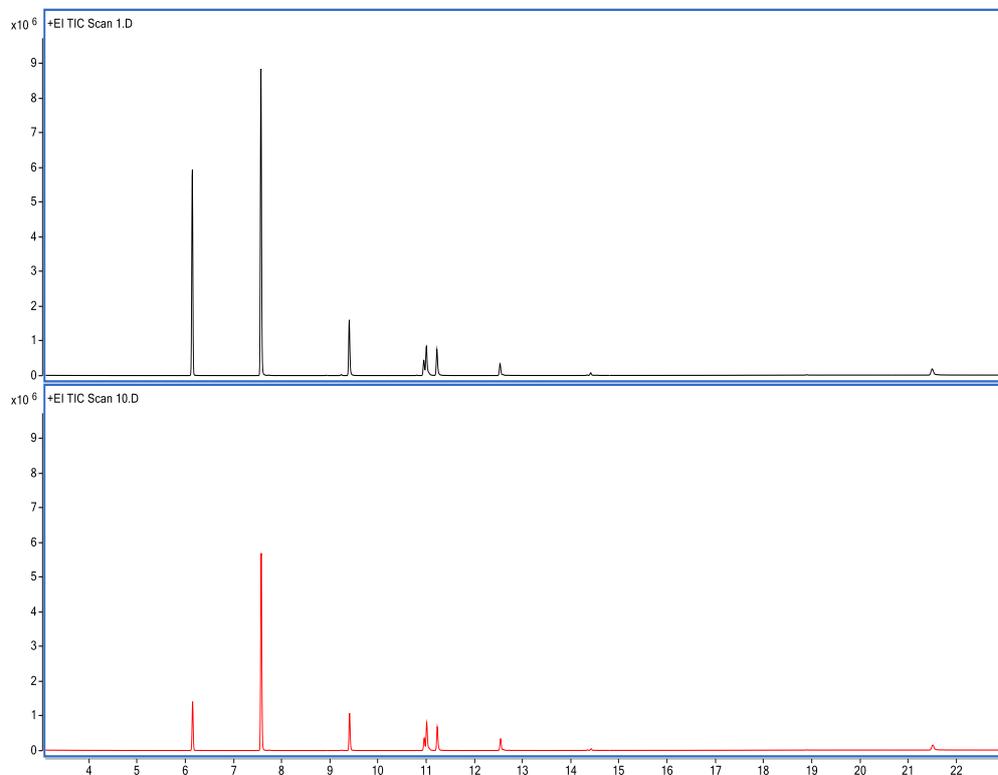


Abb. 22: Beispielhafte GC-MS-Messung der Serumlipide

Lipide wurden aus dem Serum extrahiert, in FAMES überführt und mittels Gas-Chromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung detektiert. Zu sehen ist der Total-Ionenstrom über die Zeit [min] zweier exemplarischer Proben.

Es wurden die gesättigten Fettsäuren Myristinsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure (Abb. 23a), die einfach ungesättigten Fettsäuren Palmitoleinsäure und Ölsäure (Abb. 23b) sowie die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolsäure, Arachidonsäure und Docosahexaensäure detektiert (Abb. 23c). Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zweier Gruppen zeigte sich lediglich bei der Palmitoleinsäure, hier wurde in den Seren der HFD+MF-Mäuse eine signifikant geringere Menge Palmitoleinsäure nachgewiesen als in denen der HFD-Mäuse. In der SD-Gruppe wurde häufig tendenziell eine größere Menge der jeweiligen Fettsäure detektiert als in den anderen Gruppen.

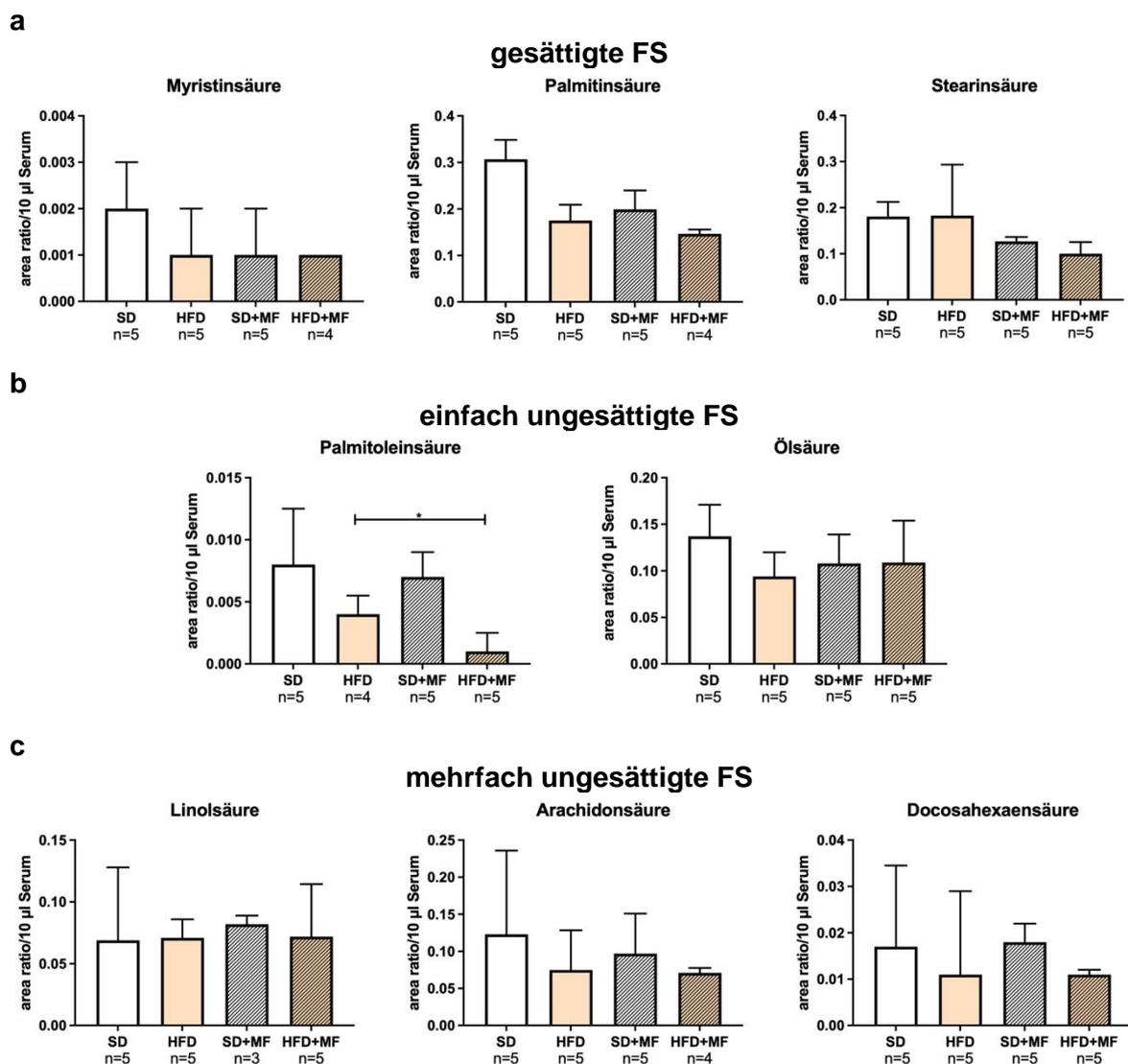


Abb. 23: Fettsäureprofil der Seren an G15,5

Die im Serum enthaltenen Lipide wurden extrahiert, in FAMES überführt und anschließend mittels GC-MS detektiert. Mithilfe der Software AMDIS wurden die Fettsäuren identifiziert. Zur Quantifizierung wurden die Peakflächen auf den internen Standard Myristinsäure-d₂₇ normalisiert, hier angegeben als area ratio/10 µl Serum. Zu sehen sind gesättigte FS (a), einfach ungesättigte FS (b) und mehrfach ungesättigte FS (c). SD n = 5; HFD n = 4 - 5; SD+MF n = 3 - 5; HFD+MF n = 4 - 5. Mediane mit IQR. p < 0,05 *.

5 Diskussion

Unter Zuhilfenahme eines Mausmodells wurde in dieser Arbeit eine Metforminbehandlung adipöser Schwangerer dargestellt. Angesichts der weltweit exzessiv steigenden Prävalenz von Übergewicht und Adipositas nimmt auch die Häufigkeit adipöser Schwangerer und der damit verbundenen Risiken für Mutter und Kind zu. Entsprechende Behandlungsansätze, die Adipositas-assoziierten Komplikationen wie Gestationsdiabetes, Präeklampsie, Fehl- und Totgeburten sowie angeborenen Fehlbildungen vorbeugen können, gewinnen dadurch umso mehr an Bedeutung. Dabei gerät zunehmend die Rolle des Fettgewebes selbst in den Fokus der Forschung. WAT dient nicht nur als Energiespeicher, sondern ist auch ein ausgesprochen aktives endokrines Organ, das essenziell an der Regulation verschiedenster Stoffwechselfvorgänge beteiligt ist¹⁸. Ebenso gilt die, mit einer Adipositas einhergehende, Dysfunktion des WATs als wesentlicher Faktor bei der Entstehung nachfolgender Erkrankungen und Komplikationen¹⁹. In diesem Zusammenhang werden insbesondere Inflammation und oxidativer Stress als Schlüsselmechanismen angesehen, die sich, ausgehend von lokalen Prozessen innerhalb des WATs, systemisch ausbreiten. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass das etablierte Antidiabetikum Metformin sowohl Inflammation als auch oxidativen Stress reduziert. Demnach könnte eine Metforminbehandlung adipöser Schwangerer diesen Mechanismen im WAT entgegenwirken und auf diese Weise womöglich den teilweise tiefgreifenden, Adipositas-assoziierten Komplikationen vorbeugen. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, das dahingehende Potenzial einer Metformintherapie in der Schwangerschaft zu ergründen.

5.1 Bewertung der Adipositas-Induktion und Metformin-Intervention

C57BL/6-Mäuse sind ein etabliertes Modell zur Darstellung diätinduzierter Adipositas¹²². Es wurde bereits vielfach gezeigt, dass sie unter der Fütterung einer HFD Adipositas entwickeln und auch damit assoziierte Stoffwechselstörungen besonders gut abbilden¹²³. Das deckt sich mit den Beobachtungen in dieser Arbeit. Um den Adipositas-induzierenden Effekt der HFD zu untersuchen, wurden μ CT-Scans von nichttragenden, weiblichen Mäusen angefertigt, die eine SD bzw. HFD erhielten. Sowohl das Gesamtfettvolumen als auch das viszerale Fettvolumen waren in der nichttragenden HFD-Gruppe stark erhöht. Diese Effekte zeigen sich ebenfalls in den erhöhten Körper- und egWAT-Gewichten der tragenden HFD-Tiere aus dieser Arbeit (s. Kapitel 5.2). Es konnte dementsprechend gezeigt werden, dass auch unter den konkreten Versuchs- und Haltungsbedingungen unseres Tiermodells das Füttern der HFD zu Adipositas geführt hat.

Um die Beurteilbarkeit der Metforminbehandlung zu bewerten, ist es wichtig, die Dosierung zu beachten. Teilweise werden in Tierversuchen sehr hohe Metformindosierungen eingesetzt, die nicht mit der Dosis im klinischen Einsatz vergleichbar sind und somit eher unphysiologische Effekte abbilden, die nur bedingt auf den Einsatz beim Menschen übertragbar sind. In dieser

Arbeit wurde die Metformin-Zieldosis der Dosierung angepasst, die auch Schwangere durchschnittlich einnehmen (31 mg/kgKG/Tag, nach Prof. Dr. Angela Köninger), um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu schaffen. Die Umrechnung mittels HED¹¹³ in eine für Mäuse entsprechende Dosierung ergab eine Zieldosis von 380 mg/kgKG/Tag. Tatsächlich wurde diese Zieldosis von beiden Metformin-behandelten Gruppen übertroffen (HFD+MF 432,13 mg/kgKG/Tag; SD+MF 454,20 mg/kgKG/Tag). Umgerechnet in eine vergleichbare humane Dosierung ergab sich wiederum eine Metforminaufnahme von 35,04 mg/kgKG/Tag für die tragenden HFD+MF-Mäuse und 36,83 mg/kgKG/Tag für die tragenden SD+MF-Mäuse. Möchte man die gemessenen Metforminkonzentrationen im Serum der tragenden Mäuse mit humanen Serumkonzentrationen vergleichen, fällt auf, dass der therapeutische Bereich für Metformin trotz des langjährigen klinischen Einsatzes nicht eindeutig definiert ist. Am häufigsten werden therapeutische Serumspiegel zwischen 0,1 und 4 µg/ml¹²⁴ in der Literatur angegeben. Die Serumkonzentrationen an G15,5 (HFD+MF 2,24 µg/ml; SD+MF 0,71 µg/ml) lägen damit im mittleren bis hohen therapeutischen Bereich.

Es fällt auf, dass die HFD+MF-Mäuse etwa das Dreifache der Metformin-Serumkonzentration der SD+MF-Mäuse aufwiesen, obwohl die Metforminaufnahme in der HFD+MF-Gruppe sogar etwas niedriger war. In der Literatur gibt es kaum ähnliche Messungen, sodass ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen schwer möglich ist. Denkbar wäre eine erhöhte Resorption oder eingeschränkte Ausscheidung von Metformin in der HFD+MF-Gruppe. Eine relevante Akkumulation von Metformin im Fettgewebe ist nicht bekannt, sodass die deutlich erhöhte Serumkonzentration der HFD+MF-Mäuse nicht durch ihre größere Fettgewebsmasse erklärt werden kann. Möglicherweise wurde durch die HFD eine Nierenfunktionsstörung verursacht, die die Metforminausscheidung verringert und zu einer Akkumulation des renal eliminierten Metformins geführt haben könnte. Solche renalen Funktionsstörungen mit erhöhtem Serumkreatinin konnten in Studien an C57BL/6-Mäusen nach 12 bzw. 24 Wochen HFD-Fütterung festgestellt werden^{125,126}. Da die Mäuse zum Zeitpunkt der Messung (G15,5) bereits zwischen 10 und 20 Wochen die HFD erhielten, wäre eine eingeschränkte renale Funktion der HFD+MF-Mäuse eine durchaus plausible Erklärung für ihre erhöhten Metformin-Serumkonzentrationen im Vergleich zur SD+MF. In zukünftigen Arbeiten erscheint es demnach ratsam, die eventuelle Akkumulation von Metformin unter HFD weitergehend zu untersuchen und beim Studiendesign zu berücksichtigen.

Trotz der Überschreitung der Metformin-Zieldosis und erhöhter Serumkonzentrationen in der HFD+MF-Gruppe kann von einer Dosierung ausgegangen werden, die noch im hohen therapeutischen Bereich liegt und somit physiologische Effekte einer Metforminbehandlung abbilden kann. Zudem schafft die hier gewählte orale Metforminaufnahme im Gegensatz zur, in Tierversuchen ebenfalls gebräuchlichen, peritonealen Verabreichung zusätzlich eine gesteigerte Vergleichbarkeit zur humanen Metformintherapie. Insgesamt kann

geschlussfolgert werden, dass das hier verwendete Mausmodell mit Adipositas-Induktion und Metformingabe eine Metforminbehandlung adipöser Schwangerer hinreichend darstellen kann und somit geeignet ist, um die wissenschaftliche Grundlage für die Therapie adipöser Schwangerer mit Metformin zu erweitern.

5.2 Phänotypische Veränderungen durch Metformin

Bei Verpaarung und an G15,5 waren die HFD-Mäuse signifikant schwerer als die SD-Mäuse. In Verbindung mit den Ergebnissen der μ CT-Scans (s. o.) kann folglich vorausgesetzt werden, dass eine Adipositas in der HFD-Gruppe induziert wurde und somit gehaltvolle Aussagen über mögliche Effekte der Metforminbehandlung getroffen werden können. In vielen klinischen Studien konnte Metformin das Körpergewicht von Typ-2-Diabetikern und adipösen Nichtdiabetikern reduzieren¹²⁷. Trotzdem wird dieser Effekt kontrovers diskutiert, da in gepoolten Analysen keine signifikanten Unterschiede zu erkennen waren¹²⁷. Hier konnte in der HFD+MF-Gruppe an G15,5 ein signifikant um 13,9 % reduziertes Körpergewicht im Vergleich zur HFD beobachtet werden. Auch in der SD+MF-Gruppe war ein Trend zu einem geringeren Gewicht als in der SD-Gruppe erkennbar. Beides deutet somit auf einen gewichtsreduzierenden Effekt von Metformin hin. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen von Matsui et al.¹²⁸ und Yuan et al.¹²⁹, die analog eine reduzierte Gewichtszunahme nichttragender Metformin-behandelter Mäusen unter HFD beobachteten.

Durch eine Metformintherapie verzeichnen adipöse Schwangere mit und ohne Diabetes eine geringere Gewichtszunahme während der Schwangerschaft^{94,130}. Diese Beobachtung wurde auch bei den HFD+MF-Mäusen gemacht. Während alle anderen Gruppen sich nur wenig bezüglich der Gewichtszunahme in der Tragezeit unterschieden, nahmen die HFD+MF-Mäuse 41,5 % weniger Gewicht zu als die HFD-Mäuse. Da eine übermäßige Gewichtszunahme zu einem häufigeren Auftreten Adipositas-assoziiierter Komplikationen bei adipösen Schwangeren führt¹³¹, ist dieser reduzierende Effekt als äußerst positiv zu bewerten. Zudem kann eine Gewichtsretention nach der Geburt eine weitere Progression der Adipositas bewirken und ist darüber hinaus mit einem erhöhten Risiko für Komplikationen in der nächsten Schwangerschaft verbunden³. Die empfohlene Gewichtszunahme in der Schwangerschaft ist bei einem hohen BMI umso geringer¹³². Teilweise wird sogar eher eine Gewichtsabnahme als -zunahme für adipöse Schwangere empfohlen¹³³. Dies wird jedoch kontrovers diskutiert, da eine zu geringe Gewichtszunahme ungünstige Effekte auf das Ungeborene haben kann¹³⁴. Etwa jede zweite adipöse Schwangere ist von exzessiver Gewichtszunahme betroffen und übersteigt dadurch die Empfehlungen¹³⁵. Eine Metforminbehandlung könnte dementsprechend dazu beitragen, die empfohlenen Richtwerte einzuhalten und somit Komplikationen vorzubeugen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass C57BL/6-Mäuse unter HFD eine signifikante Vermehrung des viszeralen WATs aufweisen¹²³. Auch in dieser Untersuchung war das egWAT-Gewicht in der HFD-Gruppe an G15,5 signifikant um 190,0 % gegenüber der SD erhöht. In der HFD+MF-Gruppe konnte hingegen ein signifikant um 36,9 % reduziertes egWAT-Gewicht gegenüber der HFD beobachtet werden. Ergänzend konnte ebenso in μ CT-Scans von nichttragenden Mäusen ein signifikant reduziertes viszerales Fettvolumen und Gesamtfettvolumen der HFD+MF-Mäuse unter Metformingabe gezeigt werden. Ein solcher Trend war auch in den μ CT-Scans der SD+MF-Mäuse zu sehen. Diese Ergebnisse erhärten die Annahme, dass eine Metforminbehandlung die viszerale Fettmasse reduziert, wie es auch schon bei Menschen und Ratten^{136,137} beobachtet wurde. Da viszerales WAT ein bedeutender Risikofaktor für Adipositas-assoziierte Erkrankungen ist (s. Kapitel 2.2.5), kann dieser Effekt als weiterer positiver Aspekt der Metforminbehandlung herausgestellt werden.

5.3 Einfluss auf die Fettgewebsmorphologie durch Metformin

Es ist hinlänglich bekannt, dass Fettzellen von Adipösen größer sind als die von Normalgewichtigen¹³⁸. Auch im scWAT und egWAT waren die Fettzellen der HFD-Gruppe an G15,5 signifikant größer als die der SD-Gruppe, sodass man auch aufgrund dieser Beobachtung davon ausgehen kann, dass eine Adipositas in der HFD-Gruppe induziert werden konnte. Die Fettzellgröße im scWAT der HFD+MF-Mäuse war signifikant geringer als in der HFD-Gruppe. Im egWAT zeigte sich ebenfalls ein solcher Trend zu einer geringeren Fettzellgröße in der HFD+MF-Gruppe gegenüber der HFD-Gruppe. Diese Beobachtungen unterstützen die Erkenntnisse aus zwei Studien, die gleichermaßen eine reduzierte Fettzellgröße in humanem scWAT¹³⁹ und murinem viszeralen WAT¹⁴⁰ unter Metformineinnahme feststellten. Möglicherweise wäre hier eine größere Stichprobe notwendig gewesen, um bei der hohen inter- und intraindividuellen Variabilität der Fettzellgröße im egWAT einen signifikanten Effekt der Metforminbehandlung festzustellen. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass die automatisierte Auswertung durch die Software Adiposoft zwar stark mit manuellem Ausmessen korreliert¹⁰⁶, sich aber trotzdem Abweichungen ergeben könnten. Zudem könnten die manuellen Korrekturen der Adiposoft-Messung, der Ausschluss von nicht vollständig erfassten Adipozyten und die Normalisierung auf die Anzahl der gezählten Zellen pro Bild (s. Kapitel 3.9.3) das Ergebnis unter Umständen beeinflusst haben. Diese Gesichtspunkte sollten bei weitergehenden Untersuchungen berücksichtigt werden.

Metformin scheint der Adipozyten-Hypertrophie sowohl in subkutanen als auch in epigonadalen Depots entgegenzuwirken. Da hypertrophe Adipozyten mit reduzierter Insulinsensitivität, verstärkter Entzündungsreaktion und oxidativem Stress verbunden sind^{30,37}, ergänzt dieser Effekt der Metforminbehandlung die bereits beobachteten positiven

Auswirkungen auf Körpergewicht und viszerale WAT-Akkumulation der adipösen Versuchstiere.

5.4 Einfluss auf Inflammation und oxidativen Stress im WAT durch Metformin

Um den Einfluss von Metformin auf Inflammation und oxidativen Stress, die als Schlüsselmechanismen bei der Entwicklung einer Adipositas und ihren Folgeerkrankungen gelten^{14,31}, im WAT zu messen, wurde die mRNA-Expression verschiedener Entzündungsfaktoren und oxidativer Stressmarker bestimmt. Bisher ist dahingehend kaum etwas über den Effekt von Metformin auf WAT bekannt, sodass diese Arbeit dazu beitragen kann, Erkenntnisse über die Wirkung auf diese Adipositas-Schlüsselmechanismen im WAT zu gewinnen.

Interessanterweise zeigten sowohl die HFD als auch die Metforminbehandlung unterschiedliche Effekte auf die mRNA-Expression im egWAT im Gegensatz zum scWAT. Im Vergleich der HFD zur SD war im scWAT ein Trend zu geringer exprimierten Entzündungsfaktoren und oxidativen Stressmarkern unter HFD zu erkennen. Im egWAT hingegen war kein modifizierender Einfluss der HFD auf Entzündungsfaktoren zu verzeichnen und es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression oxidativer Stressmarker. Während durch die Metforminbehandlung (HFD+MF) im Vergleich zur HFD die Expression von Entzündungsfaktoren im scWAT nicht verändert wurde und zwei anti-oxidative Stressmarker geringer exprimiert waren, konnte im egWAT eine verringerte Expression zweier Entzündungsfaktoren sowie eine massiv reduzierte Expression der pro- und anti-oxidativen Stressmarker durch Metformin beobachtet werden. Im scWAT der adipösen Mäuse konnten also keine Hinweise auf vermehrte Inflammation oder oxidativen Stress unter HFD detektiert werden und auch die Metformin-Effekte auf die mRNA-Expression fielen deutlich schwächer aus als im egWAT. Dieser unterschiedliche Einfluss auf egWAT und scWAT unterstreicht die bereits bekannten, verschiedenartigen Funktionen beider Fettdepots im Kontext von Adipositas und kann als Ausdruck dessen interpretiert werden, dass egWAT eine wesentlich bedeutsamere Rolle als Ursprungsort und Promotor von Inflammation und oxidativem Stress spielt als scWAT^{45,46}.

Da Adipositas mit einem chronischen Entzündungszustand und vermehrter Ausschüttung inflammatorischer Faktoren im WAT einhergeht^{59,60}, wäre zu erwarten gewesen, dass im WAT der HFD-Mäuse eine erhöhte Expression von Entzündungsfaktoren vorliegt, eine solche Beobachtung konnte jedoch weder im egWAT noch im scWAT gemacht werden. Möglicherweise konnte also entweder keine Entzündung durch die HFD induziert werden oder die induzierte Entzündung war auf mRNA-Expressionsebene nicht messbar. In exemplarischen Western Blots (Daten nicht gezeigt) konnte ebenfalls keine vermehrte Expression des Entzündungsfaktors IL-6 im egWAT der HFD-Mäuse gezeigt werden. Diese

Beobachtung steht vorherigen Forschungsergebnissen aus meiner Arbeitsgruppe entgegen, bei denen unter HFD im egWAT eine erhöhte IL-6-Expression auf mRNA- und Proteinebene festgestellt wurde¹⁴¹. Sie wäre jedoch im Einklang mit anderen Autoren, die ebenso fehlende Anzeichen einer WAT-Inflammation bei C57BL/6-Mäusen unter HFD feststellten¹⁴². Im egWAT der adipösen Mäuse konnte Metformin die mRNA-Expression von TNF- α signifikant und die von CXCL10 ($p = 0,132$) deutlich reduzieren, sodass eine antiinflammatorische Wirkung vermutet werden kann. TNF- α wirkt nicht nur proinflammatorisch, sondern befördert zusätzlich auch die Entwicklung einer Insulinresistenz⁶⁶, sodass der Effekt auch in dieser Hinsicht als positiv bewertet werden kann. Weil die Metforminwirkung auch vor dem Hintergrund betrachtet werden muss, dass hier keine HFD-induzierte Entzündung im Vergleich zur SD beobachtet werden konnte, ist zu mutmaßen, dass Metformin beim Vorliegen einer messbaren Entzündung unter Umständen eine ausgeprägtere Reduktion der Entzündungsfaktoren auf mRNA-Expressionsebene gezeigt hätte.

Wie es bei Adipositas zu erwarten gewesen wäre, war im egWAT der HFD-Mäuse ein Bild von oxidativem Stress zu beobachten, welches sich durch eine stark erhöhte mRNA-Expression verschiedener NADPH-Oxidase-Untereinheiten zeigte. Von einer begleitenden Erschöpfung der antioxidativen Reserve kann insgesamt nicht gesprochen werden, da zwar die SOD1-Expression verringert war, jedoch GPX1 vermehrt exprimiert wurde und die CAT-Expression sich unverändert verhielt. Folglich wurde durch den HFD-induzierten oxidativen Stress offenbar die antioxidative SOD1-Kapazität im egWAT erschöpft, während GPX1 kompensatorisch eine vermehrte Expression erfuhr. Durch Metformin wurde die Expression der NADPH-Oxidase-Untereinheiten im egWAT der adipösen Mäuse massiv depletiert, was auf eine ausgeprägte Reduktion des HFD-induzierten oxidativen Stresses hindeutet. Gleichzeitig wurde allerdings auch die mRNA-Expression antioxidativer Enzyme (SOD1, GPX1, CAT) stark reduziert. Eine Erhöhung der antioxidativen Reserve, wie sie für Metformin auf systemischer Ebene⁷⁹⁻⁸¹ und in Lebergewebe¹⁴³ bereits gezeigt wurde, konnte dementsprechend auf mRNA-Expressionsebene im egWAT nicht beobachtet werden. Da eine solche Reduktion von SOD und CAT durch eine Metforminbehandlung auch schon in Muskelgewebe diabetischer Ratten nachgewiesen wurde¹⁴⁴, liegt es nahe, dass Metformin durch verminderten oxidativen Stress die Expression antioxidativer Enzyme möglicherweise sekundär reduziert. Dadurch wäre eventuell auch die isoliert reduzierte mRNA-Expression von SOD1 und GPX1 im scWAT der adipösen Metformin-behandelten Mäuse zu erklären.

Aus verschiedenen Gründen korreliert die mRNA-Expression nicht unmittelbar mit der Protein-Expression¹⁴⁵. Es ist daher anzustreben, diese Erkenntnisse in nachfolgenden Untersuchungen durch Protein-basierte oder andere Methoden, wie der Messung der totalen antioxidativen Kapazität, zu überprüfen. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Metformin, neben seiner bereits bekannten systemischen Reduktion von Inflammation und oxidativem

Stress, diesen beiden Mechanismen auch auf mRNA-Expressionsebene im egWAT entgegenwirken kann. Es ist demnach denkbar, dass eine Metforminbehandlung in der Schwangerschaft durch die Unterbindung dieser Schlüsselmechanismen im viszeralen WAT potenziell Adipositas-assoziierte Komplikationen verhindern kann.

5.5 Einfluss auf die globale Proteinexpression im egWAT

Um Metformin-Effekte auf Proteinebene zu untersuchen, wurde ein Proteomic Screen des WATs durchgeführt. Da egWAT im Vergleich zu scWAT metabolisch aktiver ist und in einem engeren Zusammenhang mit Adipositas-assoziierten Folgeerkrankungen steht^{45,47}, wurde es in dieser Arbeit gewählt, um mögliche Effekte einer Metforminbehandlung auf das WAT-Proteom zu detektieren, die sich unter Umständen indirekt auf den gesamten Körper auswirken können. Die Analyse zeigte deutliche Unterschiede des globalen Proteinexpressionsmusters von HFD zu SD, sowie von den Metformin-behandelten Gruppen (HF+MF, SD+MF) zu ihren Vergleichsgruppen. Es ist außerdem davon auszugehen, dass Metformin sich in ähnlicher Weise auf das Proteom der HFD+MF und SD+MF ausgewirkt hat, da die Hauptkomponentenanalyse eng benachbarte Cluster der beiden Gruppen ergab. Insgesamt hat die zugeführte Diät das globale Proteinexpressionsmuster stärker beeinflusst als die Metformineinnahme. Sowohl die Anzahl der signifikant regulierten Proteine (Fold Change > 1,5, q-Wert < 0,05) als auch das Ausmaß ihrer Veränderung war im Vergleich der beiden Diäten (HFD vs. SD) größer als in den Metformin-behandelten Gruppen bezogen auf ihre Vergleichsgruppen (HFD+MF vs. HFD, SD+MF vs. SD). Dass der Vergleich SD+MF vs. SD mehr signifikant regulierte Proteine ergab als HFD+MF vs. HFD, ist eher auf die geringere n-Zahl der HFD+MF-Gruppe als auf einen ausgeprägteren Effekt von Metformin auf das Proteom der SD-Mäuse zurückzuführen (n = 5 für SD, HFD und SD+MF; n = 4 für HFD+MF).

5.5.1 Veränderungen durch HFD

Um den Einfluss von Metformin auf das egWAT-Proteom nachvollziehen zu können, sollen zunächst die Effekte der Adipositas-induzierenden HFD charakterisiert werden.

5.5.1.1 Fettgewebsfibrose

Bei der Entwicklung einer Diät-induzierten Adipositas kommt es zur Ausdehnung des viszeralen WATs und umfangreichen Umbauprozessen innerhalb des Gewebes¹⁴⁶. Die Proteom-Analyse zeigte, dass die egWAT-Zellen mit einer Hochregulation von Proteinen des (Aktin-)Zytoskeletts und seiner Organisation, Proteinen der extrazellulären Matrix und Zelladhäsions-Proteinen reagieren, um sich an die steigende mechanische Belastung durch die Expansion zu adaptieren. Adipozyten spielen eine wichtige Rolle beim Adipositas-bedingten fibrotischen Umbau des WATs und ihre metabolische Funktion wird im Zuge dessen

vermehrt beeinträchtigt¹⁴⁶. Die Fettgewebsfibrose wird zunehmend als eine wesentliche Ursache für metabolische Dysregulation unter Adipositas und Typ-2-Diabetes angesehen¹⁴⁷.

5.5.1.2 Hochregulation des TGF- β -Signalwegs

Als übergeordnete Veränderung konnten Hinweise auf eine Hochregulation des TGF- β -Signalwegs im egWAT durch die HFD identifiziert werden. Da TGF- β vermehrt im Fettgewebe adipöser Mäuse exprimiert wird und sein Vorkommen mit muriner und humaner Adipositas korreliert¹⁴⁸, wäre dies ein Adipositas-typischer Effekt der HFD. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich eine Blockade der TGF- β -Signaltransduktion in vielfältiger Weise protektiv auf die Entwicklung von Diabetes und Adipositas auswirkt¹⁴⁸. In der Proteom-Analyse zeigte sich Gna13, das TGF- β induziert¹⁴⁹, als am stärksten hochreguliertes Protein. Es lässt sich vermuten, dass die ebenfalls deutlich hochregulierten Proteine Rab34 (5fach) und Gak (4,3fach) auch am TGF- β -Signalweg im WAT beteiligt sein könnten. Rab34 gehört zu einer Proteinfamilie, die essenziell für die Signaltransduktion Membran-gebundener Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie TGF- β , ist¹⁵⁰. Gak ist eine mit CDK5 (Cyclin-dependent Kinase 5) assoziierte Kinase, die wiederum nachweislich durch TGF- β induziert wird¹⁵¹. Obwohl der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht vollständig verstanden ist, gilt TGF- β als wichtiger Regulator der Fettgewebsfibrose unter Adipositas¹⁵². Die hier gemachte Beobachtung von hochregulierten Proteinen des Zytoskeletts, der extrazellulären Matrix und der Zelladhäsion in Kombination mit Anzeichen für eine hochregulierte TGF- β -Signaltransduktion bestätigt diesen Zusammenhang.

5.5.1.3 Sekretierte Proteine und Immunantwort

Einige hochregulierte Proteine der Zytoskelettorganisation können auch sekretiert werden und sind zudem Teil der Immunantwort (Anxa1, Anxa5). Anxa1 und Anxa5 besitzen eine antiinflammatorische Wirkung^{153,154} und sind nachweislich im WAT adipöser Individuen erhöht¹⁵⁵. Da eine sinkende Anxa1-Plasmakonzentration mit vermehrter Adipositas-bedingter chronischer Inflammation in Verbindung gebracht wird¹⁵⁶, könnte seine Erhöhung im egWAT der HFD-Mäuse Zeichen der noch vorhandenen Kompensation einer vor sich gehenden Inflammation sein. Ein weiteres Anzeichen einer ablaufenden Inflammation im egWAT unter HFD könnte die Hochregulation des Komplementfaktor-C1-Bestandteils C1ra sein, der die erste Komponente des klassischen Weges des Komplementsystems darstellt. Als weiteres sekretiertes Protein zeigte sich ApoA4 hochreguliert, dessen Plasmakonzentration durch eine fettreiche Diät zunächst ansteigt¹⁵⁷. Es hat vielfältige positive Effekte, so wirkt es antiinflammatorisch, erhöht die Insulinausschüttung und aktiviert die Lipoprotein-Lipase¹⁵⁸, die essenziell für die Lipidaufnahme in die Adipozyten ist. Auch seine Hochregulation kann als anfänglicher Kompensationsmechanismus unter der HFD angesehen werden, während ein ApoA4-Mangel mit Adipositas-Folgeerkrankungen verbunden ist¹⁵⁸.

5.5.1.4 Reduzierte respiratorische Kapazität

Neben fibrotischen Umbauprozessen konnte in dieser Arbeit eine gravierende Abnahme mitochondrialer Proteine als bedeutendste Adipositas-induzierte Veränderung des egWAT-Proteoms identifiziert werden. Mitochondrien dienen der Zelle durch ATP-Synthese in der Atmungskette als essenzieller Energielieferant. Darüber hinaus sind sie in Adipozyten für den Lipidstoffwechsel und die Produktion von Adipokinen unerlässlich, deshalb ist es gut denkbar, dass sich eine veränderte Mitochondrienfunktion auf die Funktion der Adipozyten und somit sekundär auf den gesamten Körper auswirkt¹⁵⁹. Untereinheiten aller fünf Komplexe der Atmungskette waren im Vergleich der HFD mit SD runterreguliert, mit besonderem Fokus auf Komplex I. Dazu passend war auch Taco1 als Translations-Aktivator für Komplex IV runterreguliert. HFD-induzierte Adipositas führt sowohl durch eine zurückgehende Anzahl als auch eine beeinträchtigte Funktion der Mitochondrien zu einer reduzierten respiratorischen Kapazität der Adipozyten¹⁵⁹. Diese mitochondrialen Veränderungen sind nicht nur mit Adipositas, sondern auch mit dem Auftreten eines Typ-2-Diabetes assoziiert¹⁶⁰. Ob die beeinträchtigte Mitochondrienfunktion unter Adipositas zur Entwicklung von Folgeerkrankungen beiträgt oder eine physiologische Anpassungsreaktion an den adipösen Zustand darstellt, bleibt bisher fraglich.

5.5.1.5 Beeinflussung zentraler Stoffwechselwege und Insulinresistenz

Als weitere grundlegende Veränderung des egWAT-Proteoms unter HFD zeigten sich eine Runterregulation der De-novo-Lipidsynthese und der β -Oxidation von Fettsäuren. Auch in humanen Studien wurde unter Adipositas eine verringerte Expression lipogener Enzyme im viszeralen Fettgewebe festgestellt¹⁶¹. Es gibt Hinweise darauf, dass eine reduzierte De-novo-Lipidsynthese zur Progression einer Adipositas und ihren zugrundeliegenden Mechanismen führt¹⁶². Eine entsprechende Erklärung für die verringerte Lipogenese kann die beobachtete massive Runterregulation mehrerer regulatorischer Proteine (Thrsp, Pdk2, Mid1ip1, Scd1) liefern, die Lipogenese-induzierend wirken. Mit einer 12,5fachen Runterregulation unter HFD war Thrsp (Thyroid hormone-inducible hepatic protein)¹⁶³ das am stärksten veränderte Protein im Vergleich zur SD, zusätzlich waren auch Pdk2 (Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2; 8,8fach)¹⁶⁴, Mid1ip1 (Mid1-interacting protein 1; 4,8 fach)¹⁶³ und Scd1 (Acyl-CoA desaturase 1; 3fach)¹⁶⁵ deutlich runterreguliert. Über die metabolische Relevanz der β -Oxidation von Fettsäuren in Adipozyten gibt es erst wenige Erkenntnisse. In-vitro-Studien zeigen, dass eine gesteigerte β -Oxidation zu verbesserter Insulinsensitivität der Adipozyten und reduzierter Inflammation führt^{166,167}. Des Weiteren kann vermutet werden, dass eine Dysbalance, zwischen gesteigerter Lipidaufnahme unter HFD und gleichzeitig reduzierter Lipidverwertung, zu einer vermehrten Freisetzung freier Fettsäuren aus den Adipozyten führt, die wiederum andere Gewebe und Organe belasten können. Demnach können eher negative Auswirkungen der reduzierten Fettsäure- β -Oxidation angenommen werden.

Mit der Runterregulation der Glykolyse und des Glykogenmetabolismus im egWAT konnten weitere Beeinflussungen zentraler Stoffwechselwege durch die HFD detektiert werden. Diese Veränderungen könnten unter anderem auf eine beginnende Insulinresistenz der Adipozyten zurückzuführen sein. Insulin vermittelt den Einbau von Glukosetransportern in die Zellmembran und damit die Aufnahme von Glukose in die Adipozyten, stimuliert die Glykolyse über die Enzyme Hexokinase und 6-Phosphofruktokinase, regt die Glykogensynthese an und stimuliert die Lipidsynthese¹⁶⁸. Sämtliche dieser Prozesse zeigten sich im egWAT-Proteom der HFD-Mäuse in die Gegenrichtung verändert. Der GLUT4-Glukosetransporter (Slc2a4) war runterreguliert, ebenso wie Hexokinase-2 (Hk2), 6-Phosphofruktokinase (Pfk1), weitere glykolytische Enzyme und vier Proteine der Glykogensynthese.

5.5.1.6 Oxidativer Stress

Schließlich gab es zudem Hinweise auf eine reduzierte antioxidative Kapazität, die durch andauernden oxidativen Stress im egWAT der HFD-Mäuse verursacht sein könnte. Thioredoxin (Txn2), zwei Thioredoxin-Reduktasen (Txnrd1, Txnrd2), das durch Thioredoxin aktivierte Antioxidans 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (Mpst)¹⁶⁹, Glutathione S-transferase A3 (Gsta3) und Aldehyddehydrogenase-2 (Aldh2), die alle oxidativem Stress entgegenwirken, waren runterreguliert.

5.5.1.7 Zusammenfassung

Insgesamt konnten tiefgreifende Veränderungen des egWAT-Proteoms durch die HFD festgestellt werden. Ein hochregulierter Umbau des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix, Indikatoren für eine vermehrte TGF- β -Signaltransduktion, eine dezimierte respiratorische Kapazität, umfangreiche Veränderungen zentraler Stoffwechselwege der Adipozyten und Anzeichen einer sich entwickelnden Insulinresistenz stehen dabei im Vordergrund. Zudem bestehen Hinweise auf ablaufende inflammatorische Prozesse und oxidativen Stress.

5.5.2 Metformin-vermittelte Veränderungen im egWAT adipöser Mäuse

Da die beobachteten Veränderungen durch die HFD alles in allem als Adipositas-typisch zu bewerten sind, kann auf dieser Grundlage die Wirkung der Metforminbehandlung auf das egWAT-Proteom der adipösen Mäuse beurteilt werden. Aufgrund der festgestellten Parallelen zur humanen Adipositas sind auch Schlüsse für eine mögliche Metformintherapie adipöser Schwangerer denkbar.

5.5.2.1 Transkription und Translation

Bei der Analyse des egWAT-Proteoms der HFD+MF-Mäuse im Vergleich zur HFD fiel besonders die Hochregulation multipler Zellkern-assoziiierter Proteine auf. Es konnten sieben Proteine identifiziert werden, die unter Metformin regulatorisch auf Transkription (Smarca4, Smarcc2, Nfia, Bclaf1, Hnrnpdl) und Translation (Fxr1, Tcof1) einwirken. Eine

Literaturrecherche ergab keinen direkten, bisher bekannten Zusammenhang dieser Proteine mit Metformin, sodass die Erkenntnisse dieser Arbeit neue potenzielle Faktoren hervorbringen konnten, die die Metforminwirkung auf WAT vermitteln. Smarca4 und Smarcc2 sind Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes, der die Transkription durch Nukleosomen-Remodellierung beeinflusst und vermutlich eine bedeutsame Rolle in der Tumorsuppression spielt¹⁷⁰. Dass Metformin mit einer reduzierten Malignominzidenz assoziiert wird¹⁷¹, passt zu dieser Erkenntnis. Nfia (Nuclear factor 1-A) ist ein wichtiger Transkriptionsaktivator, der zur zellspezifischen Genexpression in braunem Fettgewebe beiträgt¹⁷². Seine Hochregulation legt nahe, dass Metformin die Rekrutierung von braunen Fettzellen bewirkt bzw. zum sogenannten „Browning“ des WATs führt, bei dem beige Adipozyten im WAT induziert werden¹⁷³. Da braune und beige Adipozyten die Energie aus der β -Oxidation von Fettsäuren in Wärme umsetzen können, indem die Atmungskette von der ATP-Synthese entkoppelt wird, ist die Steigerung des Energieumsatzes in braunem Fettgewebe ein attraktiver Therapieansatz für Adipositas¹⁷². Eine erhöhte Expression von Markern für braunes Fettgewebe im WAT adipöser Mäuse wurde bereits für Metformin gezeigt¹⁷⁴, demzufolge ergänzt die hier beobachtete verstärkte Expression von Nfia diese Erkenntnisse. Dass Bclaf1 (Bcl-2-associated transcription factor 1) durch Metformin hochreguliert wird, ist bisher nicht bekannt, allerdings wurde eine erhöhte hepatische Bcl-2-Signaltransduktion durch die Kombination von Metformin und Luteolin festgestellt¹⁷⁵. Eine Assoziation von Metformin mit Hnrnpdl (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like) oder mit der Translationsregulation durch Fxr1 (Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1) bzw. Tcof1 (Treacle protein) ist noch nicht bekannt. Ergänzend zu hochregulierten Proteinen, die Transkription und Translation beeinflussen, waren auch multiple Proteine der Ribonukleotid-Synthese (Adsl, Nt5c3a, Uck1), des Spleißosoms (Hnrnpc, Acin1, Ddx46) und der Nukleosomen-Organisation (Ipo4), sowie an der Proteinfaltung beteiligte Proteine (Dnaja2, Dnajb6) verstärkt exprimiert. Es lässt sich vermuten, dass diese Proteine ebenfalls an der Umsetzung der Metforminwirkung im egWAT der adipösen Mäuse beteiligt sind.

5.5.2.2 Gesteigerte respiratorische Kapazität und Adipozyten-Stoffwechsel

Die unter HFD beobachtete Runterregulation mitochondrialer Proteine konnte durch die Metforminbehandlung teilweise wieder umgekehrt werden, was sich anhand einer Reihe hochregulierter mitochondrialer Proteine zeigte. Darunter waren auch Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe I (Ndufv3, Ndubf2) und V (Atp5o), sodass Metformin vermutlich die respiratorische Kapazität im egWAT steigert. Dieses Ergebnis ergänzt die Beobachtung von Wang et al., die eine Erhöhung der hepatischen respiratorischen Kapazität durch Metformin feststellen konnten¹⁷⁶.

Hinzu kommt die Hochregulation von Proteinen des Lipidmetabolismus (Mlycd, Acot13) und der Glykolyse (Gapdh), sowie deren Regulation (Pdk2). Interessant ist dabei, dass Mlycd und

Pdk2 unter HFD stark herunterreguliert waren (6,34- bzw. 8,76fach) und sich nach Metformingabe in der HFD+MF-Gruppe eine deutliche Gegenregulation zeigte (7,19- bzw. 4,35fach hochreguliert). Da beide Enzyme das Gleichgewicht zwischen Lipid- und Glukosestoffwechsel regulieren^{177,178}, begünstigt ihre Hochregulation die Verstoffwechslung von Fettsäuren gegenüber Glukose. In Kombination mit der womöglich gesteigerten respiratorischen Kapazität, kann dieser Metformin-Effekt als beginnende Entwicklung von der Adipositas-assoziierten Dysregulation unter HFD zurück zu einem physiologischeren und ausgeglicheneren Adipozyten-Stoffwechsel interpretiert werden.

5.5.2.3 Effekte durch Opa3- und ApoA4-Hochregulation

Wie Mlycd und Pdk2 war auch Optic atrophy 3 protein homolog (Opa3) im egWAT der adipösen Mäuse herunterreguliert und wurde durch die Metformingabe in die entgegengesetzte Richtung verändert. Bisher ist nur wenig über seine Funktion im WAT bekannt, allerdings scheint es an der Regulierung der Mitochondrienfunktion, des Lipidstoffwechsels, der viszeralen Fettmenge und der Thermogenese im Fettgewebe beteiligt zu sein¹⁷⁹. Die beobachtete Gegenregulation unter Metformin lässt vermuten, dass durch Opa3 vielfältige Effekte auf das egWAT vermittelt werden können, die den Auswirkungen der Diät-induzierten Adipositas direkt entgegenwirken und den Energieumsatz steigern könnten.

Das sekretierte Protein ApoA4 war ebenfalls durch Metformingabe in der HFD+MF-Gruppe hochreguliert und könnte potenziell als Adipokin fungieren. Es sind vielfältige positive ApoA4-Effekte in Bezug auf Inflammation, den Stoffwechsel und das Vorkommen von Adipositas-Folgeerkrankungen beschrieben (s. Kapitel 5.5.1.3), eine Sekretion durch WAT ist jedoch noch nicht bekannt. Da sich im Vergleich zur SD bereits eine erhöhte Expression von ApoA4 bei den HFD-Mäusen zeigte, scheint die nochmals gesteigerte Hochregulation unter Metformin diesen Kompensationsmechanismus noch weiter zu verstärken.

5.5.2.4 Reduzierter oxidativer Stress

Die Gapdh (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) ist nicht nur ein Schlüsselenzym der Glykolyse, sondern fungiert auch als Stoffwechselschalter, um oxidativem Stress entgegenzuwirken¹⁸⁰. Sie wird beim Vorliegen von Oxidationsmitteln deaktiviert, wodurch Glukose von der Glykolyse zum Pentosephosphatweg umgeleitet wird, sodass mehr NADPH entsteht, das wiederum als antioxidativer Cofaktor dient¹⁸⁰. Eine hochregulierte Gapdh kann also auch einen Hinweis auf geringeren oxidativen Stress in der HFD+MF-Gruppe geben. Da zusätzlich drei weitere Proteine (Mgst1, Mgst3, Naprt) hochreguliert waren, die oxidativem Stress entgegenwirken, kann vermutet werden, dass Metformin oxidativen Stress im egWAT der adipösen Mäuse reduzieren und die antioxidative Kapazität erhöhen konnte. Mgst1 (Microsomal glutathione S-transferase 1) und Mgst3 (Microsomal glutathione S-transferase 3) sind Teil einer Proteinfamilie, die oxidativen Stress reduzieren, indem sie Oxidantien durch Konjugation mit Glutathion eliminieren¹⁸¹. Naprt (Nicotinate phosphoribosyltransferase)

reduziert oxidativen Stress durch Auffüllen der zellulären Speicher des antioxidativen Cofaktors NAD¹⁸².

5.5.2.5 Perilipin-1-Runterregulation als Korrelat der reduzierten Fettzellgröße

Interessanterweise war mit Perilipin-1 (Plin1) in der HFD+MF-Gruppe ein Protein massiv (15,7fach) runterreguliert, dessen Abwesenheit bereits von verschiedenen Studien mit Schlankheit in Verbindung gebracht wurde^{183,184}. Perilipin-1 umhüllt die Lipidvakuole der Adipozyten und ist an der Regulation der Lipolyse beteiligt¹⁸³. Ein Perilipin-1-Mangel führt bei Mäusen zu einem schlanken Phänotyp, mit einer Resistenz gegenüber Diät-induzierter Adipositas, erhöhter adipozytärer Lipolyse und einer verstärkten Ausschüttung des protektiven Adipokins Leptin^{183,184}. Die Perilipin-1-Runterregulation unter Metformin liefert demzufolge ein Gegenstück für die beobachtete makroskopische Reduktion der egWAT-Masse und Fettzellgröße.

5.5.2.6 Inhibierung des NF-κB-Signalwegs

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Metformin durch Beeinflussung von NF-κB antiinflammatorisch wirkt¹⁸⁵, die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht im Detail bekannt. Der NF-κB-Signalweg besitzt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung verschiedener metabolischer Erkrankungen im Fettgewebe und anderen Organen¹⁸⁶ und seine Marker sind bei Adipositas im WAT erhöht¹⁸⁷. NF-κB ist ein Transkriptionsfaktor, der als ein bedeutender Treiber der Adipositas-assoziierten Inflammation vermutet wird¹⁸⁶. Er wird unter anderem durch TNF-α aktiviert und induziert nach seiner Translokation in den Zellkern die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine¹⁸⁸. Aufgrund der Proteom-Analyse lässt sich nun schlussfolgern, dass dieser Metformin-Effekt im WAT offenbar nicht durch das NF-κB-regulierende Protein Tmsb4x (Thymosin beta-4)¹⁸⁸ vermittelt wird, da es in der HFD+MF-Gruppe massiv (33fach) runterreguliert war. Es konnten jedoch vier bisher unbekannte Mechanismen identifiziert werden, durch die Metformin potenziell NF-κB und die damit verbundene Inflammation im egWAT inhibieren kann. Follistatin-related protein 1 (Fstl1) sorgt für eine vermehrte Expression proinflammatorischer Faktoren und wird mit Adipositas-assoziiierter Inflammation und Insulinresistenz in Verbindung gebracht¹⁸⁹. Zwei Studien konnten zeigen, dass diese Wirkung wahrscheinlich durch Aktivierung des NF-κB-Signalwegs ausgelöst wird^{189,190}. Die 3,2fache Runterregulation von Fstl1 in der HFD+MF-Gruppe legt nahe, dass sie Teil der Metformin-vermittelten Inhibierung von NF-κB ist. Auch das 2,1fach runterregulierte Nol3 (Nucleolar protein 3) bewirkt die Expression proinflammatorischer Faktoren und wurde bereits mit NF-κB-Aktivierung assoziiert¹⁹¹, sodass es als Mechanismus in Frage kommt. Kpna4 (Importin subunit alpha-3) ist eine Untereinheit von Importin-α3, das u. a. spezifisch den Import von NF-κB in den Zellkern vermittelt¹⁹². Durch seine Runterregulation unter Metformin könnte die Translokation von NF-κB in den Zellkern reduziert werden. Der vierte potenzielle Mechanismus der NF-κB-Inhibierung durch Metformin ist die

Runterregulation des Strap (Serine-threonine kinase receptor-associated protein), das ebenfalls bereits mit einer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in Verbindung gebracht wurde¹⁹³.

5.5.2.7 Inhibierung des TGF- β -Signalwegs

Neben seinem Einfluss auf NF- κ B hemmt Metformin ebenso die, bei Adipositas erhöhte, TGF- β -Signaltransduktion. Metformin agiert als TGF- β -Suppressor, indem es direkt an TGF- β bindet, die Bindung an seinen Rezeptor hindert und die weitere Signaltransduktion unterdrückt¹⁹⁴. Das runterregulierte Fstl1 gehört nicht nur zum NF- κ B-Signalweg, sondern wurde auch als TGF- β -induziertes Gen entdeckt¹⁹⁵, seine Runterregulation könnte also gleichzeitig ein Anzeichen reduzierter TGF- β -Signaltransduktion durch Metformin sein. Des Weiteren war Lrg1 (Leucine-rich HEV glycoprotein) 3,4fach runterreguliert, sowie Dctn3 (Dynactin subunit 3) 8,5fach und Fbn2 (Fibrillin-2) 8fach hochreguliert. Diese Proteine könnten bisher noch nicht bekannte Mediatoren der Metformin-vermittelten TGF- β -Hemmung sein. Das runterregulierte Lrg1 fungiert als Ligand des TGF- β -Rezeptors, sodass es den TGF- β -Signalweg aktiviert¹⁹⁶. Dctn3 ist eine Untereinheit von Dynactin, das die TGF- β -Signaltransduktion hemmt, indem es die Translokation von SMAD2, einem TGF- β -induzierten Transkriptionsfaktor, in den Zellkern blockiert¹⁹⁷. Fibrillin-2 bindet TGF- β in der extrazellulären Matrix und verhindert auf diese Weise seine Rezeptoraktivierung, wie in einer Studie zur murinen Knochenbildung gezeigt wurde¹⁹⁸. Diese drei regulierten Proteine liefern dementsprechend neue Erklärungsansätze für die Metformin-vermittelte TGF- β -Hemmung. Im Fall von TGF- β und NF- κ B ist für die Initiierung des Signalwegs u. a. die Endozytose des vermittelnden Rezeptors erforderlich, anschließend kann der Rezeptor vom Endosom aus zurück an die Plasmamembran transportiert werden (endozytotisches Recycling)¹⁹⁹. Es ist somit zu vermuten, dass die beobachtete Runterregulation von Proteinen, die am intrazellulären Vesikel-Transport (Rab14, Adam10, Nucleb1) und endozytotischen Recycling (Snx4, Vps29) beteiligt sind, durch eine reduzierte Signaltransduktion solcher Rezeptoren unter Metformin verursacht wird.

5.5.2.8 Aktivierung des AMPK-Signalwegs

Ein dritter Signalweg, der durch Metformin beeinflusst wird, ist der AMPK-Signalweg²⁰⁰. In seinem Mittelpunkt steht die AMP-abhängige Kinase (AMPK), die als bedeutender Regulator des Energiestoffwechsels den Appetit, das Körpergewicht, den Zellstoffwechsel sowie den Stoffwechsel des gesamten Körpers beeinflusst²⁰¹. Bei verschiedenen Erkrankungen wie Adipositas und Diabetes oder Inflammation kommt es zu einer AMPK-Dysregulation²⁰². Dementsprechend ist eine reduzierte AMPK-Aktivität mit Inflammation im viszeralen WAT und einer Insulinresistenz assoziiert²⁰³. Die Aktivierung des AMPK-Signalwegs, wie sie durch Metformin bewirkt wird²⁰⁰, stellt folglich einen vielversprechenden Ansatz der Adipositas-therapie dar. In der Proteom-Analyse des egWATs konnte die Runterregulation

zweier Protein-Phosphatasen (Ppp1r1a, Ppp2ca) als möglicher neuer Mechanismus der Metformin-vermittelten AMPK-Aktivierung identifiziert werden. Ppp1r1a ist eine Untereinheit der Protein phosphatase 1, die AMPK durch Dephosphorylierung inaktiviert, ebenso wie Ppp2ca als Untereinheit der Protein phosphatase 2A²⁰⁴. Durch die 9,1fache Runterregulation von Ppp1r1a sowie 1,7fache Runterregulation von Ppp2ca könnte Metformin die AMPK-Inaktivierung hemmen, was wiederum eine verstärkte AMPK-Aktivierung im egWAT der adipösen Mäuse zur Folge hätte. Eine Depletion dieser beiden Proteine ist bereits im Zusammenhang mit antitumoralen Effekten durch Metformin beobachtet worden^{205,206}. Zusätzlich kommt es durch eine aktivierte AMPK sowohl zur Hemmung des TGF- β - als auch des NF- κ B-Signalwegs^{207,208}, sodass die AMPK-Aktivierung im egWAT einen weiteren möglichen Auslöser der TGF- β - und NF- κ B-Inhibierung bietet.

5.5.2.9 Zusammenfassung

Durch Beeinflussung dieser drei Signalwege kann Metformin Inflammation und oxidativen Stress im egWAT der adipösen Mäuse hemmen, die als Schlüsselmechanismen in der Entwicklung einer Adipositas und ihrer Folgeerkrankungen gelten. Die Inhibierung des TGF- β - und NF- κ B-Signalwegs wirkt antiinflammatorisch, indem die Ausschüttung proinflammatorischer Faktoren gehemmt wird^{148,186}. Auch der Adipositas-induzierten Fettgewebsfibrose und damit einhergehenden metabolischen Dysregulation kann eine inhibierte TGF- β -Signaltransduktion entgegenwirken. Eine AMPK-Aktivierung wirkt, u. a. über die Hemmung der TGF- β - und NF- κ B-Signaltransduktion, ebenfalls antiinflammatorisch und reduziert darüber hinaus oxidativen Stress²⁰⁸.

Insgesamt konnten vielfältige Effekte durch Metformin auf das egWAT-Proteom der adipösen Mäuse beobachtet werden, die das Potenzial einer Metforminbehandlung adipöser Schwangerer unterstreichen. Eine womögliche Steigerung der respiratorischen Kapazität gibt, zusammen mit der Hochregulation grundlegender Stoffwechselwege, Anzeichen für eine beginnende Gegenregulation der Adipositas-assoziierten Veränderungen unter HFD hin zu einem physiologischeren Adipozyten-Stoffwechsel. Als weitere wesentliche Effekte können die vermutliche Beeinflussung von Adipositas-Schlüsselmechanismen, Hinweise auf reduzierten oxidativen Stress sowie Anzeichen einer Rekrutierung von braunem Fettgewebe (Browning) unter Metformin herausgestellt werden. Mit der Runterregulation von Perilipin-1 konnte ein vielversprechendes Korrelat der beobachteten reduzierten egWAT-Masse und Fettzellgröße detektiert werden. Zudem konnten verschiedene neue Mechanismen identifiziert werden, die vermutlich entscheidend an der Vermittlung der Metformin-Effekte im egWAT beteiligt sind und somit zum Verständnis der, bisher erst teilweise verstandenen, Wirkungsweise dieses Medikaments beitragen.

5.5.3 Gemeinsame Metformin-Effekte in HFD+MF und SD+MF

In der Gegenüberstellung der Metformin-Effekte auf das egWAT-Proteom der HFD+MF-Mäuse im Vergleich zu den Effekten auf die SD+MF-Mäuse, waren 16 Proteine in beiden Vergleichen signifikant reguliert: Lrg1, Plin1, Gpt, Nol3, Ppp2ca, Selenbp1, Strap und Ube2l3 waren gleichermaßen runterreguliert, Dctn3, Tcof1, Ddx46, Cobll1, Ube2z, Serpina1c, Etfa und Gapdh waren gleichermaßen hochreguliert. Es ist davon auszugehen, dass diese Proteine in besonderem Maße an der Vermittlung der Metformin-Effekte im egWAT beteiligt sind, da sie unabhängig von der Diät einheitlich reguliert waren. Ihre Betrachtung ist besonders interessant, da bisher kaum etwas über ihren Zusammenhang mit Metformin bekannt ist.

5.5.3.1 Beeinflussung des NF- κ B-, TGF- β - und AMPK-Signalwegs

Dass Lrg1 und Dctn3 unter diesen Proteinen sind, erhärtet die hier angestellte Vermutung, dass ihre Regulation zur TGF- β -Inhibierung unter Metformin beiträgt. Lrg1, das im Gegensatz zu Dctn3 sekretiert wird, wird zudem als neuer Biomarker für Inflammation und kardiovaskuläre Erkrankungen diskutiert²⁰⁹, sodass seine Runterregulation auch unter diesem Aspekt als positiv zu bewerten ist. Aufgrund der Erkenntnisse dieser Arbeit liegt es nahe, dass Lrg1 als Adipokin im egWAT sekretiert wird und sekundär zur systemischen Ausbreitung der WAT-Inflammation bei Adipositas beitragen könnte. Inwiefern diese Vermutung zutrifft, gilt es in weitergehenden Untersuchungen zu ergründen. Auch Ubiquitin-Modifikationen spielen eine bedeutende Rolle in der positiven und negativen Regulierung der TGF- β -Signaltransduktion²¹⁰, bisher sind jedoch nur wenige beteiligte Enzyme und zugrundeliegende Mechanismen erforscht. Das in beiden Metformin-behandelten Gruppen hochregulierte Ube2l3 sowie das runterregulierte Ube2z sind Teil der Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzymfamilie. Es liegt also nahe, dass beide an der Metformin-vermittelten TGF- β -Inhibierung im egWAT mitwirken könnten. Dass die Proteine Nol3 und Strap in beiden Metformin-behandelten Gruppen runterreguliert waren, unterstützt die hier aufgestellte These, dass Metformin durch Beeinflussung dieser Proteine antiinflammatorisch wirken könnte und dieser Effekt wahrscheinlich durch eine NF- κ B-Inhibierung vermittelt wird. Auch die Vermutung, dass Metformin durch Hemmung von Protein-Phosphatasen zur AMPK-Aktivierung im egWAT führt, wird durch die in HFD+MF und SD+MF runterregulierte Protein-phosphatase-2A-Untereinheit Ppp2ca unterstützt.

5.5.3.2 Perilipin-1-Runterregulation und Regulation potenzieller Adipokine

Perilipin-1 (Plin1) zeigte nicht nur eine massive Runterregulation in der HFD+MF-Gruppe, sondern war auch in der SD+MF-Gruppe 2,1fach runterreguliert. Dies erhärtet die Annahme, dass Perilipin-1 maßgeblich an der beobachteten Reduktion der egWAT-Masse und verringerten Fettzellgröße unter Metformin beteiligt ist. Das in beiden Gruppen hochregulierte Alpha-1-Antitrypsin (Serpina1c) ist neben Lrg1 ein weiteres sekretiertes Protein, das somit vermutlich ebenfalls als Adipokin im egWAT fungieren kann. Es besitzt eine

antiinflammatorische und immunmodulatorische Wirkung²¹¹, zudem scheint es die Insulinsekretion zu erhöhen und die Zytokin-vermittelte Apoptose pankreatischer β -Zellen zu verhindern²¹². Ein Alpha-1-Antitrypsin-Mangel ist mit Typ-2-Diabetes assoziiert²¹³ und die Therapie mit Alpha-1-Antitrypsin wird bereits als Behandlungsstrategie bei Typ-1-Diabetes erprobt²¹⁴. In der HFD+MF-Gruppe war mit Serpina1b zusätzlich eine weitere Untereinheit des Alpha-1-Antitrypsins 2,1fach hochreguliert. Die Hochregulation von Alpha-1-Antitrypsin im egWAT könnte folglich lokale, und sekundär auch systemische, antidiabetische, antiinflammatorische und immunmodulatorische Metforminwirkungen vermitteln. Über die Rolle des runterregulierten Selenbp1 (Selenium-binding protein 1) im Fettgewebe ist erst wenig bekannt. Es gilt als Marker der Zelldifferenzierung und ausgereifter Adipozyten²¹⁵. Des Weiteren scheint es den intra- und extrazellulären Redoxstatus zu regulieren²¹⁶ und wird zudem als Biomarker für kardiale Ereignisse diskutiert²¹⁷. Folglich könnte Metformin durch die Runterregulation von Selenbp1 oxidativen Stress im egWAT modulieren und möglicherweise auch systemisch wirken. Eine Sekretion von Selenbp1, das eher als intrazellulär vorkommendes Protein bekannt ist, durch WAT wurde bisher noch nicht nachgewiesen. Es kommt aber aufgrund dieser Erkenntnisse ebenfalls als potenzielles Adipokin in Frage.

5.5.3.3 Regulation von COBLL1 und weitere Effekte

Cobll1 (Cordon-bleu protein-like 1) war in beiden Metformin-behandelten Gruppen hochreguliert und wird durch den gleichnamigen Genlocus COBLL1 codiert, seine Funktion im WAT ist noch weitgehend unbekannt. Interessanterweise wird COBLL1 mit der Regulation von Leptin, dem Risiko für Typ-2-Diabetes, Blut-Triglyceridspiegeln und der Umverteilung von Fettgewebe von viszeralen in subkutane Depots in Verbindung gebracht²¹⁸. Die ausgeprägte Hochregulation von Cobll1 (HFD+MF 7,9fach, SD+MF 4,1fach) könnte also einen Hinweis darauf geben, dass Metformin-Effekte teilweise durch Regulation von COBLL1 bewirkt werden.

Der Zusammenhang von Metformin mit Gpt und Etf α wird ebenso noch zu klären sein. Serumlevel der Alanine aminotransferase 1 (Gpt) besitzen eine ausgeprägte Assoziation mit viszeraler Fettakkumulation²¹⁹ und sind mit multiplen kardiovaskulären Risiken wie Diabetes, Hypertonie und dem metabolischen Syndrom verbunden²²⁰. Die Proteom-Analyse gibt einen Hinweis darauf, dass Metformin Gpt nicht nur durch eine Reduktion der viszeralen Fettmasse, sondern auch davon unabhängig runterregulieren kann. Die mitochondriale Electron transfer flavoprotein subunit alpha (Etf α) war in beiden Metformin-behandelten Gruppen hochreguliert, sie überträgt Elektronen von verschiedenen Dehydrogenasen an die Atmungskette²²¹ und verbindet dadurch die Oxidation von Fett- und einigen Aminosäuren mit der mitochondrialen Atmung²²². Die Hochregulation von Gapdh könnte Ausdruck eines reduzierten oxidativen Stresslevels (s. Kapitel 5.5.2.4) oder einer Beeinflussung des Glukosestoffwechsels (s. Kapitel 5.5.2.2) unter Metformin sein. Das hochregulierte Protein Tcof1 ist ein Regulator der RNA-

Translation und Ddx46 ist am mRNA-Spleißprozess beteiligt, beide Proteine scheinen eine wesentliche Rolle bei der Umsetzung der Metforminwirkung im WAT zu spielen, da sie in beiden Metformin-behandelten Gruppen stark hochreguliert waren.

5.5.3.4 Zusammenfassung

Angesichts dieser Erkenntnisse konnte die Proteom-Analyse eine Vielzahl neuer potenzieller Mechanismen der Metformin-Effekte auf egWAT hervorbringen, die dabei helfen, seine Wirkungsweise gründlicher zu verstehen. Um diese Erkenntnisse weiter zu erhärten, werden weitergehende Untersuchungen notwendig sein, hier bietet diese Arbeit vielfältige Anstöße für nachfolgende Forschung. Insbesondere die potenziellen Adipokine Lrg1, Alpha-1-Antitrypsin (Serpina1b, Serpina1c), Selenbp1 und APOA4, die neuen Erkenntnisse zur Beeinflussung der TGF- β -, NF- κ B- und AMPK-Signaltransduktion, die Perilipin-1-vermittelte Reduktion der Fettzellmasse und die Hinweise auf eine COBLL1-Regulation durch Metformin sind hier herauszustellen. Zusammen mit der beobachteten Einwirkung auf Adipositas-Schlüsselmechanismen, Hinweise einer gesteigerten respiratorischen Kapazität und Anzeichen für WAT-Browning konnten folglich vielfältige positive Effekte der Metforminbehandlung im egWAT der adipösen tragenden Mäuse gezeigt werden.

5.5.4 Limitation

Generell wird die hier durchgeführte Proteom-Analyse mittels Massenspektrometrie stets durch die Komplexität des WATs limitiert. Da viele tausend Proteine in einer zu analysierenden Probe enthalten sind, deren Häufigkeit um mehrere Größenordnungen variiert, kommt es zu Schwierigkeiten bei der Identifizierung weniger häufig vorkommender Proteine, da sie von Proteinen mit großer Häufigkeit maskiert werden können²²³. Besonders sekretierte Proteine kommen im Vergleich zu intrazellulären Proteinen oft in geringerer Häufigkeit vor, sodass die durch egWAT sekretierten Adipokine wahrscheinlich schlechter identifiziert wurden. Weil die Wirkung auf Schlüsselmechanismen, wie die WAT-Inflammation, und mögliche systemische Metformin-Effekte, die durch Adipokine vom WAT ausgehen, von besonderem Interesse sind, sollte in nachfolgenden Untersuchungen das WAT-Sekretom besonders in den Fokus genommen werden. Dafür bieten sich verschiedenste Methoden an, um die Analyten vor der Massenspektrometrie auszudünnen und auf sekretierte Proteine zu reduzieren²²⁴. Eine weitere Beschränkung der Methode ergibt sich daraus, dass posttranslationale Modifikationen und die damit verbundene veränderte Proteinaktivität nicht berücksichtigt werden.

5.6 Einfluss auf das Blut-Fettsäureprofil durch HFD und Metformin

Es ist bereits aus murinen und humanen Studien bekannt, dass Metformin einer Dyslipidämie entgegenwirkt, indem es Triglyceride und LDL-Cholesterin im Serum senkt und HDL-Cholesterin erhöht^{174,225}. Da die Dyslipidämie ein wichtiges Bindeglied zwischen Adipositas

und der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes sowie kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt⁵⁰, könnte Metformin dadurch protektiv Adipositas-Folgeerkrankungen entgegenwirken. Auch adipöse Schwangere könnten von diesem Metformin-Effekt profitieren, durch den möglicherweise metabolische und kardiovaskuläre Komplikationen während und nach der Schwangerschaft reduziert werden könnten.

Über den Einfluss von Metformin auf das Gesamtfettsäureprofil im Blut ist bisher hingegen kaum etwas bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen deshalb grundlegende Erkenntnisse über den Effekt von Metformin auf das Blut-Fettsäureprofil adipöser Mäuse gewonnen werden. Die im Blut zirkulierenden Fettsäuren spiegeln zum Teil die über die Nahrung aufgenommenen Fettsäuren wider, ihre Zusammensetzung wird aber auch stark von der Aktivität körpereigener Fettsäure-Elongasen und -Desaturasen bestimmt⁵⁵. Weil die absolute Fettsäuremenge im Serum adipöser Individuen erhöht ist²²⁶, wäre zu erwarten gewesen, dass auch im Serum der HFD-Mäuse eine größere Menge Fettsäuren nachzuweisen ist, zumal die HFD fast siebenmal mehr metabolisierbare Energie aus Fett enthielt als die SD. Eine solche Beobachtung konnte bei der Bestimmung des Gesamtfettsäureprofils im Vergleich mit den anderen Gruppen jedoch nicht gemacht werden. Es besteht ein großes Forschungsinteresse bezüglich der Serumfettsäuren, da ihre spezifische Zusammensetzung mit verschiedenen metabolischen Erkrankungen in Verbindung gebracht wird. So wurde bereits in verschiedenen Studien ein Fettsäureprofil mit erhöhter Palmitin- und Palmitoleinsäure, sowie erniedrigter Linolsäure identifiziert, das sowohl mit Adipositas als auch mit Insulinresistenz, Typ-2-Diabetes und dem metabolischen Syndrom assoziiert ist^{52,54,227}. Auch eine Erhöhung von Stearinsäure und Ölsäure wurde im Zusammenhang mit Adipositas festgestellt⁵⁴. Ein dementsprechendes Fettsäureprofil der HFD-Mäuse konnte in dieser Arbeit jedoch ebenfalls nicht beobachtet werden. Als einzige signifikante Veränderung im Vergleich der verschiedenen Gruppen zeigte sich die signifikant verringerte Palmitoleinsäure im Serum der HFD+MF-Mäuse gegenüber der HFD. Dies kann als möglicher positiver Metformin-Effekt auf des Fettsäureprofil interpretiert werden, da insbesondere erhöhte Palmitoleinsäure mit viszeraler Adipositas und Inflammation assoziiert ist^{228,229}. Angesichts dessen, dass keine ergänzenden Effekte auf das Fettsäureprofil zu erkennen waren, bedarf diese alleinstehende Beobachtung jedoch einer eingehenderen Untersuchung, um sie zu überprüfen.

In der Gesamtbetrachtung konnten keine Adipositas-typischen Veränderungen des Fettsäureprofils im Vergleich der HFD mit der SD sowie eine isolierte Reduzierung der Palmitoleinsäure in der HFD+MF-Gruppe festgestellt werden. Da die egWAT-Masse und Gewichtszunahme der adipösen Mäuse unter der Metforminbehandlung deutlich abnahmen und eine Gewichtsreduktion in humanen Studien mit einem substanziellen Einfluss auf die Blutfettsäuren einhergeht²³⁰, wäre ein dementsprechender Effekt auf das HFD+MF-Fettsäureprofil zu vermuten gewesen. Möglicherweise war die n-Zahl der Serumproben zu

gering, sodass der Einfluss von Metformin und Adipositas auf das Fettsäureprofil durch große interindividuelle Schwankungen maskiert wurde. Dass die Mäuse nicht gefastet waren, könnte diese Schwankungen noch zusätzlich erhöht haben. Außerdem könnte die 15tägige Metforminbehandlung zu kurz gewesen sein, um eine wesentliche Beeinflussung der Blutfettsäuren zu bewirken. Dementsprechend werden weitergehende Untersuchungen notwendig sein, um den Effekt von Metformin auf das Blut-Fettsäureprofil umfänglicher zu ergründen und darauf beruhende Schlüsse für eine mögliche Behandlung adipöser Schwangerer ziehen zu können.

5.7 Zusammenfassende Diskussion, Limitation und Ausblick

Es ist davon auszugehen, dass im hier verwendeten Tiermodell, mit dem die Metforminbehandlung adipöser Schwangerer dargestellt werden soll, erfolgreich eine Adipositas der Versuchstiere hervorgerufen wurde. Dies ergibt sich aus dem μ CT-Nachweis des Adipositas-induzierenden Effekts der HFD in Kombination mit dem signifikant erhöhten Körpergewicht und dem deutlich größeren egWAT-Gewicht sowie der ausgeprägten Fettzellhypertrophie in der HFD-Gruppe. Auch die Metforminbehandlung der Versuchstiere kann als aussagekräftig bewertet werden. Durch die orale Verabreichung und die Anpassung der Metformin-Zieldosis an die, auch im klinischen Alltag verwendete, Dosis, wurde die Vergleichbarkeit zur humanen Metformintherapie gesteigert. Die gemessenen Metformin-Serumkonzentrationen lagen in einem mittleren bis hohen therapeutischen Bereich, sodass das Modell dazu geeignet scheint, physiologische Effekte der Behandlung darzustellen, obwohl die festgelegte Zieldosis letztendlich überschritten wurde. Insgesamt ist das gewählte Mausmodell demnach geeignet, um eine Metforminbehandlung adipöser Schwangerer hinreichend abzubilden.

Bei der Bewertung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass Menschen kein direktes Äquivalent zum hier verwendeten egWAT besitzen, da sie intraabdominelles WAT in anderen Lokalisationen ausbilden²³¹. Unter anderem aufgrund seiner Größe und der leichten Zugänglichkeit ist die Verwendung von egWAT als Surrogat für humanes viszerales WAT üblich²³¹. Die Verwendung eines anderen Fettdepots, wie beispielsweise mesenterialem Fett, das direkt in die Pfortader drainiert, wäre jedoch unter Umständen besser geeignet, um den Einfluss auf den Organismus zu untersuchen. Außerdem sollte miteinbezogen werden, dass in der Analyse der mRNA-Expressionsmuster zwar klare Anzeichen für oxidativen Stress im egWAT der adipösen Mäuse festgestellt werden konnten, derartige Anzeichen für Inflammation, wie sie bei Adipositas zu erwarten gewesen wären, jedoch nicht nachgewiesen wurden. Dementsprechend sollten die beobachteten antiinflammatorischen und antioxidativen Effekte durch Metformin im WAT der adipösen Tiere vor diesem Hintergrund beurteilt werden. Limitierend muss auch erwähnt werden, dass der Ausgang der Schwangerschaften über den

Zeitpunkt der Probenentnahme im dritten Trimenon hinaus nicht untersucht wurde. Der Erkenntnisgewinn aus Tiermodellen wie diesem ist dennoch essenziell, weil zur Erforschung der zugrundeliegenden Prozesse im Fettgewebe Gewebeentnahmen notwendig sind, die ohne entsprechende Operationsindikation in klinischen Studien nicht zu rechtfertigen wären.

In der Analyse der mRNA-Expression und des Proteoms konnten etliche Indikatoren für eine antiinflammatorische Wirkung und eine Reduktion des oxidativen Stresses durch Metformin im egWAT festgestellt werden. Damit konnte die bereits hinreichend bekannte systemische Wirkung von Metformin auf die Adipositas-Schlüsselmechanismen Inflammation und oxidativer Stress⁷⁹⁻⁸¹ nun auch lokal im WAT nachgewiesen werden. Die übergeordnete Forschungshypothese dieser Arbeit, dass eine Metformintherapie potenziell geeignet ist, durch Unterbindung von Schlüsselmechanismen im WAT möglicherweise Adipositas-assoziierten Komplikationen in der Schwangerschaft vorzubeugen, kann demzufolge bestätigt werden. Neben der reduzierten mRNA-Expression der Entzündungsfaktoren TNF- α und CXCL10 sowie der massiven Depletion pro-oxidativer Stressmarker im egWAT der adipösen Mäuse unter Metformin, wurden verschiedenste weitere Hinweise und zugrundeliegende Mechanismen in der Proteom-Analyse identifiziert. Unter anderem zeigten sich zahlreiche Metformin-vermittelte Veränderungen, die über eine Inhibierung des TGF- β - und NF- κ B-Signalwegs sowie eine AMPK-Aktivierung Inflammation und oxidativen Stress reduzieren können. Im Gegensatz zur mRNA-Analyse, die eine sekundäre Verminderung der antioxidativen Kapazität durch die Metformin-vermittelte Reduktion des oxidativen Stresses nahelegt, deutet die Hochregulation verschiedenster antioxidativer Enzyme im Proteom auf eine Erholung der antioxidativen Kapazität durch Metformin im egWAT hin.

Darüber hinaus konnte Metformin vermutlich die respiratorische Kapazität steigern und es zeigten sich verschiedene Anzeichen für eine Gegenregulation der Adipositas-assoziierten Adipozyten-Dysfunktion sowie der Hinweis auf Browning im WAT. Da die WAT-Dysfunktion bedeutender Treiber für Adipositas-Folgeerkrankungen ist¹⁹ und Browning einen vielversprechenden Therapieansatz für Adipositas darstellt¹⁷², können diese Beobachtungen als weitere positive Effekte der Metforminbehandlung vermutet werden. Mit Lrg1, Alpha-1-Antitrypsin, Selenbp1 und APOA4 wurden außerdem potenzielle Adipokine detektiert, durch deren Regulation Metformin womöglich auch systemisch antiinflammatorisch und antidiabetisch wirken sowie oxidativen Stress modulieren kann.

Vor allem die Proteom-Analyse brachte eine Vielzahl neuer Erkenntnisse bezüglich der Metforminwirkung im egWAT, die wesentlich zum Verständnis seiner Wirkungsweise beitragen können. Um diese zu erhärten, wäre es denkbar gewesen, diese Arbeit um zusätzliche Methoden zu erweitern. Zum Beispiel wäre durch die Bestimmung von Entzündungs- und oxidativen Stressmarkern im Blut zu ermitteln, ob die Unterbindung dieser Mechanismen im WAT auch mit einem entsprechenden systemischen Effekt einhergeht, der für die

Beeinflussung von Adipositas-bedingten Komplikationen bedeutsam wäre. Eine Messung der tatsächlichen Aktivität der TGF- β -, NF- κ B- und AMPK-Signalwege könnte die Vermutung über die regulatorische Wirkung von Metformin auf deren Signaltransduktion im egWAT überprüfen. Auch die womöglich ursächlichen Regulationsmechanismen, die in der Proteom-Analyse identifiziert wurden, sollten in nachfolgenden Untersuchungen verifiziert werden. Ebenso sollte dem Hinweis auf WAT-Browning durch Metformin weiter nachgegangen werden, um ihn möglicherweise zu bestätigen. Schließlich wäre auch eine Untersuchung der potenziellen Adipokine Lrg1, Alpha-1-Antitrypsin, Selenbp1 und Apoa4 ratsam, die auf den Nachweis ihrer Sekretion durch viszerales WAT und möglicher systemischer Wirkungen abzielt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Prozesse im egWAT offenbar von erheblicherer Bedeutung für die Entwicklung einer Adipositas und ihrer Folgeerscheinungen sind als solche im scWAT. Das Gleiche scheint auch für entgegengerichtete Prozesse zu gelten, die durch Metformin vermittelt werden. Da über die Rolle des scWATs im Zusammenhang mit einer Metforminbehandlung in der Schwangerschaft allerdings deutlich weniger bekannt ist, wäre es interessant, diese ebenfalls zu ergründen und auch die hier festgestellten, vom egWAT abweichenden, Effekte auf die mRNA-Expression weitergehend zu untersuchen.

Insgesamt konnten mögliche antiinflammatorische, antioxidative und antidiabetische sowie vielfältige weitere Wirkungen beobachtet werden, die das mögliche Potenzial einer Metforminbehandlung adipöser Schwangerer veranschaulichen. Es sollte in der Bewertung zusätzlich berücksichtigt werden, dass im zugrundeliegenden Mausmodell nur 15 Tage lang Metformin verabreicht wurde, eventuell könnten deshalb in der wesentlich längeren menschlichen Schwangerschaft noch ausgeprägtere Effekte erzielt werden. Hinzu kommt die, in dieser Arbeit und in klinischen Studien beobachtete, reduzierte Gewichtszunahme durch Metformineinnahme in der Schwangerschaft, die einen zusätzlichen Vorteil gegenüber anderen antidiabetischen Therapien bietet. Dadurch könnte Metformin zusätzlich einer übermäßigen Gewichtszunahme in der Schwangerschaft und einer nachfolgenden Gewichtsretention vorbeugen, sodass auch Adipositas-bedingte Komplikationen in einer darauffolgenden Schwangerschaft verhindert werden könnten. Die beobachtete Reduktion der viszeralen Fettmasse und der Adipozyten-Hypertrophie kann ergänzend als weitere positive Wirkung angeführt werden, da viszerales WAT einen wesentlichen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten Adipositas-assoziiierter Folgeerkrankungen darstellt⁴⁷. Mit der Runterregulation von Perilipin-1, welche mit einem schlanken Phänotyp verbunden ist^{183,184}, konnte interessanterweise ein entsprechendes Korrelat im egWAT-Proteom identifiziert werden. Eine weitere Untersuchung dieses Mechanismus sowie Perilipin-unabhängiger Mechanismen der Gewichts- und Fettmasse-Reduktion durch Metformin sollte angestrebt werden.

Da es in der Natur eines Tiermodells liegt, dass es nicht uneingeschränkt in klinische Handlungsanweisungen übersetzt werden kann, liefern die hier gewonnenen Erkenntnisse eine erweiterte wissenschaftliche Grundlage, um das Potenzial der Metformintherapie adipöser Schwangerer in der klinischen Forschung weiter zu erproben. Insbesondere die Untersuchung, ob auch geringere Metformindosierungen vergleichbare Effekte mit sich bringen, wäre interessant für eine mögliche Behandlung adipöser Schwangerer mit Metformin. Des Weiteren sollten langfristige Metformin-Effekte, die über den hier gesetzten Beobachtungszeitraum von 15 Tagen hinaus gehen, in nachfolgenden Studien erforscht werden, da diese vermutlich die Effekte einer Metformintherapie in der klinischen Realität noch besser darstellen können.

Eine Behandlung adipöser und übergewichtiger Schwangerer ohne Diabetes mit dem Ziel, die mütterliche und kindliche Gesundheit zu verbessern, wird bereits seit einigen Jahren in verschiedenen klinischen Studien erprobt. Insgesamt reicht die Datenlage jedoch noch nicht aus, um den diesbezüglichen Nutzen einer Metforminbehandlung abschließend zu bewerten. Gründe dafür sind vor allem heterogene oder zu kleine Studiengruppen sowie Ungenauigkeiten und Unterschiede im Design der verschiedenen Studien, insbesondere bezüglich Schwangeren ohne Diabetes. Bisher wurde vor allem eine reduzierte Gewichtszunahme durch Metformingabe bei übergewichtigen und adipösen Schwangeren in Meta-Analysen festgestellt^{100,101}. Mögliche Effekte auf das Präeklampsie-Risiko werden ebenfalls diskutiert²³². Eine Reduktion kindlicher unerwünschter Ereignisse durch Metformin, wie Fehl- oder Totgeburten oder die Notwendigkeit einer intensivstationären Behandlung, wurde bis jetzt jedoch nicht belegt¹⁰⁰.

Um eine allgemeine Empfehlung zur Metformintherapie bei ansonsten gesunden adipösen Schwangeren auszusprechen, müsste der medikamentöse Eingriff in die Schwangerschaft durch einen entsprechenden Nutzen und den gleichzeitigen Nachweis der Unschädlichkeit gerechtfertigt sein. Bei einer womöglich auf dieser Arbeit aufbauenden klinischen Forschung, kann dabei an bereits gewonnene Erkenntnisse angeknüpft werden. Metformin zeigte in einer großen Meta-Analyse zur Therapie bei Gestationsdiabetes keine nachteiligen Effekte während der Schwangerschaft oder in der Neugeborenenphase⁹⁴. Zudem wurden bisher keine nachteiligen Langzeitfolgen bei den Metformin-exponierten Kindern in Nachbeobachtungsstudien festgestellt⁹⁵⁻⁹⁸. Dadurch kann die Metformintherapie in der Schwangerschaft als wahrscheinlich sicher gelten und auch relevante Langzeitfolgen scheinen, trotz dünnerer Datenlage, für exponierte Kinder nicht zu bestehen. Als relevante Nebenwirkung von Metformin in der Schwangerschaft hat sich insbesondere ein vermehrtes Vorkommen von Diarrhoe herausgestellt¹⁰⁰. Dem sollte folglich ein besonderes Augenmerk bei der Durchführung einer solchen Studie gelten, damit die Schwangeren keinem erhöhten Risiko ausgesetzt werden.

Um die bisher gewonnenen Daten sinnvoll zu ergänzen, erscheint eine randomisierte kontrollierte Studie besonders geeignet, bei der die Studienpopulation klar definiert und mögliche zusätzliche Einflussfaktoren erfasst beziehungsweise ausgeschlossen werden sollten. Nach einer entsprechenden Aufklärung und Einwilligung könnten übergewichtige und adipöse Schwangere über einen definierten Zeitraum eine Metformintherapie erhalten und mütterliche sowie kindliche Komplikationen erfasst werden. Der Effekt sollte dabei für übergewichtige Schwangere und unterschiedliche Grade der Adipositas getrennt ausgewertet werden. Schwangere mit relevanten Vorerkrankungen und vor allem einem bereits bestehenden Diabetes mellitus oder einem vorangegangenen Gestationsdiabetes sollten nicht eingeschlossen werden, um sicherzustellen, dass die Ergebnisse dadurch nicht verfälscht werden. Im Falle eines Kaiserschnitts könnten dabei Proben aus subkutanem und viszeralem Fettgewebe entnommen werden. Anhand dieser könnten die im Mausmodell identifizierten, potenziell antiinflammatorischen, antioxidativen und antidiabetischen Effekte von Metformin auf WAT auch im Menschen untersucht und möglicherweise bestätigt werden. Neben Gewichtsmessungen und einer histologischen Untersuchung der Fettgewebsproben könnten MRT-Aufnahmen der Schwangeren angefertigt werden. So könnten die, bei den Versuchstieren unter Metformin festgestellte, reduzierte Gewichtszunahme, geringere Adipozyten-Hypertrophie und reduzierte viszerale Fettgewebsmasse auch bei Schwangeren analysiert werden. Im Blut könnten inflammatorische und oxidative Stressmarker bestimmt werden, um die systemischen Effekte von Metformin zu erfassen. Ein wichtiger Punkt wäre außerdem die Nachbeobachtung der Metformin-exponierten Kinder, um die Datenlage bezüglich möglicher Langzeitfolgen zu verbessern. Mithilfe eines solchen Studiendesigns könnten zum einen die Auswirkungen einer Metformintherapie übergewichtiger und adipöser Schwangerer auf klinisch relevante Endpunkte und Adipositas-assoziierte Komplikationen als auch die, hier im murinen Modell festgestellten, Effekte und potenziellen Mechanismen im Menschen untersucht werden.

Nachfolgende klinische Forschung könnte auch die Einbindung einer Metformingabe für Schwangere in ein Gesamtkonzept aus Sport, Ernährung und weiteren Lifestyle-Interventionen beinhalten. In diesem Zusammenspiel könnte Metformin möglicherweise die Wirkung der nichtpharmakologischen Maßnahmen unterstützen und verstärken. Interessant wäre zudem, ob die durch Metformin reduzierte Gewichtszunahme in der Schwangerschaft, die in dieser Arbeit und ebenso klinisch^{100,101} festgestellt wurde, Adipositas-assoziierte Komplikationen in der nächsten Schwangerschaft verringern kann und langfristig gesundheitliche Vorteile mit sich bringt.

6 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Fact sheet - Obesity and overweight. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (Zuletzt abgerufen am 15.07.2022).
2. World Health Organization. European Health Report 2018; 2018.
3. Devlieger R, Benhalima K, Damm P, et al. Maternal obesity in Europe: where do we stand and how to move forward?: A scientific paper commissioned by the European Board and College of Obstetrics and Gynaecology (EBCOG). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016; **201**: 203-8.
4. Schienkiewitz A, Mensink GBM, Kuhnert R, Lange C. Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 2017; **2(2)**.
5. Bogaerts A, Van den Bergh B, Nuyts E, Martens E, Witters I, Devlieger R. Socio-demographic and obstetrical correlates of pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain. *Clin Obes* 2012; **2(5-6)**: 150-9.
6. Bodnar LM, Ness RB, Markovic N, Roberts JM. The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index. *Ann Epidemiol* 2005; **15(7)**: 475-82.
7. Arendas K, Qiu Q, Gruslin A. Obesity in pregnancy: pre-conceptional to postpartum consequences. *J Obstet Gynaecol Can* 2008; **30(6)**: 477-88.
8. Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *Jama* 2009; **301(6)**: 636-50.
9. Heslehurst N, Simpson H, Ells LJ, et al. The impact of maternal BMI status on pregnancy outcomes with immediate short-term obstetric resource implications: a meta-analysis. *Obes Rev* 2008; **9(6)**: 635-83.
10. O'Reilly JR, Reynolds RM. The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; **78(1)**: 9-16.
11. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2001; **2(4)**: 239-54.
12. Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci* 2010; **67(8)**: 1277-92.
13. Divoux A, Clement K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev* 2011; **12(5)**: e494-503.
14. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; **11(2)**: 85-97.
15. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; **84(1)**: 277-359.
16. Tan CY, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem Soc Trans* 2008; **36(Pt 5)**: 935-40.
17. Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; **89(6)**: 2548-56.
18. Blüher M, Mantzoros CS. From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism* 2015; **64(1)**: 131-45.
19. Fasshauer M, Bluher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 2015; **36(7)**: 461-70.
20. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol* 2016; **231(3)**: R77-r99.
21. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372(6505)**: 425-32.
22. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* 1995; **1(11)**: 1155-61.
23. Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019; **12**: 191-8.

24. Verma S, Li SH, Wang CH, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003; **108**(6): 736-40.
25. Ceddia RB. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *Int J Obes (Lond)* 2005; **29**(10): 1175-83.
26. Carmen GY, Victor SM. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* 2006; **18**(4): 401-8.
27. Zhu Q, Scherer PE. Immunologic and endocrine functions of adipose tissue: implications for kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2018; **14**(2): 105-20.
28. Pajvani UB, Trujillo ME, Combs TP, et al. Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8: a new mouse model of inducible and reversible lipoatrophy. *Nat Med* 2005; **11**(7): 797-803.
29. Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Risk. *Current Atherosclerosis Reports* 2014; **16**(7): 419.
30. Bluher M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; **27**(2): 163-77.
31. Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011; **12**(5): 3117-32.
32. Longo M, Zatterale F, Naderi J, et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(9).
33. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol* 2017; **13**(11): 633-43.
34. Wueest S, Rapold RA, Rytka JM, Schoenle EJ, Konrad D. Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. *Diabetologia* 2009; **52**(3): 541-6.
35. Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH. Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(23): 10878-82.
36. Kim SM, Lun M, Wang M, et al. Loss of white adipose hyperplastic potential is associated with enhanced susceptibility to insulin resistance. *Cell Metab* 2014; **20**(6): 1049-58.
37. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**(3): 1023-33.
38. Shen W, Wang Z, Punyanita M, et al. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res* 2003; **11**(1): 5-16.
39. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 2010; **11**(1): 11-8.
40. Freedland ES. Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab (Lond)* 2004; **1**(1): 12.
41. Hammarstedt A, Gogg S, Hedjazifar S, Nerstedt A, Smith U. Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. *Physiol Rev* 2018; **98**(4): 1911-41.
42. Seale P, Conroe HM, Estall J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* 2011; **121**(1): 96-105.
43. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; **116**(1): 39-48.
44. Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, O'Donnell CJ, Fox CS. Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? *Diabetes Care* 2009; **32**(6): 1068-75.
45. Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med* 1995; **27**(4): 435-8.

46. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**(4): 2282-9.
47. Stolk RP, Meijer R, Mali WP, Grobbee DE, van der Graaf Y. Ultrasound measurements of intraabdominal fat estimate the metabolic syndrome better than do measurements of waist circumference. *Am J Clin Nutr* 2003; **77**(4): 857-60.
48. Zhang M, Hu T, Zhang S, Zhou L. Associations of Different Adipose Tissue Depots with Insulin Resistance: A Systematic Review and Meta-analysis of Observational Studies. *Scientific reports* 2015; **5**: 18495-.
49. Bluher M. The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals. *Curr Opin Lipidol* 2010; **21**(1): 38-43.
50. Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism* 2019; **92**: 71-81.
51. Klop B, Elte JW, Cabezas MC. Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients* 2013; **5**(4): 1218-40.
52. Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ, Pankow JS, Eckfeldt JH. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* 2003; **78**(1): 91-8.
53. Klein-Platat C, Draï J, Oujaa M, Schlienger JL, Simon C. Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents. *Am J Clin Nutr* 2005; **82**(6): 1178-84.
54. Warensjö E, Ohrvall M, Vessby B. Fatty acid composition and estimated desaturase activities are associated with obesity and lifestyle variables in men and women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006; **16**(2): 128-36.
55. Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lipid Res* 2008; **47**(5): 348-80.
56. Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, Boberg M, Andersson A. Desaturation and elongation of Fatty acids and insulin action. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **967**: 183-95.
57. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1842**(3): 446-62.
58. Cildir G, Akincilar SC, Tergaonkar V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends Mol Med* 2013; **19**(8): 487-500.
59. Mraz M, Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J Endocrinol* 2014; **222**(3): R113-27.
60. Zatterale F, Longo M, Naderi J, et al. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Physiol* 2019; **10**: 1607.
61. Ormazabal V, Nair S, Elfeky O, Aguayo C, Salomon C, Zuñiga FA. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 2018; **17**(1): 122-.
62. Skórzyńska-Dziduszko KE, Kimber-Trojnar Ż, Patro-Małysza J, Olszewska A, Zaborowski T, Małecka-Massalska T. An Interplay between Obesity and Inflammation in Gestational Diabetes Mellitus. *Curr Pharm Biotechnol* 2016; **17**(7): 603-13.
63. Redman CWG, Sargent IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Seminars in Nephrology* 2004; **24**(6): 565-70.
64. Cotechini T, Graham CH. Aberrant maternal inflammation as a cause of pregnancy complications: A potential therapeutic target? *Placenta* 2015; **36**(8): 960-6.
65. Yao L, Herlea-Pana O, Heuser-Baker J, Chen Y, Barlic-Dicen J. Roles of the chemokine system in development of obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *J Immunol Res* 2014; **2014**: 181450-.
66. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000; **11**(6): 212-7.
67. Piya MK, McTernan PG, Kumar S. Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *J Endocrinol* 2013; **216**(1): T1-t15.

68. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology* 2009; **27**(1): 519-50.
69. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med* 2012; **18**(3): 363-74.
70. Xue W, Fan Z, Li L, Lu J, Zhai Y, Zhao J. The chemokine system and its role in obesity. *J Cell Physiol* 2019; **234**(4): 3336-46.
71. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; **82**(2): 291-5.
72. Kommission Umweltmedizin. Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht. 2009.
73. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 2006; **30**(3): 400-18.
74. Matsuda M, Shimomura I. Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases. *Rev Endocr Metab Disord* 2014; **15**(1): 1-10.
75. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 2018; **54**(4): 287-93.
76. Chiarello DI, Abad C, Rojas D, et al. Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2020; **1866**(2): 165354.
77. Aouache R, Biquard L, Vaiman D, Miralles F. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *Int J Mol Sci* 2018; **19**(5).
78. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; **114**(12): 1752-61.
79. Esteghamati A, Eskandari D, Mirmiranpour H, et al. Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition* 2013.
80. Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011.
81. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun* 2013; **4**: 2192-.
82. Jing Y, Wu F, Li D, Yang L, Li Q, Li R. Metformin improves obesity-associated inflammation by altering macrophages polarization. *Mol Cell Endocrinol* 2018; **461**: 256-64.
83. Ye J, Zhu N, Sun R, et al. Metformin Inhibits Chemokine Expression Through the AMPK/NF- κ B Signaling Pathway. *J Interferon Cytokine Res* 2018; **38**(9): 363-9.
84. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife* 2014; **3**: e02242-e.
85. Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, et al. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: The Task Force for diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *European Heart Journal* 2019; **41**(2): 255-323.
86. Sanchez-Rangel E, Inzucchi SE. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2017; **60**(9): 1586-93.
87. Marshall SM. 60 years of metformin use: a glance at the past and a look to the future. *Diabetologia* 2017; **60**(9): 1561-5.
88. Paneni F, Lüscher TF. Cardiovascular Protection in the Treatment of Type 2 Diabetes: A Review of Clinical Trial Results Across Drug Classes. *Am J Cardiol* 2017; **120**(1s): S17-s27.
89. Nguyen L, Chan SY, Teo AKK. Metformin from mother to unborn child - Are there unwarranted effects? *EBioMedicine* 2018; **35**: 394-404.

90. Kovo M, Haroutiunian S, Feldman N, Hoffman A, Glezerman M. Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; **136**(1): 29-33.
91. National Institute for Health and Care Excellence. Diabetes in pregnancy: management from preconception to the postnatal period. <https://www.nice.org.uk/guidance/ng3> (Zuletzt abgerufen am 15.07.2022).
92. Arbeitsgemeinschaft Diabetes und Schwangerschaft der DGG, Arbeitsgemeinschaft Geburtshilfe und Pränatalmedizin in der DGGG. S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 2018.
93. Zhao LP, Sheng XY, Zhou S, et al. Metformin versus insulin for gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 2015; **80**(5): 1224-34.
94. Butalia S, Gutierrez L, Lodha A, Aitken E, Zakariasen A, Donovan L. Short- and long-term outcomes of metformin compared with insulin alone in pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Diabet Med* 2017; **34**(1): 27-36.
95. Rowan JA, Hague WM, Gao W, Battin MR, Moore MP. Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. *N Engl J Med* 2008; **358**(19): 2003-15.
96. Terti K, Eskola E, Rönnemaa T, Haataja L. Neurodevelopment of Two-Year-Old Children Exposed to Metformin and Insulin in Gestational Diabetes Mellitus. *J Dev Behav Pediatr* 2015; **36**(9): 752-7.
97. Woudes TA, Battin M, Coat S, Rush EC, Hague WM, Rowan JA. Neurodevelopmental outcome at 2 years in offspring of women randomised to metformin or insulin treatment for gestational diabetes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2016; **101**(6): F488-f93.
98. Battin MR, Obolonkin V, Rush E, Hague W, Coat S, Rowan J. Blood pressure measurement at two years in offspring of women randomized to a trial of metformin for GDM: follow up data from the MiG trial. *BMC Pediatr* 2015; **15**: 54.
99. Rowan JA, Rush EC, Plank LD, et al. Metformin in gestational diabetes: the offspring follow-up (MiG TOFU): body composition and metabolic outcomes at 7-9 years of age. *BMJ Open Diabetes Res Care* 2018; **6**(1): e000456.
100. Dodd JM, Grivell RM, Deussen AR, Hague WM. Metformin for women who are overweight or obese during pregnancy for improving maternal and infant outcomes. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; **7**(7): CD010564-CD.
101. Pascual-Morena C, Cavero-Redondo I, Álvarez-Bueno C, et al. Exercise versus Metformin to Improve Pregnancy Outcomes among Overweight Pregnant Women: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Journal of clinical medicine* 2021; **10**(16): 3490.
102. Appel S, Schulze-Edinghausen M, Kretschmer T, et al. Maternal obesity attenuates predelivery inflammatory reaction in C57BL/6N mice. *J Reprod Immunol* 2017; **122**: 10-3.
103. Appel S, Turnwald EM, Alejandre-Alcazar MA, et al. Leptin does not induce an inflammatory response in the murine placenta. *Horm Metab Res* 2014; **46**(6): 384-9.
104. Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017; **7**(1): 16878.
105. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 2012; **9**(7): 676-82.
106. Galarraga M, Campión J, Muñoz-Barrutia A, et al. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *J Lipid Res* 2012; **53**(12): 2791-6.
107. R Development Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. Wien, Österreich: R Foundation for Statistical Computing; 2008.
108. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, Massachusetts, USA: RStudio, Inc.; 2015.
109. Aggio R, Villas-Bôas SG, Ruggiero K. Metab: an R package for high-throughput analysis of metabolomics data generated by GC-MS. *Bioinformatics* 2011; **27**(16): 2316-8.

110. Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, et al. FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics* 2015; **15**(15): 2597-601.
111. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 2019; **47**(D1): D607-d13.
112. The UniProt C. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research* 2019; **47**(D1): D506-D15.
113. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 2016; **7**(2): 27-31.
114. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006; **1**(2): 581-5.
115. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*; 1989.
116. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit* 2007; **37**(2): 120-6.
117. Perez LJ, Rios L, Trivedi P, et al. Validation of optimal reference genes for quantitative real time PCR in muscle and adipose tissue for obesity and diabetes research. *Scientific Reports* 2017; **7**(1): 3612.
118. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**(4): 402-8.
119. Proteomics Core Facility Cologne. Proteomic Screen-Protokolle. <http://proteomics.cecad-labs.uni-koeln.de/Protocols.955.0.html> (Zuletzt abgerufen am 15.07.2022).
120. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**(9): 5116-21.
121. Stein S. An Integrated Method for Spectrum Extraction and Compound Identification from GC/MS Data. *Mass Spectrom* 2011; **10**.
122. Sims EK, Hatanaka M, Morris DL, et al. Divergent compensatory responses to high-fat diet between C57BL6/J and C57BLKS/J inbred mouse strains. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; **305**(12): E1495-511.
123. Lang P, Hasselwander S, Li H, Xia N. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Scientific Reports* 2019; **9**(1): 19556.
124. Kajbaf F, De Broe ME, Lalau J-D. Therapeutic Concentrations of Metformin: A Systematic Review. *Clinical Pharmacokinetics* 2016; **55**(4): 439-59.
125. Deji N, Kume S, Araki S, et al. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **296**(1): F118-26.
126. Glastras SJ, Chen H, Teh R, et al. Mouse Models of Diabetes, Obesity and Related Kidney Disease. *PLoS One* 2016; **11**(8): e0162131.
127. Golay A. Metformin and body weight. *International Journal of Obesity* 2008; **32**(1): 61-72.
128. Matsui Y, Hirasawa Y, Sugiura T, Toyoshi T, Kyuki K, Ito M. Metformin reduces body weight gain and improves glucose intolerance in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Biol Pharm Bull* 2010; **33**(6): 963-70.
129. Yuan T, Li J, Zhao WG, et al. Effects of metformin on metabolism of white and brown adipose tissue in obese C57BL/6J mice. *Diabetol Metab Syndr* 2019; **11**: 96.
130. Syngelaki A, Nicolaidis KH, Balani J, et al. Metformin versus Placebo in Obese Pregnant Women without Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 2016; **374**(5): 434-43.
131. Seifarth C, Schehler B, Schneider HJ. Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2013; **121**(1): 27-31.
132. Medicine Io, Council NR. *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines*. Washington, DC: The National Academies Press; 2009.
133. Bogaerts A, Ameye L, Martens E, Devlieger R. Weight loss in obese pregnant women and risk for adverse perinatal outcomes. *Obstet Gynecol* 2015; **125**(3): 566-75.

134. Catalano PM, Mele L, Landon MB, et al. Inadequate weight gain in overweight and obese pregnant women: what is the effect on fetal growth? *Am J Obstet Gynecol* 2014; **211**(2): 137.e1-7.
135. Kominiaiek MA, Peaceman AM. Gestational weight gain. *Am J Obstet Gynecol* 2017; **217**(6): 642-51.
136. Virtanen KA, Hällsten K, Parkkola R, et al. Differential effects of rosiglitazone and metformin on adipose tissue distribution and glucose uptake in type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2003; **52**(2): 283-90.
137. Tokubuchi I, Tajiri Y, Iwata S, et al. Beneficial effects of metformin on energy metabolism and visceral fat volume through a possible mechanism of fatty acid oxidation in human subjects and rats. *PLoS One* 2017; **12**(2): e0171293.
138. Salans LB, Cushman SW, Weismann RE. Studies of human adipose tissue. Adipose cell size and number in nonobese and obese patients. *J Clin Invest* 1973; **52**(4): 929-41.
139. Ciaraldi TP, Kong AP, Chu NV, et al. Regulation of glucose transport and insulin signaling by troglitazone or metformin in adipose tissue of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002; **51**(1): 30-6.
140. Souza-Mello V, Gregório BM, Cardoso-de-Lemos FS, de Carvalho L, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Comparative effects of telmisartan, sitagliptin and metformin alone or in combination on obesity, insulin resistance, and liver and pancreas remodelling in C57BL/6 mice fed on a very high-fat diet. *Clin Sci (Lond)* 2010; **119**(6): 239-50.
141. Kretschmer T, Schulze-Edinghausen M, Turnwald EM, et al. Effect of Maternal Obesity in Mice on IL-6 Levels and Placental Endothelial Cell Homeostasis. *Nutrients* 2020; **12**(2).
142. Plubell DL, Wilmarth PA, Zhao Y, et al. Extended Multiplexing of Tandem Mass Tags (TMT) Labeling Reveals Age and High Fat Diet Specific Proteome Changes in Mouse Epididymal Adipose Tissue. *Mol Cell Proteomics* 2017; **16**(5): 873-90.
143. Karise I, Ornellas F, Barbosa-da-Silva S, et al. Liver and Metformin: Lessons of a fructose diet in mice. *Biochim Open* 2017; **4**: 19-30.
144. Diniz Vilela D, Gomes Peixoto L, Teixeira RR, et al. The Role of Metformin in Controlling Oxidative Stress in Muscle of Diabetic Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**: 6978625.
145. Wu X, Zhao W, Cui Q, Zhou Y. Computational screening of potential regulators for mRNA-protein expression level discrepancy. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; **523**(1): 196-201.
146. Jones JEC, Rabhi N, Orofino J, et al. The Adipocyte Acquires a Fibroblast-Like Transcriptional Signature in Response to a High Fat Diet. *Sci Rep* 2020; **10**(1): 2380.
147. Luo T, Nocon A, Fry J, et al. AMPK Activation by Metformin Suppresses Abnormal Extracellular Matrix Remodeling in Adipose Tissue and Ameliorates Insulin Resistance in Obesity. *Diabetes* 2016; **65**(8): 2295-310.
148. Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling. *Cell Metab* 2011; **14**(1): 67-79.
149. Lee SJ, Yang JW, Cho IJ, et al. The gep oncogenes, Galpha(12) and Galpha(13), upregulate the transforming growth factor-beta1 gene. *Oncogene* 2009; **28**(9): 1230-40.
150. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**(8): 513-25.
151. Wei J, Marangoni RG, Fang F, et al. The non-neuronal cyclin-dependent kinase 5 is a fibrotic mediator potentially implicated in systemic sclerosis and a novel therapeutic target. *Oncotarget* 2018; **9**(12): 10294-306.
152. Lee MJ. Transforming growth factor beta superfamily regulation of adipose tissue biology in obesity. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; **1864**(4 Pt A): 1160-71.
153. Sheikh MH, Solito E. Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. *Int J Mol Sci* 2018; **19**(4).

154. Burgmaier M, Schutters K, Willems B, et al. AnxA5 reduces plaque inflammation of advanced atherosclerotic lesions in apoE(-/-) mice. *J Cell Mol Med* 2014; **18**(10): 2117-24.
155. Alfadda AA, Benabdelkamel H, Masood A, et al. Proteomic analysis of mature adipocytes from obese patients in relation to aging. *Exp Gerontol* 2013; **48**(11): 1196-203.
156. Kosicka A, Cunliffe AD, Mackenzie R, et al. Attenuation of plasma annexin A1 in human obesity. *Faseb j* 2013; **27**(1): 368-78.
157. Weinberg RB, Dantzker C, Patton CS. Sensitivity of serum apolipoprotein A-IV levels to changes in dietary fat content. *Gastroenterology* 1990; **98**(1): 17-24.
158. Qu J, Ko CW, Tso P, Bhargava A. Apolipoprotein A-IV: A Multifunctional Protein Involved in Protection against Atherosclerosis and Diabetes. *Cells* 2019; **8**(4).
159. Schöttl T, Kappler L, Fromme T, Klingenspor M. Limited OXPHOS capacity in white adipocytes is a hallmark of obesity in laboratory mice irrespective of the glucose tolerance status. *Mol Metab* 2015; **4**(9): 631-42.
160. Wessels B, Honecker J, Schöttl T, et al. Adipose Mitochondrial Respiratory Capacity in Obesity is Impaired Independently of Glycemic Status of Tissue Donors. *Obesity (Silver Spring)* 2019; **27**(5): 756-66.
161. Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, et al. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2010; **18**(1): 13-20.
162. Solinas G, Borén J, Dulloo AG. De novo lipogenesis in metabolic homeostasis: More friend than foe? *Mol Metab* 2015; **4**(5): 367-77.
163. Wu J, Wang C, Li S, et al. Thyroid hormone-responsive SPOT 14 homolog promotes hepatic lipogenesis, and its expression is regulated by liver X receptor α through a sterol regulatory element-binding protein 1c-dependent mechanism in mice. *Hepatology* 2013; **58**(2): 617-28.
164. Go Y, Jeong JY, Jeoung NH, et al. Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2 Protects Against Hepatic Steatosis Through Modulation of Tricarboxylic Acid Cycle Anaplerosis and Ketogenesis. *Diabetes* 2016; **65**(10): 2876-87.
165. Sampath H, Miyazaki M, Dobrzyn A, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J Biol Chem* 2007; **282**(4): 2483-93.
166. Gao X, Li K, Hui X, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1A prevents fatty acid-induced adipocyte dysfunction through suppression of c-Jun N-terminal kinase. *Biochem J* 2011; **435**(3): 723-32.
167. Malandrino MI, Fucho R, Weber M, et al. Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015; **308**(9): E756-69.
168. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; **93 Suppl 1**: S52-9.
169. Yadav PK, Vitvitsky V, Carballal S, Seravalli J, Banerjee R. Thioredoxin regulates human mercaptopyruvate sulfurtransferase at physiologically-relevant concentrations. *J Biol Chem* 2020; **295**(19): 6299-311.
170. Wilson BG, Roberts CW. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**(7): 481-92.
171. Heckman-Stoddard BM, DeCensi A, Sahasrabudde VV, Ford LG. Repurposing metformin for the prevention of cancer and cancer recurrence. *Diabetologia* 2017; **60**(9): 1639-47.
172. Hiraike Y, Waki H, Yu J, et al. NFIA co-localizes with PPAR γ and transcriptionally controls the brown fat gene program. *Nat Cell Biol* 2017; **19**(9): 1081-92.
173. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology* 2014; **10**(1): 24-36.
174. Kim EK, Lee SH, Jhun JY, et al. Metformin Prevents Fatty Liver and Improves Balance of White/Brown Adipose in an Obesity Mouse Model by Inducing FGF21. *Mediators Inflamm* 2016; **2016**: 5813030.

175. Yan Y, Jun C, Lu Y, Jiangmei S. Combination of metformin and luteolin synergistically protects carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: Mechanism involves antioxidant, anti-inflammatory, antiapoptotic, and Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Biofactors* 2019; **45**(4): 598-606.
176. Wang Y, An H, Liu T, et al. Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK. *Cell Rep* 2019; **29**(6): 1511-23.e5.
177. Bouzakri K, Austin R, Rune A, et al. Malonyl CoenzymeA decarboxylase regulates lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *Diabetes* 2008; **57**(6): 1508-16.
178. Cadoudal T, Distel E, Durant S, et al. Pyruvate dehydrogenase kinase 4: regulation by thiazolidinediones and implication in glyceroneogenesis in adipose tissue. *Diabetes* 2008; **57**(9): 2272-9.
179. Wells T, Davies JR, Guschina IA, et al. Opa3, a novel regulator of mitochondrial function, controls thermogenesis and abdominal fat mass in a mouse model for Costeff syndrome. *Human Molecular Genetics* 2012; **21**(22): 4836-44.
180. Ralser M, Wamelink MM, Kowald A, et al. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology* 2007; **6**(4): 10.
181. Morgenstern R, DePierre JW. Microsomal glutathione transferase. Purification in unactivated form and further characterization of the activation process, substrate specificity and amino acid composition. *Eur J Biochem* 1983; **134**(3): 591-7.
182. Hara N, Yamada K, Shibata T, Osago H, Hashimoto T, Tsuchiya M. Elevation of cellular NAD levels by nicotinic acid and involvement of nicotinic acid phosphoribosyltransferase in human cells. *J Biol Chem* 2007; **282**(34): 24574-82.
183. Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**(11): 6494-9.
184. Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, et al. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr*(db/db) mice. *Nat Genet* 2000; **26**(4): 474-9.
185. Saisho Y. Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2015; **15**(3): 196-205.
186. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 2011; **13**(1): 11-22.
187. Sabir JSM, El Omri A, Shaik NA, et al. Identification of key regulatory genes connected to NF- κ B family of proteins in visceral adipose tissues using gene expression and weighted protein interaction network. *PLoS One* 2019; **14**(4): e0214337.
188. Qiu P, Wheeler MK, Qiu Y, Sosne G. Thymosin beta4 inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation, IL-8 expression, and the sensitizing effects by its partners PINCH-1 and ILK. *Faseb j* 2011; **25**(6): 1815-26.
189. Fan N, Sun H, Wang Y, et al. Follistatin-like 1: a potential mediator of inflammation in obesity. *Mediators Inflamm* 2013; **2013**: 752519.
190. Hu PF, Ma CY, Sun FF, Chen WP, Wu LD. Follistatin-like protein 1 (FSTL1) promotes chondrocyte expression of matrix metalloproteinase and inflammatory factors via the NF- κ B pathway. *J Cell Mol Med* 2019; **23**(3): 2230-7.
191. Carter BZ, Mak PY, Chen Y, et al. Anti-apoptotic ARC protein confers chemoresistance by controlling leukemia-microenvironment interactions through a NF κ B/IL1 β signaling network. *Oncotarget* 2016; **7**(15): 20054-67.
192. Pumroy RA, Cingolani G. Diversification of importin- α isoforms in cellular trafficking and disease states. *Biochem J* 2015; **466**(1): 13-28.
193. Huh HD, Lee E, Shin J, Park B, Lee S. STRAP positively regulates TLR3-triggered signaling pathway. *Cell Immunol* 2017; **318**: 55-60.
194. Xiao H, Zhang J, Xu Z, et al. Metformin is a novel suppressor for transforming growth factor (TGF)- β 1. *Sci Rep* 2016; **6**: 28597.
195. Zhang XH, Chen Y, Li B, Liu JY, Yang CM, Ma MZ. Blocking follistatin-like 1 attenuates liver fibrosis in mice by regulating transforming growth factor-beta signaling. *Int J Clin Exp Pathol* 2018; **11**(3): 1112-22.
196. Wang X, Abraham S, McKenzie JAG, et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signalling. *Nature* 2013; **499**(7458): 306-11.

197. Jin Q, Ding W, Mulder KM. Requirement for the dynein light chain km23-1 in a Smad2-dependent transforming growth factor-beta signaling pathway. *J Biol Chem* 2007; **282**(26): 19122-32.
198. Nistala H, Lee-Arteaga S, Smaldone S, et al. Fibrillin-1 and -2 differentially modulate endogenous TGF- β and BMP bioavailability during bone formation. *J Cell Biol* 2010; **190**(6): 1107-21.
199. Balachandran Y. Role of Endocytosis in TLR Signaling: An Effective Negative Regulation to Control Inflammation. *MOJ Immunol* 2016; **3**(6): **00111**.
200. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 2017; **60**(9): 1577-85.
201. Kola B, Grossman AB, Korbonits M. The role of AMP-activated protein kinase in obesity. *Front Horm Res* 2008; **36**: 198-211.
202. Jeon S-M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Experimental & Molecular Medicine* 2016; **48**(7): e245-e.
203. Gauthier MS, O'Brien EL, Bigornia S, et al. Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **404**(1): 382-7.
204. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Age-related changes in AMPK activation: Role for AMPK phosphatases and inhibitory phosphorylation by upstream signaling pathways. *Ageing Res Rev* 2016; **28**: 15-26.
205. Luo W, Xu C, Ayello J, et al. Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1A in ewing sarcoma tumorigenesis and metastasis. *Oncogene* 2018; **37**(6): 798-809.
206. Hanawa S, Mitsuhashi A, Shozu M. Antitumor effects of metformin via indirect inhibition of protein phosphatase 2A in patients with endometrial cancer. *PLoS One* 2018; **13**(2): e0192759.
207. Gao J, Ye J, Ying Y, Lin H, Luo Z. Negative regulation of TGF- β by AMPK and implications in the treatment of associated disorders. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2018; **50**(6): 523-31.
208. Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl)* 2011; **89**(7): 667-76.
209. Yang F-J, Hsieh C-Y, Shu K-H, et al. Plasma Leucine-Rich α -2-Glycoprotein 1 Predicts Cardiovascular Disease Risk in End-Stage Renal Disease. *Scientific Reports* 2020; **10**(1): 5988.
210. Imamura T, Oshima Y, Hikita A. Regulation of TGF- β family signalling by ubiquitination and deubiquitination. *The Journal of Biochemistry* 2013; **154**(6): 481-9.
211. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med* 2011; **105**(8): 1129-39.
212. Kalis M, Kumar R, Janciauskiene S, Salehi A, Cilio CM. α 1-antitrypsin enhances insulin secretion and prevents cytokine-mediated apoptosis in pancreatic β -cells. *Islets* 2010; **2**(3): 185-9.
213. Sandström CS, Ohlsson B, Melander O, Westin U, Mahadeva R, Janciauskiene S. An association between Type 2 diabetes and alpha-antitrypsin deficiency. *Diabet Med* 2008; **25**(11): 1370-3.
214. Rachmiel M, Strauss P, Dror N, et al. Alpha-1 antitrypsin therapy is safe and well tolerated in children and adolescents with recent onset type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 2016; **17**(5): 351-9.
215. Steinbrenner H, Micoogullari M, Hoang NA, Bergheim I, Klotz LO, Sies H. Selenium-binding protein 1 (SELENBP1) is a marker of mature adipocytes. *Redox Biol* 2019; **20**: 489-95.
216. Elhodaky M, Diamond AM. Selenium-Binding Protein 1 in Human Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2018; **19**(11).

217. Kühn EC, Slagman A, Kühn-Heid ECD, et al. Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death. *J Trace Elem Med Biol* 2019; **52**: 247-53.
218. Kilpeläinen TO, Carli JFM, Skowronski AA, et al. Genome-wide meta-analysis uncovers novel loci influencing circulating leptin levels. *Nat Commun* 2016; **7**(1): 10494.
219. Song HR, Yun KE, Park HS. Relation between alanine aminotransferase concentrations and visceral fat accumulation among nondiabetic overweight Korean women. *Am J Clin Nutr* 2008; **88**(1): 16-21.
220. Porter SA, Pedley A, Massaro JM, Vasan RS, Hoffmann U, Fox CS. Aminotransferase levels are associated with cardiometabolic risk above and beyond visceral fat and insulin resistance: the Framingham Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; **33**(1): 139-46.
221. Salazar D, Zhang L, deGala GD, Frerman FE. Expression and characterization of two pathogenic mutations in human electron transfer flavoprotein. *J Biol Chem* 1997; **272**(42): 26425-33.
222. Boudina S, Sena S, Theobald H, et al. Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes* 2007; **56**(10): 2457-66.
223. Brockman D, Chen X. Proteomics in the characterization of adipose dysfunction in obesity. *Adipocyte* 2012; **1**(1): 25-37.
224. Pardo M, Roca-Rivada A, Seoane LM, Casanueva FF. Obesidomics: contribution of adipose tissue secretome analysis to obesity research. *Endocrine* 2012; **41**(3): 374-83.
225. Lin SH, Cheng PC, Tu ST, Hsu SR, Cheng YC, Liu YH. Effect of metformin monotherapy on serum lipid profile in statin-naïve individuals with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus: a cohort study. *PeerJ* 2018; **6**: e4578.
226. Perreault M, Zulyniak MA, Badoud F, et al. A distinct fatty acid profile underlies the reduced inflammatory state of metabolically healthy obese individuals. *PLoS One* 2014; **9**(2): e88539.
227. Vessby B. Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2003; **14**(1): 15-9.
228. Okada T, Furuhashi N, Kuromori Y, Miyashita M, Iwata F, Harada K. Plasma palmitoleic acid content and obesity in children. *Am J Clin Nutr* 2005; **82**(4): 747-50.
229. Kaska L, Mika A, Stepnowski P, et al. The relationship between specific Fatty acids of serum lipids and serum high sensitivity C- reactive protein levels in morbidly obese women. *Cell Physiol Biochem* 2014; **34**(4): 1101-8.
230. Walle P, Takkunen M, Männistö V, et al. Alterations in fatty acid metabolism in response to obesity surgery combined with dietary counseling. *Nutr Diabetes* 2017; **7**(9): e285.
231. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. *Front Nutr* 2016; **3**: 10.
232. Elmaraezy A, Abushouk AI, Emara A, Elshahat O, Ahmed H, M IM. Effect of metformin on maternal and neonatal outcomes in pregnant obese non-diabetic women: A meta-analysis. *Int J Reprod Biomed* 2017; **15**(8): 461-70.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema der Versuchsgruppen	37
Abb. 2: Zerschneiden der gescannten histologischen Schnitte in QuPath	41
Abb. 3: Metforminstabilität im Trinkwasser und -Serumkonzentration an G15,5	55
Abb. 4: Körpergewicht und Gewichtszunahme während der Tragezeit	56
Abb. 5: egWAT-Gewicht an G15,5.....	57
Abb. 6 Gesamtfettvolumen und viszerales Fettvolumen der nichttragenden Mäuse	58
Abb. 7: Festlegung des Mindestdurchmessers einer Fettzelle	60
Abb. 8: Festlegung des Maximaldurchmessers einer Fettzelle	61
Abb. 9: Fläche und Durchmesser der Fettzellen im scWAT an G15,5	62
Abb. 10: Fläche und Durchmesser der Fettzellen im egWAT an G15,5	63
Abb. 11: RT-qPCR von Housekeeping-Genen im WAT	64
Abb. 12: mRNA-Expression von Entzündungsfaktoren im scWAT an G15,5	65
Abb. 13: mRNA-Expression von oxidativen Stressmarkern im scWAT an G15,5.....	66
Abb. 14: mRNA-Expression von Entzündungsfaktoren im egWAT an G15,5.....	67
Abb. 15: mRNA-Expression von oxidativen Stressmarkern im egWAT an G15,5	68
Abb. 16: Hauptkomponentenanalyse aller detektierten Proteine aus egWAT an G15,5.....	70
Abb. 17: Volcano Plots aller detektierten Proteine im egWAT an G15,5	72
Abb. 18: Venn-Diagramm der signifikant veränderten Proteine aus egWAT an G15,5.....	73
Abb. 19: Potenziell interagierende Proteine im Vergleich HFD vs. SD.....	76
Abb. 20: Potenziell interagierende Proteine im Vergleich HFD+MF vs. HFD	78
Abb. 21: Potenziell interagierende Proteine im Vergleich SD+MF vs. SD	80
Abb. 22: Beispielhafte GC-MS-Messung der Serumlipide.....	96
Abb. 23: Fettsäureprofil der Seren an G15,5	97
Abb. 24: Wurfgröße	135

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Medikamente, Chemikalien und Enzyme	29
Tabelle 2: Stammlösungen und Puffer.....	31
Tabelle 3: (Oligo-)Nukleotide zur cDNA-Synthese	32
Tabelle 4: Oligonukleotide für die RT-qPCR	32
Tabelle 5: Geräte.....	33
Tabelle 6: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 7: Software und Datenbanken.....	35
Tabelle 8: Metformindosierung und -aufnahme	54
Tabelle 9: Übersicht über betrachtete Vergleiche der signifikant veränderten Proteine.....	69
Tabelle 10: Signifikant hochregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in HFD vs. SD	81
Tabelle 11: Signifikant runterregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in HFD vs. SD.....	82
Tabelle 12: Signifikant hochregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in HFD+MF vs. HFD ...	86
Tabelle 13: Signifikant runterregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in HFD+MF vs. HFD .	88
Tabelle 14: Signifikant hochregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in SD+MF vs. SD.....	90
Tabelle 15: Signifikant runterregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in SD+MF vs. SD	91
Tabelle 16: Signifikant hochregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in SD+MF vs. SD und HFD+MF vs. HFD.....	95
Tabelle 17: Signifikant runterregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in SD+MF vs. SD und HFD+MF vs. HFD.....	95
Tabelle 18: signifikant hoch- bzw. runterregulierte Proteine im egWAT an G15,5 in HFD vs. SD und HFD+MF vs. HFD.....	96

7.3 Ergänzende Abbildungen

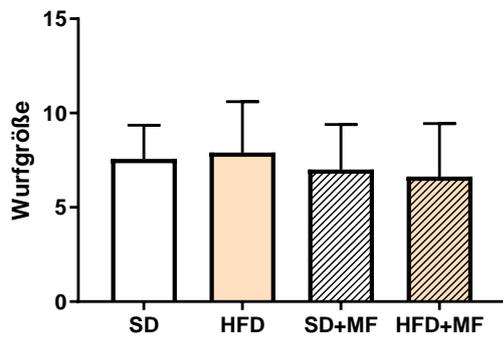


Abb. 24: Wurfgröße

Angegeben ist die Wurfgröße der SD-, HFD- und Metformin-behandelten Tiere (SD+MF, HFD+MF). SD n = 14; HFD n = 11; SD+MF n = 9; HFD+MF n = 11.

8 Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Schmitz, K.; Turnwald, E.-M.; Kretschmer, T.; Janoschek, R.; Bae-Gartz, I.; Voßbrecher, K.; Kammerer, M.D.; Köninger, A.; Gellhaus, A.; Handwerk, M.; et al. Metformin Prevents Key Mechanisms of Obesity-Related Complications in Visceral White Adipose Tissue of Obese Pregnant Mice. *Nutrients* 2022, 14, 2288. <https://doi.org/10.3390/nu14112288>.