

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

**Der Effekt von Diät-induzierter Adipositas auf
subkutanes und epigonadales Fettgewebe sowie
den Metabolismus von tragenden Mäusen
– Ein Vergleich zwischen Kontroll-, Hochfett- und
Hochfett-/Hochzucker-Diäten**

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

vorgelegt von
Kathrin Voßbrecher
aus Köln

promoviert am 19. März 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2024

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

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. M. Tittgemeyer

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

Prof. Dr. med. Jörg Dötsch

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung 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. 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.

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 Imputation der Messwerte in 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.

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 Katrin Schmitz und Merlin Kammerer durch. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung dieser Versuchsgruppen wurden bereits in einem Paper von Katrin Schmitz als Erstautorin veröffentlicht.¹

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 03.10.2023

Unterschrift:

A handwritten signature in blue ink, consisting of several stylized, overlapping loops and strokes, positioned over a dotted line.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der studentischen Forschungsförderung des Köln Fortune Programms.

Meinen Freunden und Angehörigen danke ich für ihre Geduld, ihre Ermutigungen und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt David für die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	10
1 Zusammenfassung.....	16
2 Einleitung	20
2.1 <i>Übergewicht und Adipositas.....</i>	20
2.2 <i>Übergewicht und Adipositas vor und in der Schwangerschaft.....</i>	21
2.3 <i>Fettgewebe.....</i>	22
2.3.1 <i>Aufbau und Physiologie des Fettgewebes</i>	23
2.3.2 <i>Fettgewebsarten und -depots.....</i>	24
2.3.3 <i>endokrine Funktionen</i>	25
2.3.4 <i>Adipokine bei Adipositas.....</i>	27
2.3.5 <i>Inflammation</i>	27
2.3.6 <i>Oxidativer Stress.....</i>	29
2.4 <i>Fettsäuren im Blut</i>	31
2.5 <i>Diätinduziertes Adipositas-Mausmodell.....</i>	32
2.6 <i>Adipositas-induzierende Diäten</i>	33
2.7 <i>Fragestellungen und Ziel der Arbeit.....</i>	36
3 Material und Methoden	38
3.1 <i>Material.....</i>	38
3.1.1 <i>Chemikalien und Enzyme</i>	38
3.1.2 <i>Stammlösungen und Puffer</i>	40
3.1.3 <i>Oligonukleotide</i>	41
3.1.4 <i>Geräte</i>	42
3.1.5 <i>Arbeits- und Verbrauchsmaterialien</i>	44
3.1.6 <i>Software.....</i>	44
3.2 <i>Tierversuche.....</i>	46
3.2.1 <i>Allgemeine Beschreibung</i>	46
3.2.2 <i>Haltung, Verpaarung, Futter- und Wasseraufnahme.....</i>	46
3.2.3 <i>Versuchsdiäten</i>	47
3.2.4 <i>Präparation der Mäuse</i>	50
3.3 <i>Methoden</i>	53
3.3.1 <i>Histologie</i>	53
3.3.1.1 <i>Vorbereitungen und Anfertigung der Schnitte.....</i>	53
3.3.1.2 <i>Färbung.....</i>	54

3.3.1.3	Digitalisierung und Analyse.....	55
3.3.1.4	Auswertung der Fettzellgröße.....	57
3.3.2	Quantifizierung des Fettgewebes mittels μ CT.....	59
	(Mikro-Computertomographie).....	59
3.3.3	Proteomics-Screen.....	60
3.3.3.1	Proteinisolation.....	60
3.3.3.2	Proteinverdau.....	61
3.3.3.3	Aufbereitung.....	62
3.3.3.4	Proteinanalyse durch die Proteomics Facility.....	63
3.3.3.5	Auswertung.....	64
3.3.4	Molekularbiologische Methoden.....	66
3.3.4.1	Grundlagen der RT-qPCR.....	66
3.3.4.2	RNA-Isolation.....	67
3.3.4.3	RNA-Konzentration messen.....	68
3.3.4.4	Umschreiben in cDNA.....	68
3.3.4.4.1	Grundlage des Umschreibens in cDNA.....	68
3.3.4.4.2	Durchführung des Umschreibens.....	68
3.3.4.5	RT-qPCR.....	69
3.3.4.5.1	Analysierte Gene.....	69
3.3.4.5.2	Durchführung der RT-qPCR.....	70
3.3.4.5.3	Auswertung der RT-qPCR.....	70
3.3.5	Lipidomics-Analyse.....	71
3.3.5.1	Lipidextraktion per MPLEX.....	71
3.3.5.2	Überführung in FAMES.....	72
3.3.5.3	Messung per GC-MS.....	72
3.3.5.4	Auswertung.....	73
3.3.6	Statistik.....	74
4	Ergebnisse.....	75
4.1	<i>Phänotypische Daten der Mauskohorte.....</i>	<i>75</i>
4.1.1	Körpergewicht, Körperlänge und Gewicht des egWAT.....	75
4.1.2	Futter- und Wasseraufnahme.....	78
4.1.3	Schwierigkeiten im Rahmen der Zucht unter der CO- und WSD-Diät.....	81
4.2	<i>Quantifizierung der Fettgewebsvolumen mittels μCT (Mikro-Computertomographie).....</i>	<i>83</i>
4.3	<i>Morphologische Analyse der Fettgewebszellen.....</i>	<i>87</i>
4.4	<i>Proteomics-Screen.....</i>	<i>90</i>
4.4.1	Principal Component Analysis (PCA).....	91
4.4.2	Volcano Plots.....	92
4.4.3	Venn-Diagramme.....	95
4.4.4	String-Analyse.....	98

4.5	<i>RT-qPCR</i>	104
4.6	<i>Fettsäureprofil</i>	111
5	Diskussion	114
5.1	<i>Versuchsdiäten</i>	114
5.2	<i>Adipositasinduktion</i>	115
5.3	<i>Phänotypische Veränderungen</i>	116
5.4	<i>Veränderungen der Fettgewebsmorphologie</i>	117
5.5	<i>Veränderungen der Proteinexpressionsmuster</i>	118
5.5.1	Schlagwort: <i>oxidative stress</i>	119
5.5.1.1	Superoxiddismutasen (SOD)	119
5.5.1.2	Thioredoxinsystem	121
5.5.1.3	Peroxiredoxine	122
5.5.1.4	weitere Proteine	124
5.5.1.5	Zusammenfassung.....	124
5.5.2	Schlagwort: <i>adipocyte</i>	125
5.5.2.1	Lipidsignalweg.....	125
5.5.2.2	Caveolae-assoziierte Proteine	126
5.5.2.3	Zusammenfassung.....	128
5.5.3	Schlagwort: <i>obesity</i>	129
5.5.4	Schlagwort: <i>energy/fat metabolism/lipogenesis</i>	130
5.5.4.1	Acetyl-Coenzym A-Metabolismus	130
5.5.4.2	Apolipoproteine	133
5.5.4.3	Lipogenese.....	135
5.5.4.4	Mitochondriale Proteine	136
5.5.4.5	weitere Proteine	137
5.5.4.6	Zusammenfassung.....	138
5.5.5	Schlagwort: <i>inflammation</i>	139
5.5.5.1	Proinflammatorische Proteine	139
5.5.5.2	Antiinflammatorisches Protein.....	140
5.5.5.3	Proteine der Adipozytendifferenzierung.....	141
5.5.5.4	Proteine des Energiestoffwechsels.....	142
5.5.5.5	Proteine der Apoptose	143
5.5.5.6	Veränderte Proteine mit Assoziationen zu Schwangerschaftskomplikationen	145
5.5.5.7	Zusammenfassung.....	146
5.5.6	Zusammenfassung	147
5.6	<i>Veränderungen der Inflammations- und oxidativen Stressmarker des WAT</i>	149
5.7	<i>Fettsäureprofile der fünf verschiedenen Diäten</i>	152

5.8	<i>Limitationen und Ausblick</i>	156
6	Literaturverzeichnis	160
7	Anhang	184
7.1	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	184
7.2	<i>Tabellenverzeichnis</i>	185
7.3	<i>Weitere Abbildungen</i>	186
8	Vorabveröffentlichung der Ergebnisse	189

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
18S	18S ribosomale RNA
A	Adenosin
Acacb	Acetyl-CoA-Carboxylase 2
Acetyl-CoA	Acetyl Coenzym A
Acly	ATP-Citrat-Lyase
Acss2	Acetyl-Coenzym A Synthetase
AG	Arbeitsgruppe
AGC	automatische Verstärkungsregelung (Automatic Gain Control)
Aldoa	Fruktose-Bisphosphonat Aldolase A
Ampd3	AMP-Deaminase 3
Anxa1	Annexin A1
Apip	Methythioribulose-1-Phosphat-Dehydratase
Apoa2	Apolipoprotein A-II
Apoa4	Apolipoprotein IV
Apoc2	Apolipoprotein C-II
AT	Fettgewebe (adipose tissue)
BHT	Butylhydroxytoluol
BMI	Body-Mass-Index
BZ	Blutzucker
C	Cytosin
C1qbp	Komplement Komponente 1 Q Subkomponentenbindendes Protein
CAT	Catalase
cDNA	Complementary DNA
CECAD	Exzellenzcluster Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases
Clec10a	C-Typ Lectindomänen Familie 10 Member A
CO	Control-Diät
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

COX-2	Cyclooxygenase-2
CT-Wert	Threshold Cycle
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10
CYB-A	Cytochrom b-245 Alpha Kette
CYB-B	Cytochrom b-245 Beta Kette
D	Tag
DAMP	Schadensassoziierte molekulare Muster
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIO	Diet-induced-obesity
DM-II	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
egWAT	epigonadales weißes Fettgewebe
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
Fabp	Fettsäurebindende Proteine
FAMEs	Fettsäuremethylester (fatty acid methyl esters)
For	forward primer
G	Gramm
G	Gestationstag
G	Guanin
G	Erdbeschleunigung (entspricht 9,81 N/kg)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Gas-Chromatographie
GC-MS	Gas-Chromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
gDNA	genomische DNA
gFS	gesättigte Fettsäure
GPX	Glutathionperoxidase

Grn	Granulin
GUSB	β -Glucuronidase
H	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCD	kollisionsinduzierte Dissoziation (high-energy collisional dissociation)
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HFD	Hochfett-Diät
Hmgb1	High mobility group Protein B1
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
ID	Identifikationsnummer
IFN	Interferon
IL-1	Interleukin
IL-1 α	Interleukin 1 α
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin-8
IQR	Interquartilsabstand
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardierung
IVF	in vitro Fertilisation
Jak1	Tyrosin-Protein Kinase
Kcal	Kilokalorien
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
Kg	Kilogramm
Kng1	Kiniogen-1
kV	Kilovolt
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LFQ	markierungsfreie Quantifizierung (label-free quantification)
Lgals3	Galectin
Lxn	Latexin

Lys-C	Lysyl EndopeptidaseR
M	mol/l
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MeOH	Methanol
Mfn2	Mitofusin-2
Mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
Mlycd	Malonyl-Coenzym A Decarboxylase
mM	mmol/l
MPLEx	Metaboliten-, Protein- und Lipidextraktion
Mpst	3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Anzahl der untersuchten Proben pro Versuchsgruppe
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
Naprt	Nikotinat-Phosphoribosyltransferase
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NCF1	neutrophil cytosolic factor 1
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2
NfE	Stickstofffreie Extraktstoffe
Nm	Nanometer
NOX	NADPH-Oxidase
NOX4	NADPH Oxidase 4
OD	optische Dichte
P	p-Wert (Signifikanzwert)
P22phox	α -Untereinheit des Flavocytochroms b558
PANTHER	Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships
PCA	Principal Component Analysis
Pdk2	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Isoenzym 2

PFA	Phosphat-gepuffertes Formaldehyd
Plin1	Perilipin-1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ppm	parts per million
Prdx2	Peroxiredoxin-2
Prdx3	Thioredoxin-abhängige Peroxid Reduktase
Prkaa1	5-AMP-aktivierten-Proteinkinase-katalytische-Untereinheit-alpha-1
PSM	Peptidspektrum-Übereinstimmungen
Psmb8	Proteasom Untereinheit beta Typ 8
Ptrf	Polymerase I und Transkriptfreisetzungsfaktor
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
Rarres2	Retinolsäure Rezeptor Responder Protein 2
Rars	Arginin-tRNA Ligase
Rev	reverse primer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	rotations per minute - Englisch (Vereinigte Staaten)
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
Scd1	Acyl-Coenzym A Desaturase 1
scWAT	subkutanes weißes Fettgewebe
SD	Standard-Diät
Slc25a11	Mitochondrial 2-Oxoglutarate/Malate Carrier-Protein
Sod	Superoxiddismutase
Sod3	Extrazelluläre Superoxiddismutase
β-ACTIN	Beta-Actin
Steap4	Metalloreductase 4
Stk24	Serin/Threonin-Proteinkinase 24
T	Thymin
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
Taq	taqman Sonde

TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
Th	Thomson
Thrsp	Thyroidhormonabhängige-Protein
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tpp2	Tripeptidyl-Peptidase 2
Tspo	Translokatorprotein
Txn2	mitochondriales Thioredoxin
Txnr2	Mitochondriale Thioredoxin Reduktase 2
ugFS	Ungesättigte Fettsäure
USA	United States of America
v/v	Volumen pro Volumen
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
vs.	Versus
WAT	weißes Fettgewebe
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WSD	Western-Style-Diät
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln
ZNS	zentrales Nervensystem
μ A	Mikroamper

1 Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist weltweit die Anzahl an übergewichtigen und adipösen Menschen stetig angestiegen, auch schwangere Frauen bilden dabei keine Ausnahme. Dies führt nicht nur zu einer Zunahme von fettleibigkeitsbedingten Krankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Diabetes, sondern auch zu einer steigenden Rate an Komplikationen während der Schwangerschaft sowie während und nach der Geburt. Auch scheint Übergewicht in der Schwangerschaft die Nachkommen nicht nur kurz-, sondern auch langfristig negativ zu beeinflussen. Das zeigt, dass Fettleibigkeit bei Frauen im gebärfähigen Alter ein wachsendes Problem für die öffentliche Gesundheit ist, das genauer erforscht werden muss. Dabei scheint das metabolische Risiko umso höher zu sein, je hypertropher die Fettzellen sind. Dies deutet darauf hin, dass das Fettgewebe in der Lage ist, den gesamten Organismus endokrin zu beeinflussen. Dabei werden viele verschiedene Modulatoren des Metabolismus durch Adipozyten sekretiert. Diese adipozytäre Sekretion wird durch Adipositas in Richtung vermehrter Inflammation und oxidativem Stress verändert, die als Bindeglied zwischen Adipositas und den Folgeerkrankungen gelten.

Um im Rahmen von Nagetiermodellen Adipositas zu induzieren, wurden bisher von Adipositasforschenden sowohl weltweit als auch in unserer Arbeitsgruppe vor allem fettreiche Diäten verwendet, wobei bisher kein standardisiertes Protokoll für Hochfettdiäten definiert wurde. Es wurden also Hochfettdiäten mit unterschiedlicher Zusammensetzung für unterschiedlich lange Zeiträume verfüttert, um bei Nagetieren Adipositas zu induzieren. Beim Menschen entsteht Übergewicht jedoch neben Lifestylefaktoren durch den übermäßigen Verzehr hochkalorischer Lebensmittel, die sowohl zu viel Fett als auch zu viel Zucker enthalten. Das bedeutet, dass die im Tiermodell genutzten Hochfettdiäten nicht den aktuellen Ernährungsgewohnheiten in der westlichen Welt entsprechen. Um zu untersuchen, ob eine andere Versuchsdiet besser geeignet ist, die Versuchsbedingungen an die Bedingungen beim Menschen anzunähern, wurden weiblichen Mäusen vor und während der Trächtigkeit eine von fünf verschiedenen Versuchsdieten verfüttert: Als Kontrollidieten dienten SD und CO, HFD als fettreiche Diät sowie DIO und WSD als fett- und zuckerreiche Diäten. Es erfolgte eine Sectio im dritten Trimenon, bei der scWAT-, egWAT- sowie Serumproben entnommen wurden. Eine kleinere Gruppe an Muttertieren konnte

hingegen spontan Werfen, sodass auch phänotypische Daten bezüglich der Nachkommen gewonnen werden konnten.

Sowohl bei der Verpaarung als auch bei Sectio waren die Mäuse der diätinduzierten Adipositas-Gruppen signifikant schwerer als Tiere der Kontrollgruppen, was wir mithilfe von μ CT-Untersuchungen mit einem erhöhten Körpervolumen korrelieren konnten. Wir konnten auch ein signifikant erhöhtes egWAT-Gewicht bei HFD- und DIO-Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachweisen, welches sich auch in einem erhöhten Anteil an viszeralem Fettvolumen in der μ CT-Untersuchung widerspiegelt. Somit konnten wir nachweisen, dass es gelungen ist, bei den trächtigen Versuchstieren der HFD-, DIO- und WSD-Versuchsgruppe Adipositas zu induzieren. Auch konnte eine Fettzellhypertrophie in diesen drei Versuchsgruppen gegenüber den Kontrollgruppen morphologisch nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich sowohl bei der Fettzellgröße als auch beim -durchmesser pathologische Veränderungen bei HFD-Versuchstieren, aber auch signifikante Erhöhungen bei DIO-Versuchstieren im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen.

Durch die Untersuchung der phänotypischen Daten bei Muttertieren, die spontan werfen konnten, zeigten sich deutlich eine verringerte Fertilität bei WSD-Verfütterung und eine schlechtere Überlebensrate für Nachkommen der CO- und WSD-Versuchsgruppe.

Auch wenn die RT-qPCR-Analysen von Inflammations- und oxidativen Stressmarkern keine mit bisher veröffentlichten Forschungen übereinstimmende Ergebnisse zeigten, konnten mithilfe der Analyse des Proteoms zahlreiche signifikante Veränderungen im Sinne einer vermehrten Bildung und Wirkung von Inflammation und oxidativem Stress in allen drei adipositasinduzierenden Versuchsgruppen, vor allem aber in den Hochfett-/Hochzucker-Versuchsgruppen, nachgewiesen werden. Einige Mechanismen, die bisher nur systemisch bekannt waren, konnten so auch lokal im egWAT nachgewiesen werden.

So ergaben sich Hinweise auf eine Verringerung der mitochondrialen Fusionskapazität sowie eine Verringerung der antioxidativen Kapazität und Anstieg der Bildung und negative Auswirkungen von oxidativem Stress und Lipotoxizität in den Hochfett-/Hochzucker-Diäten. Sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirksame Proteine waren signifikant verändert. Auch war die Expression von Proteinen der Adipozytendifferenzierung sowie Proteinen, die das Risiko einer

Insulinresistenz erhöhen, im Vergleich zur SD hochreguliert. Es zeigte sich sogar bei einigen relevanten Proteinen eine signifikant pathologischere Expression bei DIO- und WSD- gegenüber HFD-Versuchstieren. Beispielsweise zeigte sich an der Proteinexpression von Txn2, Pdk2, Steap4 und Aldoa im Vergleich zur HFD ein erhöhtes Risiko für adipositasbedingte Folgeerkrankungen wie Insulinresistenz und endotheliale Dysfunktion in den Hochfett-/Hochzucker-Diäten. Aber auch Proteine, die proinflammatorische Funktionen erfüllen wie Apip und Kng1, waren vermehrt nachzuweisen.

Auch konnten im Serum von WSD-Muttertieren insgesamt erhöhte Spiegel einiger mit Fettleibigkeit assoziierter Fettsäuren nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf eine stärker ausgeprägte Dyslipidämie in dieser Versuchsgruppe sein könnte, welche Adipositas mit der Entwicklung von Folgeerkrankung verbindet.

Aus der Zusammenschau aller Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass die ausgewählten Hochfett-/Hochzucker-Diäten geeignet sind, um ebenso wie die Hochfett diät Adipositas bei weiblichen C57BL/6N-Mäusen zu induzieren und phänotypische Veränderungen hervorzurufen. Dabei scheint die reine Hochfett diät zwar die größte Volumen- und Durchmesserzunahme bei Adipozyten des egWATs auszulösen, zeigt aber auf Proteinebene eine eher geringere Induktion von Inflammations- und oxidativen Stressmarkern. Im Sinne der Lipotoxizitätstheorie wäre es denkbar, dass die Kapazität von subkutanem Fettgewebe zur Aufnahme von Triglyceriden bei Hochfett-/Hochzucker-Diät reduziert ist und es so bereits bei geringerem Fettgewebsvolumen zu relevanten und pathologischen Veränderungen kommt, die Inflammation und oxidativen Stress auslösen. Genauere Forschungen sind unbedingt notwendig, um die Mechanismen und Ursachen dieser Veränderungen aufzudecken.

Die negativen Effekte von Über- und Unterversorgung mit Makronährstoffen spiegeln sich auch in der geringeren Trächtigkeitsrate bei WSD-Tieren sowie der schlechteren Überlebensrate bei Nachkommen von WSD- und CO-Versuchstieren wider, sodass diese Diäten nur für monogenerationale Tierversuchsmodelle eingesetzt werden sollten.

Unsere Arbeit trägt dazu bei, die Induktion von Adipositas in Tiermodellen den menschlichen Gegebenheiten anzunähern und so Übertragbarkeit und Standardisierung deutlich zu erhöhen. Wir konnten zeigen, dass eine Diet-induced-

obesity-Diet mit hohem Lipid- und Zuckergehalt die beste Alternative der hier untersuchten Diäten darstellt, um bei Tierversuchen mit C57BL/6N-Mäusen Adipositas zu induzieren, womit wir zahlreiche Anstöße für nachfolgende experimentelle und klinische Forschung liefern.

2 Einleitung

2.1 Übergewicht und Adipositas

Übergewicht gilt heutzutage als Volkskrankheit. Dabei ist Übergewicht als abnormale oder exzessive Fettansammlung definiert, die die Gesundheit beeinträchtigen kann. Die WHO definiert Übergewicht als BMI (Body-Mass-Index) zwischen 25-30 kg/m² und Adipositas als BMI über 30 kg/m².² Die zugrundeliegende Pathophysiologie von Übergewicht besteht aus einem Ungleichgewicht aus Kalorienaufnahme und -verbrauch, wobei der genaue Phänotyp unter anderem von der physischen Inaktivität und genetischen Faktoren abhängt.³⁻⁵

Die WHO schätzt Übergewicht als die größte Herausforderung des 21. Jahrhunderts für öffentliche Gesundheitssysteme ein.⁶ So verursacht Übergewicht eine Erhöhung der jährlichen Gesundheitskosten um 36 % und der Medikationskosten um 77 % im Vergleich zu normalgewichtigen Personen in den USA (Daten: 2016).⁵ Weltweit gibt es mehr Todesfälle im Zusammenhang mit Über- als mit Untergewicht.² Historische Daten legen nahe, dass der BMI weltweit seit 300 Jahren kontinuierlich zugenommen hat.⁷ Auch die Prävalenz in vielen Ländern der EU hat sich seit den 1980ern verdreifacht und steigt weiter.^{6,8} Die zuletzt von der WHO veröffentlichten Daten zur weltweiten Prävalenz von Übergewicht und Adipositas stammen aus dem Jahr 2016: mehr als 1,9 Milliarden Erwachsene (>18-Jährige) waren übergewichtig, insgesamt 650 Millionen davon sogar adipös. Insgesamt waren 15 % aller Frauen weltweit adipös,² viele davon im gebärfähigen Alter.

Dabei stellt Übergewicht einen erheblichen gesundheitlichen Risikofaktor dar. Vor allem die Entstehung chronischer, nicht-übertragbarer Erkrankungen wie kardiovaskuläre Erkrankungen (und damit auch Herzinfarkte und Schlaganfälle), Diabetes mellitus Typ 2 (DM-II) und verschiedene Krebsarten werden begünstigt.^{2,5} Unter anderem dadurch erhöht sich die Gesamtmortalität bei jeder Steigerung des BMI um 5 Einheiten (ab einem BMI von über 25 kg/m²) um 29 %, die vaskulär bedingte Mortalität steigt um 41 % und die diabetesassoziierte Mortalität sogar um 210 %.⁵ In Europa machen Personen mit BMI über 30 nur 23,3 % der Bevölkerung aus, aber auf sie entfallen 60 % der übergewichtsassoziierten Erkrankungen und Mortalität.^{7,9}

2.2 Übergewicht und Adipositas vor und in der Schwangerschaft

Insbesondere die in den letzten Jahren zunehmende Prävalenz an übergewichtigen Frauen im gebärfähigen Alter stellt laut WHO eine große Herausforderung dar, da die Fettleibigkeit nicht nur die Schwangere selbst ungünstig beeinflusst, sondern auch das Ungeborene einem vermeidbaren Risiko aussetzt.² In der *Euro-Peristat*-Studie aus dem Jahr 2010 waren etwa 35 % der Schwangeren in Deutschland übergewichtig; 13,7 % waren sogar adipös.¹⁰ Vor allem die Ernährungsgewohnheiten der westlichen Welt tragen dazu bei, dass immer mehr Frauen während der Schwangerschaft Übergewicht und/oder Gestationsdiabetes (GDM) entwickeln.^{11,12}

2017 belief sich der Anteil an adipösen Frauen im reproduktiven Alter auf etwa 23 % in den USA.¹³ Durch Übergewicht und Adipositas erhöht sich in jeder Phase der Schwangerschaft das Risiko einer Erkrankung für Mutter und Kind.

Präkonzeptionell sieht man bei übergewichtigen Frauen gehäuft Menstruationsunregelmäßigkeiten,¹⁴ endometrielle Pathologien¹³ und Subfertilität.¹³ Durchschnittlich dauert es bei adipösen Frauen länger bis zum Gelingen einer Schwangerschaft, sowohl bei natürlicher Empfängnis als auch bei IVF-Behandlung.^{13,15} Auch der Embryo wird schon in der Präimplantationsphase von einem adipösen Umfeld beeinflusst. Im Falle einer Schwangerschaft ist die Wahrscheinlichkeit für Gestationsdiabetes,¹⁶ Präeklampsie,¹⁷ Frühgeburtlichkeit¹⁸ und intrauteriner Fruchttod¹³ signifikant erhöht, während die Rate an Lebendgeburten insgesamt erniedrigt ist.¹³ Es konnte bei Neugeborenen adipöser Mütter eine erhöhte Rate an respiratorischen Anpassungsstörungen, Hypoglykämien und Asphyxien nachgewiesen werden.^{13,18-20} Im Rahmen der Geburt besteht bei adipösen Schwangeren eine erhöhte Wahrscheinlichkeit eines Kaiserschnitts oder einer instrumentenunterstützten Entbindung, Hämorrhagie, Infektion und eines längeren Krankenhausaufenthaltes.²¹ Auch die Wahrscheinlichkeit für Wundheilungsstörungen der Mutter steigt.^{13,18-20}

Eine neonatologische Intensivversorgung des Neugeborenen ist bei adipösen Müttern häufiger notwendig.²¹ Insgesamt ist die Prognose für Mutter und Kind während der Entbindung und auch direkt postpartal schlechter als bei normalgewichtigen Müttern.²¹ Kinder von adipösen Müttern zeigen außerdem ein erhöhtes Risiko für kongenitale Fehlbildungen wie Neuralrohrdefekte, Spina bifida oder Lippen-Kiefer-Gaumenspalten.²²

Es gibt immer mehr Daten, die darauf hinweisen, dass mütterliches Übergewicht sogar über mehrere Generationen hinweg ein Risiko für Stoffwechselstörungen darstellt.²³ Somit scheint Fettleibigkeit das intergenerationelle Risiko zu beeinflussen, das heißt es steigt das Risiko für Nachkommen, später im Leben an bestimmten Krankheiten zu erkranken. Kinder von fettleibigen Müttern haben ein höheres Risiko im Erwachsenenalter an Fettleibigkeit, DM-II und Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu leiden.²³ Dies könnte auf epigenetische Veränderungen in utero zurückzuführen sein. Mausversuche zeigen beispielsweise, dass eine metabolische Dysfunktion durch beeinträchtigte mitochondriale Dynamik über die mütterliche Keimbahn auch an die zweite und dritte Generation der Nachkommen weitergegeben werden kann.²⁴ Auch die Wahrscheinlichkeit für primär nicht metabolische Erkrankungen wie Verhaltensstörungen und Asthma bronchiale ist bei Nachkommen adipöser Mütter erhöht.²⁵

Insgesamt beeinflussen also die mit mütterlichem Übergewicht assoziierten Veränderungen alle Phasen der Schwangerschaft und Geburt und haben auch langfristige Folgen, sowohl für die Mutter als auch für die Nachkommen.

2.3 Fettgewebe

Bis in die späten 1940er Jahre wurde Fettgewebe nur als eine Form von Bindegewebe charakterisiert, in dem Lipidtröpfchen enthalten waren. Eine wichtige Funktion des Fettgewebes wurde damals bereits erkannt: Es hat mechanische Eigenschaften. Es hilft dabei einerseits besonders empfindliche Organe, wie beispielsweise das Auge, aber auch besonders beanspruchte Körperbereiche, wie die Ferse, vor Schäden zu schützen.²⁶ Später wurde erkannt, dass Fettgewebe auch eine wichtige Rolle bei der Nährstoffhomöostase spielt, da es als Kalorienspeicher nach der Nahrungsaufnahme und als Quelle der zirkulierenden freien Fettsäuren während des Fastens fungiert. In den 1990er Jahren kam die Entdeckung der aus dem Fettgewebe stammenden Serumfaktoren wie Adiposin, TNF- α und Leptin hinzu.²⁶ Fettgewebe muss also als ein endokrines Organ im Zentrum der Energiehomöostase betrachtet werden.²⁷ Die Dysfunktion des Fettgewebes gehört zu den frühen Veränderungen bei der Entwicklung von Übergewicht und Adipositas und scheint ein Schlüsselmechanismus zu sein, der das individuelle Risiko für metabolische und kardiovaskuläre Komplikationen bestimmt.²⁸

2.3.1 Aufbau und Physiologie des Fettgewebes

Grundsätzlich besteht Fettgewebe (AT) vor allem aus Adipozyten, deren Vakuole im ausgereiften Zustand nahezu vollständig mit Lipid ausgefüllt ist. Dadurch werden der Zellkern und die anderen Zellorganellen in die Peripherie des Adipozyten gedrückt. Eine stabile Basallamina umgibt die Adipozyten, ebenso wie stark vaskularisiertes Bindegewebe. Gemeinsam mit der extrazellulären Matrix, bestehend unter anderem aus Kollagen IV, anderen Proteinen, retikulären Fasern und Proteoglykanen entsteht so ein stabiles Gerüst um den Adipozyten, welches ihn vor mechanischen Schäden schützt.^{29,30} Neben Adipozyten besteht Fettgewebe noch aus weiteren Zellen, beispielweise Präadipozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen wie Makrophagen.^{27,31} Jedes Gramm Fettgewebe enthält dabei etwa 1-2 Millionen Adipozyten sowie 4-6 Millionen Stroma- und vaskuläre Zellen.³²

Überschüssige Fettsäuren werden während anabolen Phasen als Triglyceride in den Lipid-Vakuolen der Adipozyten gespeichert, wodurch es zur Ausdehnung des Fettgewebes kommt.³³ Das Fettgewebe nimmt einerseits durch Hyperplasie und andererseits durch Hypertrophie zu, womit gleichzeitig der Durchmesser der Adipozyten steigt.^{34,35} Dieser Prozess wurde auch bei Mäusen beobachtet, die mit einer Hochfettdiät (HFD) gefüttert wurden.³⁶ Die Fettaufnahme der Adipozyten beim Menschen steigt mit zunehmendem Körperfettanteil bis zu einer maximalen Menge von ~0,7-0,8 µg/Zelle sowohl abdominell als auch gluteal und femoral.³⁷ Übersteigt das Fettangebot diese Schwelle pro Zelle, kommt es zusätzlich zu einer Hyperplasie der Adipozyten.³⁷

Dabei sind größere Adipozyten mit der Entwicklung einer Insulinresistenz assoziiert, was beispielsweise durch verschiedene Knockout-Maus-Versuche gezeigt werden konnte.³⁸ Wird die Speicherkapazität der Adipozyten längerfristig überschritten, kommt es vermutlich zu einem sogenannten „Spill-over“.³⁹ Fettsäuren reichern sich auch in anderen Geweben wie Leber, Nieren, Pankreas und Gefäßwänden an und üben dort toxische Wirkungen aus, was als Lipotoxizität bezeichnet wird.^{39,40} Es scheint vor allem diese ektopische Speicherung von Fettgewebe zu sein, die mit Folgeerkrankungen einhergeht.³³ Aber auch für das Fettgewebe kann Übergewicht gefährlich werden: Bei einem hohen BMI und mit zunehmender Adipozytengröße steigt die Wahrscheinlichkeit für die Apoptose der Adipozyten.⁴¹

In Zeiten des Fastens werden die Triglyceride in Form von freien Fettsäuren durch Lipolyse freigesetzt, ins Blut abgegeben und können dann beispielsweise von der Skelettmuskulatur verwertet werden.²⁷ Sowohl Lipogenese als auch Lipolyse werden vor allem durch Insulin und Glukagon reguliert, weshalb Veränderungen im Hormonhaushalt deutliche Auswirkungen auf die Fettgewebshomöostase haben. Da, wie bereits 2006 von *Greenberg et al.* ausgeführt, Fettgewebe neben dieser Speicher- und Isolierfunktion auch metabolisch aktiv ist, also durch Hormone und Immunmodulation aktiv in den Metabolismus des gesamten Körpers eingreift, ist eine Betrachtung von Fettgewebe im Kontext adipöser Schwangerer besonders relevant.⁴²

2.3.2 Fettgewebsarten und -depots

Menschen haben insgesamt drei verschiedene Arten von Fettgewebe: weißes, beiges und braunes Fettgewebe, die alle separat voneinander betrachtet werden sollten.⁴³ Braunes Fettgewebe wird vor allem für die Energieproduktion sowie Temperaturregulierung benötigt, ist nur in wenigen Depots zu finden und macht nur einen geringen Anteil des Gesamtfettgewebes aus.⁴⁴ Das ebenfalls nur in geringen Mengen vorkommende beige Fettgewebe scheint eine Zwischenfunktion zwischen braunem und weißem Fettgewebe einzunehmen. Je nach Notwendigkeit scheint es an der Thermogenese oder dem Energiestoffwechsel teilzunehmen.⁴⁵ Weißes Fettgewebe (WAT) macht beim Menschen den größten Anteil des Fettgewebes aus⁴⁶ und ist vor allem an der Entwicklung von Adipositas und deren Folgeerkrankungen beteiligt.⁴⁷

Das WAT ist beim Menschen vor allem an zwei verschiedenen Depots zu finden: als subkutanen Fettgewebe (scWAT) und als viszerales Fettgewebe, das die inneren Organe umgibt. Diese beiden Lokalisationen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht. Das scWAT dient unter physiologischen Bedingungen als primärer Fettspeicher und verhindert somit ektope Fettablagerungen in anabolen Phasen.⁴⁸ ScWAT gilt als weniger metabolisch und lipolytisch aktiv.⁴⁹ Wird jedoch die Kapazität des scWAT zur Speicherung von Lipiden überschritten, werden weiterhin anfallende Fettsäuren als Triglyceride zunehmend auch im viszeralen WAT und anderen Geweben gespeichert.⁴⁰ Diese Überlastung der Speicherkapazität des scWAT scheint einer der wichtigen Mechanismen bei der Entstehung der Folgeerkrankungen zu sein.³³ Möglicherweise liegt auch darin die Erklärung für eine Subgruppe der Adipösen, die trotz erhöhtem BMI keine metabolischen Folgeerkrankungen aufweisen: Die

Speicherkapazität des scWAT scheint bei diesen Patienten noch nicht erschöpft, sodass ein metabolisch gesunder Phänotyp vorliegt.⁵⁰⁻⁵² Die Zunahme von viszeralem Fettgewebe ist mit einem erhöhten Risiko für metabolische Störungen und ihre Folgeerkrankungen verbunden.⁵³ Außerdem ist es metabolisch aktiver und zeigt eine erhöhte lipolytische Aktivität im Vergleich zum scWAT.⁵⁴ Die anatomische Lage des viszeralen Fettgewebes kann zu einem erhöhten kardiometabolischen Risiko beitragen, da dieses Fettgewebsdepot vaskulär direkt mit der Pfortader verbunden ist und somit die Leber direkt mit Metaboliten, Zytokinen und Adipokinen des viszeralen Fettgewebes in Kontakt kommt.⁵⁵ Die Korrelation zwischen abdomineller Adipositas und den metabolischen Folgeerkrankungen ist so stark, dass die WHO die Verwendung des Taillenumfangs als Marker für die Wahrscheinlichkeit einer Insulinresistenz empfiehlt.²

In dieser Arbeit wurden eingehende Untersuchungen an subkutanem (scWAT als peripherem) und epigonadalem (egWAT) weißem maternalem Fettgewebe durchgeführt. Die Verwendung von mesenterialem Fettgewebe war aufgrund der praktischen Herausforderung beim Präparieren nicht möglich, weshalb stattdessen egWAT als periviszerales und uterusnahes Fettgewebe⁵⁶ verwendet wurde. Von diesen beiden Fettgeweben ist egWAT deutlich aktiver, sekretiert vermehrt inflammatorische Faktoren und ist enger mit durch Adipositas beeinflussten Erkrankungen assoziiert, sodass es für die Proteomic-Analyse besser geeignet war.^{41,43,48}

2.3.3 endokrine Funktionen

Der Austausch zwischen Fettzellen und ihren umgebenden Zellen wird auf drei verschiedene Arten vermittelt: per Ernährungsmechanismen, per neuronalen Bahnen und per auto-, para- und endokrinen Wirkstoffen, die als Adipokine bezeichnet werden. Letztere beeinflussen auf vielfältige Weise den Körper und regulieren unter anderem Energiehaushalt, Lipid- und Glukosestoffwechsel, Fettverteilung, Insulinsekretion und -sensitivität, Inflammation, Immunfunktionen, Appetit und Sättigung.⁵⁷ Parakrin regulieren sie im WAT Metabolismus und Funktion der Adipozyten sowie der umgebenden Stromazellen und beeinflussen die Adipogenese und die Einwanderung und Verteilung von Immunzellen.⁵⁸

Früh entdeckte Beispiele für aus Fettgewebe stammende sekretierte Adipokine sind immunologische Produkte wie Adipsin und TNF- α , aber die Entdeckung von Leptin

war ein Wendepunkt für die Erforschung des Fettgewebes.²⁷ Es zeigte nämlich, dass Adipozyten endokrin aktive Zellen sind und es spezifische biologische Ursachen für Übergewicht geben kann.⁴² Der Großteil des Leptins stammt aus den Adipozyten, sodass der Serumspiegel in einem engen Zusammenhang mit der Fettmasse steht,^{27,59} auch wenn die Leptin-Expression durch viele weitere Faktoren beeinflusst wird.⁶⁰ Dabei sinken die Leptin-Level schnell bei Kalorienrestriktion und Gewichtsabnahme.⁶¹ Leptin hat Effekte auf spezifische Rezeptoren sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem.⁶² Es handelt sich um ein zirkulierendes, endokrines Hormon, um Informationen über den Status der Energiespeicher aus der Peripherie ans ZNS weiterzugeben.⁶² Es gilt als Sättigungshormon, das den Appetit hemmt und in den Energiehaushalt eingreift, indem der Glukose- und Fettstoffwechsel gesteigert wird.⁶³ In der Peripherie wirkt Leptin auf das Immunsystem, wobei Entzündungen-, Zytokin- und Makrophagenfunktion gefördert werden.⁶⁴ Auch vielfältige zentrale Effekte über den Hypothalamus sind beschrieben, unter anderem eine möglicherweise dopaminerg-vermittelte Beeinflussung der Belohnungsbahn, welche unter anderem die Schmackhaftigkeit von Essen beeinflusst.⁶² Auch wurde festgestellt, dass Leptin bei der Kontrolle des Blutzuckerspiegels (BZ) lipodystrophischer Tiere eine große Rolle spielt und diese verbessert.⁶⁵

Ein weiteres sehr wichtiges Adipokin ist Adiponektin, welches in einer Serumkonzentration von 2-10 µg/ml im menschlichen Körper zu finden ist. Dabei ist die Expression von Adiponektin, welches kontinuierlich sezerniert wird, sehr fettgewebsspezifisch. Die Expression und Sekretion von Adiponektin ist bei viszeraler Adipositas vermindert, trotz der insgesamt erhöhten Fettmasse.⁶⁶ Adiponektin regt die Fettsäureoxidation in der Leber an, unterdrückt die hepatische Glukoseproduktion, verbessert die Funktion der β -Zellen und erhöht die periphere Insulinempfindlichkeit.²⁷ Als zentrale Effekte scheint es über den Hypothalamus zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme zu kommen.⁶⁷ Insgesamt scheint Adiponektin antidiabetisch, antiinflammatorisch und antiatherogen auf den Körper zu wirken und sich protektiv auf das kardiovaskuläre System auszuwirken.^{61,68}

Resistin ist ein weiteres Adipokin, welches bei Nagetieren die Fettleibigkeit mit Insulinresistenz verbindet. Eine erhöhte Resistinkonzentration führt zu einer Insulinresistenz.⁶⁹ Die Expression von Resistin ist hochspezifisch für das WAT von Mäusen, es zirkuliert in hohen Konzentrationen im Serum von adipösen Tieren.⁶⁹

Resistin wirkt proinflammatorisch, wobei es die Produktion von Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) steigert.⁶⁹ Viele weitere Adipokine wurden in den letzten Jahren identifiziert, welche jedoch bisher noch nicht so tiefgehend wie die drei hier genannten erforscht wurden.

2.3.4 Adipokine bei Adipositas

Im Rahmen der Adipositas-Forschung zeigt sich in den letzten Jahren immer wieder, dass die metabolischen Folgeerkrankungen eng mit Veränderungen des WATs verbunden sind. Dazu zählen auch Funktionsveränderungen bei der Adipokin-Sekretion: um die systemische Homöostase aufrechtzuerhalten, passen Adipozyten unter physiologischen Gegebenheiten ihre Adipokin-Sekretion an die Stoffwechsellage und die metabolischen Umstände an.⁵⁷ Wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, haben viele bisher entdeckte Adipokine einen Einfluss auf die Sensitivität von Insulin. Durch Übergewicht verändert sich das Sekretionsmuster hin zu einem proinflammatorischen Milieu. Eine große Rolle dabei scheint die Migration von Immunzellen ins WAT bei Adipositas zu spielen, die dort die Sekretion von proinflammatorischen Adipokinen fördern.⁷⁰ So wird vermehrt Leptin sekretiert und der Serumspiegel steigt, welches zusätzlich zu der beschriebenen Wirkung auf den Energiehaushalt auch eine proinflammatorische Wirkung, durch Steigerung der Sekretion von IL-6 und TNF- α aus Immunzellen, hat.³¹ Im Gegensatz dazu zeigen sich antiinflammatorische Adipokine wie Adiponektin im Serum erniedrigt,⁷¹ wodurch die protektiven Effekte reduziert sind. Auch ein höherer Adipozytendurchmesser, welcher durch eine Hypertrophie der Adipozyten bei erhöhter Lipogenese entsteht, ist mit erhöhten Leveln an proinflammatorischen Adipokinen wie Leptin, geringeren Adiponektin-Spiegeln, einer reduzierten Insulinsensitivität, einer erhöhten Anzahl an Immunzellen wie Makrophagen im WAT, oxidativem Stress und erhöhten Entzündungsmarkern assoziiert.^{70,72}

Insgesamt kommt es also zu einem Zustand einer chronischen lokalen und systemischen Inflammationsreaktion, die die Entstehung einer Insulinresistenz fördert,⁷⁰ einer der größten Risikofaktoren für die Manifestation und das Fortschreiten von kardiovaskulären Erkrankungen und DM-II.⁵³

2.3.5 Inflammation

Schon seit einiger Zeit ist klar, dass Adipositas mit einem erhöhten Entzündungszustand verbunden ist.⁷³ Dabei handelt es sich nicht um einen akuten

Entzündungszustand, der durch die fünf Kardinalsymptome *calor, rubor, dolor, functio leasa* und *tumor* gekennzeichnet ist, sondern um einen chronischen Zustand, der unter anderem durch lokal und systemisch erhöhte Entzündungsmediatoren gekennzeichnet ist.

Bereits 1993 wurde erstmals von *Hotamisligil et al.* der Zusammenhang zwischen Übergewicht und Entzündungen, durch eine positive Korrelation zwischen Fettmasse und der Expression des proinflammatorischen Gens TNF- α , nachgewiesen.⁷⁴ Auch bei Untersuchungen des maternalen Fettgewebes übergewichtiger Mäuse während der Trächtigkeit konnten signifikant erhöhte Entzündungsmarker (IL-6, TNF- α u.a.) sowie eine erhöhte Anzahl an Immunzellen im Fettgewebe nachgewiesen werden.^{75,76} Dabei scheint die Inflammation ein zentraler Bestandteil der Pathogenese zu sein, die bei HFD-Mäusen zu einem metabolischen Syndrom führt.^{77,78} Vorangegangene Studien beim Menschen haben gezeigt, dass im Fettgewebe von Übergewichtigen sowohl vermehrt Zellen des Immunsystems (dabei vor allem Makrophagen) als auch proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-6 detektiert werden können.³⁴ Vor allem die Makrophagen scheinen eine sehr wichtige Rolle in der Produktion von Zytokinen zu spielen,⁷⁹ im physiologischen Zustand überwiegen M2-Makrophagen, die antiinflammatorische Eigenschaften besitzen. Bei Adipositas kommt es allem Anschein nach zu einem Shift der M1/M2-Ratio in Richtung einer Polarisierung zu proinflammatorischen M1-Makrophagen,^{80,81} insbesondere eine Hochfett-Fütterung scheint dieses Phänomen zu verstärken.⁸² M2-Makrophagen sekretieren vermehrt proinflammatorische Adipokine und reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die eine entscheidende Rolle bei oxidativem Stress spielen.²⁷

Viele der entzündlichen Marker, die im Plasma fettleibiger Personen gefunden werden, stammen offenbar aus dem Fettgewebe. Diese Beobachtungen haben zu der Ansicht geführt, dass Adipositas ein Zustand systemischer chronischer Entzündungen niedrigen Grades ist, der durch morphologische Veränderungen des Fettgewebes ausgelöst wird.⁷³ Die entzündlichen Marker gelangen durch den Blutkreislauf zu anderen Geweben wie Skelettmuskulatur, Gehirn und Leber und aktivieren auch dort proinflammatorische Signalwege.⁸³ Dort beeinflussen sie das Ansprechen auf Insulin, es kommt zu einer peripheren Insulinresistenz, die Entwicklung eines DM-II wird gefördert.^{34,83} Durch die Veränderungen des Lipidstoffwechsels kommt es bei langanhaltender Insulinresistenz auch zu Folgeerkrankungen des kardiovaskulären Systems: atherosklerotische Plaques

bilden sich, die ein kritischer Bestandteil der Pathogenese von chronischen und akuten kardiovaskulären Ereignissen sind.⁸⁴

Es zeigte sich also, dass dem Fettgewebe eine komplexe Rolle in der Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase zukommt und eine Dysregulation der Adipokine zur Entstehung von Inflammation, Insulinresistenz, kardiovaskulären Erkrankungen und dem metabolischen Syndrom beiträgt.⁸⁵ Gemeinsam mit fettgewebsspezifischen Hormonen wie Leptin induzieren Zytokine die Produktion von ROS in verschiedenen Geweben, welche wiederum eine der Ursachen für oxidativen Stress darstellen.⁸⁶ Studien deuten darauf hin, dass auch viele der in Kapitel 2.2 erwähnten Schwangerschaftskomplikationen bei adipösen Müttern mit einem Zustand chronischer, subakuter Entzündungen in Zusammenhang stehen, Inflammationsmarker den Ausbruch und die Schwere jeder dieser Krankheiten begünstigen können und somit einen potenziell verbindenden pathogenen Zusammenhang darstellen.^{16,77,87,88}

Die Veränderungen des inflammatorischen Status sind anhand von Veränderungen verschiedener pro- und antiinflammatorischer Marker nachzuvollziehen. Einerseits wird durch Adipositas die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Marker erhöht, zu denen die Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 (bestehend aus IL-1 α und IL-1 β) gehören.⁸⁹ Andererseits spielen auch Chemokine wie CXCL 1 und CXCL10 eine wichtige Rolle, da sie die Migration von Immunzellen wie Leukozyten ins Fettgewebe fördern und dadurch indirekt proinflammatorisch wirken.⁹⁰ Einige dieser Marker wurden im Fettgewebe der Muttertiere mithilfe von Realtime qPCR nachgewiesen (vgl. Kapitel 3.3.4.5).

2.3.6 Oxidativer Stress

Neben Inflammation scheint oxidativer Stress eine weitere Ursache für die Entwicklung von adipositasassoziierten Folgeerkrankungen zu sein.⁸⁶ Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht aus Antioxidantien und Oxidantien, die im Rahmen des aeroben Stoffwechsels entstehen, sodass sich ihre Effekte gegenseitig aufheben.⁹¹ Oxidativer Stress ist als eine Verschiebung dieser Homöostase in Richtung der Oxidantien definiert.⁹¹ Ein Schlüsselbestandteil der Oxidantien sind ROS, die in der mitochondrialen Atmungskette sowie bei physiologischer Enzymaktivität entstehen.⁹¹ Überwiegen die Oxidantien kommt es zur Schädigung von Proteinen, Lipiden und DNA, wodurch es zur Apoptose der betroffenen Gewebe kommen kann.⁸⁶ Je höher der BMI, desto höher sind auch

oxidative Stressmarker im Serum beim Menschen.⁹² Ebenso wie bei der Inflammation scheint auch beim oxidativen Stress dem WAT eine Schlüsselrolle zuzukommen,⁹³ bei Entzündungsprozessen entstehen mehr Oxidantien wie ROS.⁹¹

Dabei hat Übergewicht selbst einen direkten Einfluss auf das oxidative Stresslevel, da die vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Adipokine bei Adipösen zu einer vermehrten Freisetzung von ROS durch Immunzellen führt.⁸⁶ Zusätzlich wird die Aktivität der NADPH-Oxidase im Fettgewebe erhöht, einem Schlüsselenzym der ROS-Synthese.⁸⁶ Andere, nicht fettgewebsspezifische Mechanismen, die zu erhöhten oxidativen Stressmarkern bei Übergewicht führen können, sind die vermehrte Oxidation von Fettsäuren in Mitochondrien und Peroxisomen, Funktionsstörungen der Mitochondrien sowie Zellschäden bei übermäßiger Ansammlung von Fett.⁹⁴ Bei übergewichtigen Frauen finden sich höhere Konzentrationen an zirkulierenden freien Fettsäuren, welche auch Zellen außerhalb des Fettgewebes durch ROS schädigen.⁹⁵ Durch ROS wird sowohl mitochondrialer als auch ER-Stress ausgelöst, was letztendlich zur Apoptose führen kann.⁹⁵

Als Gegenspieler der Oxidantien finden sich körpereigene Antioxidantien, die die schädlichen Effekte der Oxidantien reduzieren. Dazu zählen verschiedene Vitamine, aber auch antioxidative Enzyme. Drei besonders relevante antioxidative Enzyme werden als Antioxidative-Superfamilie bezeichnet: Katalase (CAT), Superoxiddismutase (SOD) und Glutathionperoxidase (GPX).⁹⁶ Physiologisch kommt es in der Schwangerschaft zu einer systemischen Erhöhung von oxidativen Stressmarkern durch eine milde systemische Entzündungsreaktion.⁹⁷ Vor allem unter adipösen Bedingungen kann es allerdings zu einer Erschöpfung dieser kompensatorischen Mechanismen kommen, der steigende oxidative Stress erhöht das Risiko einer Insulinresistenz und des metabolischen Syndroms.⁸⁶ Es droht in der Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko für Gestationsdiabetes, Präeklampsie, Frühgeburtlichkeit und intrauterine Wachstumsrestriktion.⁹⁸

Um das Level des oxidativen Stresses zu detektieren, eignen sich vor allem die verschiedenen Untereinheiten der NADPH-Oxidase (CYB-A, CYB-B, NCF1, NCF2, NOX4). Diese sind als pro-oxidative Marker für ROS bekannt, ihre Aktivität im WAT ist bei Adipositas erhöht. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität einiger antioxidativer Enzyme erniedrigt.⁹⁹ Dazu zählen CAT, SOD und GPX. Die hier genannten Marker wurden mithilfe einer Realtime qPCR im Fettgewebe der Muttertiere detektiert.

2.4 Fettsäuren im Blut

Neben der Untersuchung des Fettgewebes spielt die genauere Betrachtung des Fettsäureprofils im Blut eine Rolle bei der Bewertung des Fettstoffwechsels.^{100,101} Nach Aufnahme von Fett durch die Nahrung erfolgt der Transport in Form von nicht wasserlöslichen Fettsäuren, gebunden an Albumin oder anderen Transportlipoproteinen. Dabei enthält Serum sowohl Triacylglyceride, Cholesterinester, Phospholipide sowie freie Fettsäuren.

Palmitinsäure ist eine gesättigte Fettsäure (gFS), die als erste Fettsäure bei der Lipogenese als Vorläufer langkettiger Fettsäuren gebildet wird.^{102,103} Ein häufiger Bestandteil von Triacylglyceriden ist Ölsäure, eine einfach ungesättigte Fettsäure (ugFS).¹⁰⁴ Bei Linolsäure handelt es sich um die am häufigsten konsumierte mehrfach gesättigte Fettsäure in der menschlichen Ernährung, außerdem ist sie die Ausgangsverbindung für eine Reihe weiterer bioaktiver Fettsäuren.¹⁰⁵ Auch Stearinsäure scheint in verschiedenen Fütterungsversuchen einen Einfluss auf den Fettstoffwechsel zu haben; es zeigten sich erhöhte Serum-Cholesterin-Werte und damit ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko.¹⁰⁶ Von der Lebensmittelindustrie wird Myristinsäure als Geschmacksträger eingesetzt,¹⁰⁷ neueste Erkenntnisse scheinen aber auch auf eine wichtige Rolle bei einer systemischen inflammatorischen Reaktion wie beispielsweise einer Sepsis hinzuweisen.¹⁰⁸ Eine Übersichtsarbeit beschreibt Palmitoleinsäure als Lipokin, welches Einfluss auf verschiedene Stoffwechselprozesse nimmt.¹⁰⁹ Beispielsweise wurde die Erhöhung der Insulinsensitivität im Muskel, eine Proliferation von β -Zellen, sowie eine Regulation der lipogenen Aktivität im WAT beschrieben.¹⁰⁹ Im Rahmen von oxidativem Stress wird Arachidonsäure vermehrt autooxidiert und es kommt unter anderem zu einer Überexpression von COX-2.¹¹⁰ Andersherum beeinflussen freie Arachidonsäure auch die vermehrte Bildung von ROS, wobei die genaue Rolle dieser freien Fettsäure bei der Inflammationsreaktion umstritten ist.¹¹¹ Docosahexansäure als mehrfach ungesättigte Fettsäure spielt eine wichtige Rolle bei neurologischen Vorgängen,¹¹² aber auch systemisch bei Inflammationsreaktionen, genauer gesagt bei der Makrophagen-Polarisation.¹¹³

Adipositas ist eng mit Dyslipidämie assoziiert, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und proinflammatorischen Adipokinen zu bestehen scheint.¹¹⁴ Einige Forschungsarbeiten gehen davon aus, dass die Dyslipidämie einen

der relevantesten Risikofaktoren für die Entwicklung von DM-II,¹¹⁵ kardiovaskulären Erkrankungen und bestimmten Krebsarten bei Übergewicht darstellen kann.¹¹⁶ Dabei ist die Zusammensetzung der Fettsäuren im Blut beim Mensch einerseits direkt durch die Nahrung beeinflusst,¹¹⁷ wird aber auch durch Adipositas und Lifestyle-Faktoren wie Rauchen oder körperliche Aktivität selbst verändert.¹¹⁸

2.5 Diätinduziertes Adipositas-Mausmodell

Seit Jahrzehnten werden präklinische Tiermodelle erfolgreich für die Grundlagenforschung eingesetzt, um die komplexen pathogenetischen Mechanismen von Krankheiten aufzuklären. Als Modelltiere werden vor allem Nagetiere eingesetzt, da sie klein, einfach im Handling sowie günstig in Anschaffung und Haltung sind.¹¹⁹ Außerdem speichern Mäuse ebenso wie Menschen überschüssige Kalorien im Fettgewebe.⁴¹ Durch den kurzen Reproduktionszyklus kann auch Forschung über mehrere Generationen verhältnismäßig einfach durchgeführt werden. Außerdem gibt es sehr viele Überschneidungen in der genetischen Ausstattung und der Entwicklung chronischer Erkrankungen zwischen Mäusen und Menschen. Dies gilt auch für die Adipositas, chronische Inflammation und viele metabolische Störungen wie DM-II,¹²⁰ nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) sowie beim Hepatozelluläres Karzinom (HCC),¹²¹ welche gut mit Mausmodellen abgebildet werden können. Für die Erforschung des Übergewichts werden hauptsächlich zwei verschiedene Arten von adipösen Mausmodellen verwendet: monogene (mutationsbasiert) und polygene Modelle (diätinduzierte Adipositas).

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem Einfluss von Adipositas vor und während der Trächtigkeit, weshalb sich für den Einsatz eines diätinduzierten adipösen Mausmodells entschieden wurde. Besonders, da sich durch mutationsbasierte Methoden (bspw. bei Knock-out-Mäusen des Agouti-Gens) zwar eine starke Übergewichtsinduktion erreichen lässt, diese Mutationen aber einerseits beim Menschen extrem selten sind und andererseits oft mit Infertilität einhergehen.¹¹⁹ Als Mausstamm wurde sich für C57BL/6N-Mäuse entschieden, die für die Adipositasforschung bereits etabliert¹²² und anfälliger für Fetteinlagerungen sind als andere Mausstämme. Mausmodelle mit Übergewichtsinduktion mittels Diät ahmen die menschliche Fettleibigkeit nach und eignen sich daher für präklinische Erforschung der Rolle der Ernährung, der Ätiologie, der Pathophysiologie und der

therapeutischen Interventionen der Adipositas.³ Dabei sind Mausmodelle notwendig, da strenge Ernährungsprotokolle bei Menschen schwer durchführbar und kontrollierbar sind, ganz abgesehen von den ethischen Bedenken, an schwangeren Frauen zu forschen. Zusammenfassend kann man also sagen, dass Mausmodelle für die Wissensakquise über die Mechanismen der Inflammation während der Trächtigkeit von unschätzbarem Wert sind.

2.6 Adipositas-induzierende Diäten

Der Einfluss der Diät während der Schwangerschaft ist eine der größten Herausforderungen bei der Erforschung von Adipositas und metabolischen Erkrankungen.³ Bewiesen ist, dass die Ernährung der Mutter auch den sich entwickelnden Embryo dauerhaft beeinflusst.⁹⁵ Um ätiologische und pathophysiologische Zusammenhänge, aber auch Behandlungsoptionen erforschen zu können, sind Modelle einer diätinduzierten Adipositas bei Nagern unerlässlich. Bisher wird Übergewicht im Mausmodell zumeist mithilfe einer Hochfettdiät (HFD) induziert.

Diese sehr etablierte Versuchsdiet zeigte sich in der Vergangenheit als kostengünstige und gute Methode zur Adipositasinduktion von Nagern und wurde bisher extensiv zur Erforschung beispielsweise für DM-II verwendet. In einer Übersichtsarbeit von *Islam und Loots* aus dem Jahre 2009 zeigt sich eine signifikante Ähnlichkeit in den Pathomechanismen des durch HFD-induziertem DM-II und der Erkrankung beim Menschen.¹²⁰ Aber auch chronische-niederschwellige Inflammation, welche die Adipositas begleitet, wird gut durch eine HFD abgebildet,¹²³ ebenso wie kardiovaskuläre Veränderungen,⁴ NASH und Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD).¹²¹

Dabei gibt es bisher jedoch kein klar definiertes Protokoll für die HFD; weshalb sich die Zusammensetzung von HFD verschiedener Anbieter zum Teil sehr stark unterscheidet.¹²⁴ Deshalb lag bisher der Fokus der Forschung vor allem auf dem unterschiedlichen Fettgehalt verschiedener Futterarten sowie dem Ursprung dieses Fettes. *Stanley et al.* beschreiben in ihrer Studie „*Dietary fat and heart failure: moving from lipotoxicity to lipoprotection*“ aus dem Jahr 2012, dass vor allem der Fettgehalt sowie die Fettart für die Entscheidung zwischen Schutz und Pathologie relevant ist.¹²⁵ Eine Reihe an verschiedenen Fettlieferanten wurde bisher in Mausfutter verwendet, z.B. Kokosnussöl, Palmöl, Schmalz oder Milchfett.⁴⁶

Diäten mit hohem Anteil an gFS sind fettleibigkeitsfördernder als solche mit einfach- und mehrfach ugFS, da die gFS ineffizient zur Energiegewinnung sind und daher leichter gespeichert werden. In einem Tierversuch mit weiblichen Ratten konnten *Hariri et al.* nachweisen, dass eine Fütterung mit einer butterreichen Diät mit hohem Anteil an gFS zu einer höheren Gewichtszunahme, einem höheren Endgewicht sowie einer höheren Energieaufnahme im Vergleich zu einer raps- oder schmalzbasierten Ernährung führt. Sie schlossen daraus, dass eine butterreiche Fütterungsweise mit einem hohen Anteil an gFS zur Entwicklung von Fettleibigkeit führt, wobei die Adaptation von Nahrungsaufnahme an die Energiedichte ausblieb.¹²⁶ Ein Grund für die ausbleibende Adaptation an die energiedichtete Nahrung könnte die Schmackhaftigkeit einer butterbasierten Ernährung sein, die sowohl beim Menschen als auch bei der Maus zu einer intentionalen Hyperphagie führt.¹²⁷

Der hochkalorische Ernährungsstil, der in den entwickelten Ländern beim Menschen zu Übergewicht führt, ist jedoch nicht nur durch die Überernährung mit Fett charakterisiert, sondern auch durch pathologische Konzentrationen an Mono- und Disacchariden. Er führt also zu einem kombinierten Überangebot an Fett und Zucker.^{128,129} Eine prospektive Studie aus dem Jahr 2011 zeigt eine Gewichtszunahme bei Zunahme des Konsums von verarbeiteten Lebensmitteln und zuckerhaltigen Getränken in den USA.¹²⁹

Auch die WHO sieht als Hauptursache von Übergewicht die Zunahme von energiedichter Nahrung mit hohem Fett- und Zuckeranteil.^{2,5,130} Dieser Ernährungsstil wird durch die Western-Style-Diät (WSD) im Tierversuch abgebildet.

Tierversuche zeigen, dass die Kombination aus Nahrung mit hohem Fett- und Zuckergehalt den ungesündesten Phänotyp mit den gravierendsten Symptomen und Einschränkungen erzeugt.¹²⁷ Im Versuch mit männlichen Mäusen zeigte die Kombination aus fett- und fruktosereicher Nahrung verglichen mit lediglich fettreicher Nahrung die stärkste Gewichtszunahme, mehr abdominelle Fetteinlagerung, stärkere Hyperglykämie und Hyperinsulinämie bei den Versuchstieren.^{3,127,131} Ebenfalls im Versuch mit männlichen C57BL/6-Mäusen zeigte sich bei einer hohen zucker- und butterhaltigen Ernährung eine höhere Gewichtszunahme, ein höherer Serumglukoselevel nach Fasten, höhere Cholesterin- und Triglyceridwerte, eine Hyperleptinämie, eine Hyperresistinämie sowie reduzierte Adiponektin-Level im Blut im Vergleich zu einer reinen Hochfettdiät.^{127,131} Sowohl bei nicht-schwangeren

Mäusen,^{132,133} als auch bei schwangeren Weibchen¹³¹ konnten Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Hyperleptinämie, Hypercholesterinämie sowie eine erhöhte Glukoseresistenz im letzten Trächtigkeitsdrittel unter WSD festgestellt werden. Auch der Proteingehalt des WAT war niedriger bei den WSD-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.¹³¹

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine langfristige Fütterung mit WSD zu einer Hochregulierung von Inflammationsmarkern im Fettgewebe wie beispielsweise TNF- α führt.¹³⁴ Eindeutig ist eine WSD also geeignet um die metabolischen und inflammatorischen Veränderungen, die im Rahmen einer Adipositas auftreten, zu triggern und somit für die weitere Erforschung der Erkrankung nachzubilden.

Ein Versuch mit männlichen Ratten, die entweder eine Hochfett-, Hochzucker- oder Kontrolldiät erhielten, zeigte, dass Fettansammlung und Gewichtszunahme durch die fettreiche Komponente der westlichen Ernährungsweise beeinflusst werden, während Insulinresistenz und die Serumtriglyceride eher durch einen hohen Fruktosegehalt in der Ernährung beeinflusst werden.¹³⁵

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Fütterung der genutzten Diät ad libitum sowie eine Haltungsart mit Hell-Dunkel-Zyklus zu einer langsamen und kontinuierlichen Entstehung des Übergewichts führt, korrespondierend zum menschlichen Pathomechanismus.³ Dennoch ist ein Monitoring der aufgenommenen Futtermenge wichtig, um ein dadurch hervorgerufen Bias in den Ergebnissen zu erkennen.⁴⁶

2.7 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Um die genaue Ursache der zahlreichen Veränderungen, die durch Übergewicht während der Schwangerschaft verursacht werden, zu verstehen, wurde auf diesem Gebiet in den letzten Jahren viel geforscht. Dabei lag der Fokus bisher zumeist auf dem Einfluss auf die Plazenta, welche das direkte Bindeglied zwischen Mutter und Fetus darstellt. Hier steht jedoch vor allem das Fettgewebe im Mittelpunkt der Forschungsarbeit.

Bisher gibt es keine festdefinierte Diät für die Induktion von Adipositas im Mausmodell während der Trächtigkeit.³ Dieser Mangel an Uniformität in der Diätzusammensetzung, um den übergewichtigen Phänotyp zu erreichen, beeinflusst die Ergebnisse und damit die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Forschungsgruppen.⁴⁶ Bisher gibt es kaum Untersuchungen, welche Diät zur Erforschung des Fettgewebes und insbesondere der Inflammationsmarker und des oxidativen Stresses besonders geeignet ist. Nur mit fest definierten Standard-, Interventions- und Kontrolldiäten, die die Ernährung des Menschen bestmöglich nachbilden, kann auch die Übertragbarkeit auf den Menschen verbessert werden.

Große Vergleichsstudien zwischen verschiedenen Diäten zur Adipositasinduktion bei Mäusen fehlen bisher. Deshalb soll mit Hilfe dieser Arbeit ein Vergleich zwischen der bisher häufig eingesetzten Hochfett-Diät (HFD), Diäten mit hohem Fett- und Zuckergehalt (DIO und WSD) gegen die bisher normalerweise als Kontrolle verwendete Standard-Diät (SD) und eine weitere, streng definierte Kontrolldiät (CO) mit geringem Fett- und Zuckergehalt erfolgen; eine wichtige Grundlage, um die Bedingungen der Adipositas im Mausmodell an die Realität anzunähern.

Deshalb soll in dieser Arbeit ein Vergleich von fünf dieser verschiedenen Versuchsdiäten bei trächtigen Mäusen erfolgen. Folgende Fragestellungen sollen untersucht werden:

1. Gibt es Unterschiede im Körpergewicht, viszeraler WAT-Akkumulation und -Morphologie zwischen den fünf verschiedenen Versuchsgruppen SD, CO, HFD, DIO und WSD?
2. Zeigen sich Unterschiede auf globaler Proteinebene zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen im WAT?
3. Wie wirken sich die verschiedenen Versuchsdiäten auf Inflammations- und oxidative Stressmarker im WAT der weiblichen Mäuse aus?
4. Wie unterscheiden sich die fünf Versuchsgruppen im Blut-Fettsäureprofil?
5. Ist die CO eine bessere und praktikablere Kontrolldiät als die SD?

Insgesamt soll einerseits diskutiert werden, ob die WSD, DIO oder HFD als Interventionsdiäten eingesetzt werden sollten und andererseits ob eher CO oder SD als Kontrolldiät in Frage kommen. Ziel ist eine Verwendung in zukünftigen Forschungen, primär in unserer Forschungsgruppe und sekundär aber auch in der Gemeinschaft der Adipositasforschenden.

3 Material und Methoden

Im Folgenden werden zunächst die verwendeten Materialien aufgelistet und danach der Ablauf des Tierversuches beschrieben. Im Anschluss erfolgt die Beschreibung der histologischen und molekularbiologischen Methoden, der μ -Computertomografie (μ CT), der Proteomic- und Lipidomic-Screens, sowie der gesamten statistischen Auswertung.

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 1: Chemikalien und Enzyme in Reihenfolge nach Vorkommen im Text

Chemikalie / Enzym	Hersteller	Verwendung
Phosphat-gepuffertes Formaldehyd (PFA) Roti®-Histofix 4 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie
Isopropanol (2-Propanol) ≥ 99,95 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie, RNA-Isolation
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie
Neo-Clear®	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Histologie
Neo-Mount®	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Histologie
Ethanol vergällt ≥ 99,8 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Histologie
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Proteomics
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Proteomics
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics
Desoxycholsäure Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Proteomics
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics
Aprotinin, from bovine lung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics
Pepstatin A, ≥ 75 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics

Leupeptin, ≥ 90 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), ≥ 98.5 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics
Sodiumfluorid, NaF, ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics
Sodiumorthovanadat, Na ₃ VO ₄ , ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Proteomics
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz	Proteomics
Triethylammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics
Urea, ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	Proteomics
2-Chloracetamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics
Trypsin (1 µg/µl)	Serva, Heidelberg, Deutschland	Proteomics
Lysyl EndopeptidaseR (Lys-C)	WAKO, Neuss, Deutschland	Proteomics
Ameisensäure, puriss. p.a., ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	Proteomics
Water with 0.1 % Formic Acid (v/v), Optima LC/MS Grade (Puffer A)	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Proteomics
Acetonitril, 80 %, 20 % Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Optima LC/MS (Puffer B)	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Proteomics
Methanol, ≥99.8 %	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA	Proteomics
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland	RNA-Isolation
TRI-Reagent®	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	RNA-Isolation
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland	RNA-Isolation
DEPC (Diethylpyrocarbonat) ≥ 97 %	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	Mannheim, Mannheim, Deutschland	cDNA-Synthese
M-MLV RT 5X Buffer	Promega, Mannheim, Deutschland	Mannheim, Mannheim, Deutschland	cDNA-Synthese
RNasin® Ribonuclease Inhibitors (40 U/μl)	Promega, Mannheim, Deutschland	Mannheim, Mannheim, Deutschland	cDNA-Synthese
Platinum® qPCR SuperMix-UDG mit ROX	Invitrogen, Massachusetts, USA	Waltham, Waltham, Massachusetts, USA	RT-qPCR
HPLC-Wasser Water for chromatography LiChrosolv®	Merck, Mannheim, Deutschland	Darmstadt, Darmstadt, Deutschland	RT-qPCR
Myristinsäure-d ₂₇	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	St. Louis, St. Louis, Missouri, USA	Lipidomics
Chloroform	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	St. Louis, St. Louis, Missouri, USA	Lipidomics
Methanol, mit 250 ppm (entspricht 0,025 %)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	St. Louis, St. Louis, Missouri, USA	Lipidomics
HCl	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	St. Louis, St. Louis, Missouri, USA	Lipidomics
Hexan	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	St. Louis, St. Louis, Missouri, USA	Lipidomics

3.1.2 Stammlösungen und Puffer

Tabelle 2: Stammlösungen und Puffer

Alle Puffer wurden mit MilliQ Wasser angesetzt.

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

	Na ₃ VO ₄	1	mM
Urea-Puffer	Urea	8	M
	TEAB	50	mM

3.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 3: (Oligo-)Nukleotide für die cDNA-Synthese

(Oligo-)Nukleotid	Hersteller
Primer „random“ (11034731001)	Roche, Basel, Schweiz
Oligo(dT) Primer (16 x Thymin)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 4: Oligonukleotide für die RT-qPCR

Alle hier aufgelisteten, für die RT-qPCR verwendeten Oligonukleotide stammen vom Hersteller Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland).

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Referenz
IL-6 for	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT	136
IL-6 rev	AATCAGAATTGCCATTGCACAA	
IL-6 probe	TCTTTTCTCATTTCACGATTTCCCAGAGAA	
TNF-α for	GGCTGCCCCGACTACGT	136
TNF-α rev	GACTTTCTCCTGGTATGAGATAGCAA	
TNF-α probe	CCTCACCCACACCGTCAGCCG	
IL-1α for	TCGGGAGGAGACGACTCTAAATA	137
IL-1α rev	TGGCAACTCCTTCAGCAACA	
IL-1α taq	TCAGATTCACAACCTGTTTCGTGAGCGCTC	
IL-1β for	TGACAGTGATGAGAATGACCTGTTC	137
IL-1β rev	GGACAGCCCAGGTCAAAGG	
IL-1β taq	ACCCCAAAGATGAAGGGCTGCTTCC	
CXCL1 for	AGACCATGGCTGGGATTCAC	137
CXCL1 rev	AGCCTCGCGACCATTCTTG	
CXCL1 taq	CTGCACCCAAACCGAAGTCATAGCCAC	
CXCL10 for	CATCCCTGCGAGCCTATCC	137
CXCL10 rev	CCCTTTTAGACCTTTTTTGGCTAA	
CXCL10 taq	CCCACGTGTTGAGATCATTGCCACG	
CYB-A for	CGTCTGGCCTGATTCTCATCA	137
CYB-A rev	GATAGAGTAGGCGCCGAAATACC	
CYB-A taq	CATCGTGGCTACTGCTGGACGTTTCAC	
CYB-B for	CCCAACTGGGATAACGAGTTCA	137
CYB-B rev	TCAGGGCCACACAGGAAAAC	
CYB-B taq	ACCATTGCAAGTGAACACCCTAACACCACA	

NCF1 for	CACCTTCATTGCGCCATATTGC	137
NCF1 rev	ACAGGTCCTGCCACTTAACCA	
NCF1 taq	CATCCCCAGCCAGCACTATGTGTACATGT	
NCF2 for	CCGATATTCCACCACCTCCTAA	137
NCF2 rev	CATAGGCACGCTGAGCTTCA	
NCF2 taq	TCACCAGGTCACAAGCAAAAAGAGCCC	
NOX4 for	GAAGGTCCCTAGCAGGAGAACA	137
NOX4 rev	ACTGAAAAGTTGAGGGCATTAC	
NOX4 taq	TCTCAGGTGTGCATGTAGCCGCCC	
SOD1 for	GTACCAGTGCAGGACCTCATTTTA	137
SOD1 rev	GTCTCCAACATGCCTCTCTTCAT	
SOD1 taq	CTCACTCTAAGAAACATGGTGGCCCGG	
GPX1 for	GACACCAGGAGAATGGCAAGA	137
GPX1 rev	TTCTCACCATTCACTTCGCACTT	
GPX1 taq	TGAATCCCTCAAGTACGTCCGACCTGG	
CAT for	CCATCCTTTATCCATAGCCAGAA	137
CAT rev	GAATCCCTCGGTCACTGAACAA	
CAT taq	TCGTCCCGAGTCTCTCCATCAGGTTTCT	
18S for	AGATCCCAGACTGGTTCCTG	138
18S rev	TTGTTGTCTAGACCGTTGGC	
18S taq	CAGAACCTGGCTGTACTTCCCATCC	
β -Actin 5	TGACAGGATGCAGAAGGAGATTACT	139
β -Actin 3	GCCACCGATCCACACAGAGT	
β -Actin Sonde	ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC	
HPRT 5	TGGCCATCTGCCTAGTAAAGCT	139
HPRT 3	TAGGCTCATAGTGCAAATCAAAGTC	
HPRT Sonde	TTTTTAGAAATGTCAGTTGCTGCGTCCCC	
GUSB 5	CGCTGAGAGTAATCGGAAACAA	139
GUSB 3	CGCAAATAAAGGCCGAAGT	
GUSB Sonde	ATCTTCACTCGCCAGAGACAGCCCA	
GAPDH for	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA	139, 140
GAPDH rev	TGCCTGCTTCACCACCTTCT	
GAPDH Sonde	CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	

3.1.4 Geräte

Tabelle 5: Geräte

Gerät	Hersteller	Verwendung
SkyScan 1176	Bruker, Kontich, Belgien	μ CT
Vortex-Mixer V-1 Plus	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland	Allgemeine Arbeiten
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
Auflichtmikroskop BX43	Olympus, Hamburg, Deutschland	Histologie
Sonifizierer SONOPULS® HD 2070	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland	Proteomics
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Proteomics
Bioruptor®	Diagenode, Ougrée, Belgien	Proteomics
Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Proteomics
Eppendorf ThermoMixer® C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Proteomics
Q Exactive Plus Orbitrap	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Proteomics
EASY nLC	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Proteomics
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Proteomics, Lipidomics
Schwingmühle MM 400	Retsch, Haan, Deutschland	RNA-Isolation
Zentrifuge Z 216 MK	Hermle, Wehingen, Deutschland	RNA-Isolation
Nano Quant infinite M200 Pro	Tecan, Crailsheim, Deutschland	RNA-Isolation
HLC Blockthermostat TH23	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland	cDNA
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
Reacti-Therm III	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Lipidomics
7693 Autosampler	Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA	Lipidomics
1890A GC-System	Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA	Lipidomics
5975 Inert XL EI/CI MSD	Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA	Lipidomics

3.1.5 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

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

3.1.6 Software

Tabelle 7: Software & Datenbanken

Name	Hersteller / Entwickler	Verwendung
NRecon	Bruker, Kontich, Belgien	µCT
CTAn	Bruker, Kontich, Belgien	µCT
CTVox	Bruker, Kontich, Belgien	µCT
QuPath, Version 0.2.0 m2	University of Edinburgh, Edinburgh, Großbritannien ¹⁴¹	Histologie
Aperio ImageScope	Leica, Wetzlar, Deutschland	Histologie
Random.org	Randomness and Integrity Services, Dublin, Irland	Histologie
ImageJ Fiji	Curtis Rueden u.a. ¹⁴²	Histologie
Adiposoft 1.16	CIMA, Universidad de Navarra, Pamplona, Spanien ¹⁴³	Histologie
MaxQuant 1.5.3.8	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland	Proteomics

Uniprot MOUSE.fasta (Stand 16.6.2017)	UniProt Consortium	Proteomics
Perseus 1.6.1.1	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland	Proteomics
FunRich 3.1.3	http://funrich.org/ ¹⁴⁴	Proteomics
STRING Database 11.0	https://string-db.org/ ¹⁴⁵	Proteomics
PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System 15.0	http://pantherdb.org/about.jsp ¹⁴⁶	Proteomics
UniProt	https://www.uniprot.org ¹⁴⁷	Proteomics
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	Lipidomics
NIST 08 MS Library	NIST, Gaithersburg, Maryland, USA https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a	Lipidomics
R 3.61	R Core Team, Wien, Österreich ¹⁴⁸	Lipidomics
R Studio 1.2.1335	RStudio, Boston, Massachusetts, USA ¹⁴⁹	Lipidomics
Metab	Raphael Aggio et al. ¹⁵⁰	Lipidomics
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA	Statistische Auswertung
Microsoft Excel	Microsoft, München, Deutschland	allgemeine Arbeiten

3.2 Tierversuche

Für diese Forschungsarbeit fanden Tierversuche mit C57BL/6N Wildtyp-Mäusen statt. Dabei erhielten weibliche Mäuse ab einem Alter von drei Wochen bis zum Ende des Experiments jeweils eine von fünf verschiedenen Versuchsdäten. Diese wurden durchgehend auch während der Verpaarung und Trächtigkeit bis zur Sectio am Gestationstag (G) 15,5 verfüttert. Auf die genaueren Bedingungen und die Futterzusammensetzung wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

3.2.1 Allgemeine Beschreibung

In Vorbereitung für dieses Forschungsprojekt fanden Tierversuche mit Wildtyp-Mäusen (C57BL/6N, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) statt. Diese wurden im dezentralen Tierhaltungsnetzwerk in den Tierställen der Pharmakologie der Universitätsklinik Köln (Köln, Deutschland) gehalten. Alle Maßnahmen wurden nach deutschem Recht und den gesetzlichen Vorgaben, sowie den Richtlinien des Tierhaltungsnetzwerks der Universität zu Köln konform, durchgeführt. Die Tierversuche wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (Aktenzeichen 84-02.04.2016.A046).

3.2.2 Haltung, Verpaarung, Futter- und Wasseraufnahme

Die weiblichen Mäuse, welche bei Lieferung drei Wochen alt waren, wurden in Gruppen von maximal drei Tieren in individuell belüfteten Käfigen (IVCs Blue Line, Tecniplast, Italien), bei Temperaturen von $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von 50 – 60 % sowie einem Zyklus von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit gehalten. Futter und Trinkwasser waren jederzeit frei verfügbar. Die Männchen, welche im Alter von 8 Wochen geliefert wurden, wurden zunächst in Gruppen zu maximal fünf Tieren pro Käfig unter ansonsten gleichen Bedingungen gehalten. Eine Einzelhaltung der Männchen fand erst nach ihrem ersten Einsatz zur Verpaarung statt. Alle Männchen erhielten (bis auf die Zeit während der Verpaarung) die Standarddiät (SD, siehe Kapitel 3.2.3).

Um bei den späteren Muttertieren den Einfluss verschiedener Diäten vor und während der Schwangerschaft zu ermitteln, erhielten die weiblichen Mäuse ab einem Alter von drei Wochen jeweils eine von fünf randomisiert zugeteilten Diäten. Dabei

wurden die Diäten vor allem aufgrund ihres unterschiedlichen Gehaltes an Zucker (besonders in Form von Mono- und Disacchariden) und Fett ausgewählt. Eine Übersicht über die Versuchsdiäten, eine genaue Beschreibung sowie deren Zusammensetzung ist in Kapitel 3.2.3 zu finden. Dabei wurde während der Gestationszeit die Aufnahme von Futter- und Wasser mittels spezieller Futterraufen und Trinkflaschen gemessen. Täglich wurde den Tieren eine definierte Menge an Futter bzw. Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt. Nach 24 Stunden wurden Futterraufen und Trinkflaschen gewogen und somit die konsumierte Menge der letzten 24-Stunden berechnet. Die Daten wurden ab der Verpaarung (G0) bis zur Sectio an G15,5 aufgezeichnet.

Bis zur Verpaarung wurde wöchentlich das Gewicht der weiblichen Tiere kontrolliert und dokumentiert. Die jeweils zugeteilte Versuchsdiät wurde durchgehend verfüttert, auch während und nach der Verpaarung im Alter von 12 bis 16 Lebenswochen mit gesunden, normalgewichtigen Männchen. Zur Verpaarung wurden die Weibchen einzeln über Nacht (etwa 20 h) zu einem Böckchen gesetzt. Der Tag nach der Verpaarung wurde als G 0,5 festgelegt.

3.2.3 Versuchsdiäten

Wie im vorherigen Abschnitt (Kapitel 3.2.2) beschrieben, wurde den Tieren je eine von fünf verschiedenen Diäten verfüttert. Eine Gruppe erhielt eine Standard-Diät (SD, Ssniff, Soest, Deutschland, Bestellnummer: R/M-H), die bisher als einzige Kontrolldiät eingesetzt wurde. Dabei handelt es sich um eine häufig verwendete Haltungsdiet, die viele Fasern und Ballaststoffe enthält. Um Adipositas zu induzieren, erhielten drei andere Gruppen entweder eine reine Hochfett-Diät (HFD, Altromin, Lage, Deutschland, Bestellnummer: modified C1057), deren Kalorienmenge zu 60 % aus Fett stammt, oder eine der beiden Hochfett-/Hochzucker-Diäten Übergewichtinduzierende Diät (DIO, DIO-45kJ % fat (Lard), Ssniff, Soest, Deutschland, Bestellnummer: E15744-344) oder westliche Diät (WSD, Western diet-butter fat, Ssniff, Soest, Deutschland, Bestellnummer: E15775-34), die beide sowohl fettreich sind (DIO: 45 %, WSD: 43 % der Kalorienmenge aus Fett), als auch viel Mono- und Disaccharide enthalten (DIO: 21,10 %, WSD 34,40 % der Kalorienmenge aus Zucker). Des Weiteren erhielt eine Gruppe eine Kontroll-Diät (CO, Control to

Western Diet, Ssniff, Soest, Deutschland, Bestellnummer: E15720-04), die vor allem Kohlenhydrate enthielt und das offizielle Kontrollfutter zur WSD darstellt.

In Abbildung 1 ist die tatsächliche Futtermorphologie dargestellt. An der jeweiligen Einfärbung orientiert sich die Farbcodierung der verschiedenen Versuchsgruppen in dieser Doktorarbeit: SD wird rosa, CO grün, HFD orange, DIO rot und WSD gelb dargestellt.



Abbildung 1: Morphologie des Futters

Dargestellt ist das Aussehen der fünf verschiedenen Futterarten, die den weiblichen Mäusen ab einem Alter von drei Wochen durchgehend, auch während der Trächtigkeit bis zum Ende des Tierversuchs verfüttert wurden. Die Futterfarbe wird in der vorliegenden Arbeit als Orientierung für die Codierung der fünf Versuchsgruppen verwendet.

SD = Standarddiät, CO = Kontroll-Diät, HFD = Hochfett-Diät, DIO = übergewichtsinduzierende Diät, WSD = westliche Diät

Die hier als Kontrolle eingesetzte SD und die zur Übergewichtsinduktion eingesetzte HFD sind die aktuell verwendeten Standardfuttertypen, die bei Tierversuchen an Mäusen in der AG metabolische und zerebrale Programmierung (Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother) und der AG Plazentale Störungen (Dr. rer. nat. Sarah Appel) der Uniklinik Köln, aber auch weltweit von vielen anderen Forschungsgruppen eingesetzt werden.¹²⁴ Dabei ist auffällig, dass die HFD viel Fett enthält (351 g/kg) und deswegen mit 5237 kcal/kg extrem hochkalorisch ist, allerdings mit 108 g/kg einen eher geringen Zuckeranteil aufweist.

Die dem aktuell weltweit vorherrschenden menschlichen Ernährungsmuster² angepasste Art der Ernährung wird in diesem Versuch durch die Futterarten DIO und WSD repräsentiert. Beide haben eine ähnlich hohe metabolische Energiedichte (DIO 4610 kcal/kg, WSD 4586 kcal/kg), außerdem ist ähnlich viel Fett enthalten (DIO

236 g/kg, WSD 220 g/kg). Dafür enthält die WSD-Diät zu 344 g/kg Zucker, die DIO-Diät hingegen nur 211 g/kg.

Auch das nun erprobte Kontrollfutter für die WSD, die CO-Diät, unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung von der bisher verwendeten SD. Dabei haben SD und CO von allen verwendeten Diäten die geringste absolute metabolische Energie, wobei die SD mit 3059 kcal/kg nochmal deutlich weniger Energie enthält als die CO mit 3752 kcal/kg. Dies liegt daran, dass die CO-Diät 51 g/kg Fett und 110 g/kg Zucker enthält, die SD jedoch nur 33 g/kg Fett und 53 g/kg Zucker.

Eine Übersicht über die Diäten sowie deren Zusammensetzung ist in Tabelle 8 zusammengestellt. Die einzelnen Bestandteile sind im Anhang auf Seite 187 dargestellt.

Tabelle 8: Übersicht der Futterzusammensetzung der verwendeten Versuchsdieten

Name und Abkürzung		Standard Diät (SD)	Kontrolle zur Western Diät (CO)	Hoch-Fett Diät (HFD)	Übergewichts-induzierende Diät DIO-45kJ% fat - Lard (DIO)	Westliche Diät Western diet-butter fat (WSD)
Hersteller		Ssniff	Ssniff	Altromin	Ssniff	Ssniff
Bestellnummer		R/M-H	E15720-04	modified C1057	E15744-344	E15775-34
Bedeutung		Bisher verwendetes Haltungsfutter	Neues Kontrollfutter	Bisherige Hochfett Diät	Neue Hochfett-/Hochzucker-Diät	Neue Hochfett-/Hochzucker-Diät
	Einheit					
Metabolisierbare Energie	Kcal/kg	3225,0	3752,4	5237,0	4610,0	4586,0
	MJ/kg	13,5	15,7	22,2	19,3	19,2
davon						
Fett	kJ%	9,0	13,0	60,0	45,0	43,0
Protein	kJ%	33,0	18,0	16,0	20,0	15,0
Kohlenhydrate	kJ%	58,0	69,0	24,0	35,0	42,0
Protein	g/kg	190,0	173,0	204,0	220,0	173,0
Fett	g/kg	33,0	51,0	351,0	236,0	220,0
NfE	g/kg	542,0	647,0	256,0	400,0	483,0
Zucker	g/kg	53,0	110,0	108,0	211,0	344,0
Rohnährstoffe						
Rohprotein	%	19,0	17,3	20,4	22,0	17,3
Rohfett	%	3,3	5,1	35,1	23,6	22,0
Rohfaser	%	4,9	5,0	0,4	5,7	5,6
Rohasche	%	6,4	3,9	6,1	5,3	4,2
Stärke	%	36,5	38,5	14,8	6,8	4,8
Zucker	%	4,7	11,0	10,8	21,1	34,4

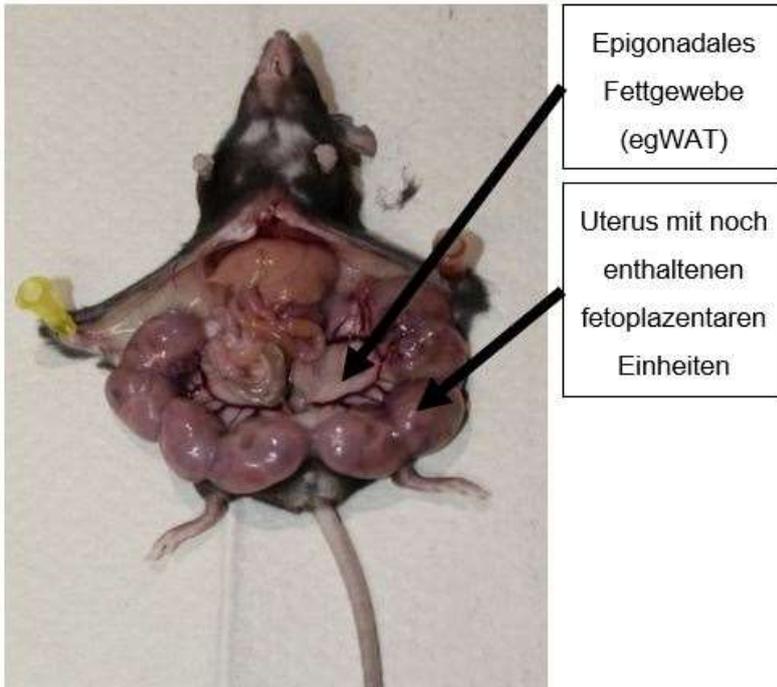
3.2.4 Präparation der Mäuse

Die zuvor festgelegte Diät wurde während der Trächtigkeit bis zur Sectio caesarea an G15,5 verfüttert. Dieser Zeitpunkt entspricht der Mitte des letzten Trächtigkeitsdrittels der Mäuse. An diesem Tag wurde den tragenden Muttertieren 30 Minuten (min) vor der Sectio Buprenorphin (0,1 mg/kg Körpergewicht, subkutane Injektion, Bayer-Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) injiziert, um vor allem mögliche Schmerzen bei den Feten zu vermeiden. Anschließend wurden die Tiere mittels CO₂-Inhalation euthanasiert und eine Sectio caesarea durchgeführt. Im Rahmen der Präparation wurden verschiedene Parameter bestimmt, für dieses Projekt waren dies: Gewicht und Körperlänge des Muttertieres, die Gesamtanzahl an Feten sowie die Anzahl an toten und resorbierten Feten, außerdem das Gewicht des entnommenen epigonadalen Fettgewebes. Es erfolgte die Präparation von epigonadalem Fettgewebe (egWAT, siehe Abbildung 2 A), subkutanem Fettgewebe (scWAT, siehe Abbildung 2 B) und die Entnahme von Vollblut aus dem Herzen.

Der Großteil der entnommenen Fettgewebsproben wurde für spätere Analysen nativ in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Andere Teile der Fettgewebsproben wurden in 4 % Formalin fixiert, anschließend in Isopropanol überführt und nach einer Entwässerungsreihe in Paraffin gegossen. Das gewonnene Blut wurde nach 30 Minuten Inkubationszeit bei RT für 10 Minuten bei 3000 g und 4°C abgesert und nur das Serum bei -80°C asserviert.

Einige tragende Muttertiere wurden nicht an G15,5 euthanasiert, sondern konnten spontan werfen. Dadurch konnten phänotypische Daten der Nachkommen bestimmt werden, unter anderem die Rate an Lebendgeborenen sowie deren Überlebensrate in den Tagen nach der Geburt. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

A



Subkutanes Fettgewebe
(scWAT)

B



Abbildung 2: Präparationssitus einer tragenden Maus

Für diesen Versuch erhielten weibliche C57BL/6N Wildtyp-Mäusen ab einem Alter von 3 Wochen eine von 5 verschiedenen Diäten und wurden ca. 9-13 Wochen später verpaart. Am 15,5. Gestationstag wurden die meisten tragenden Tiere euthanasiert und zunächst phänotypische Daten bestimmt. Dann erfolgte die Präparation, in deren Rahmen eine Sectio caesarea sowie die Entnahme von egWAT, scWAT und Vollblut aus dem Herzen durchgeführt wurde.

A Zu sehen ist der Präparationssitus mit Markierung des egWAT und des Uterus mit enthaltenen fetoplazentaren Einheiten.

B Gezeigt ist der Situs nach Entnahme der fetoplazentaren Einheiten. Mit der Pinzette angehoben wird das Peritoneum, der Pfeil markiert das scWAT kurz vor der Entnahme

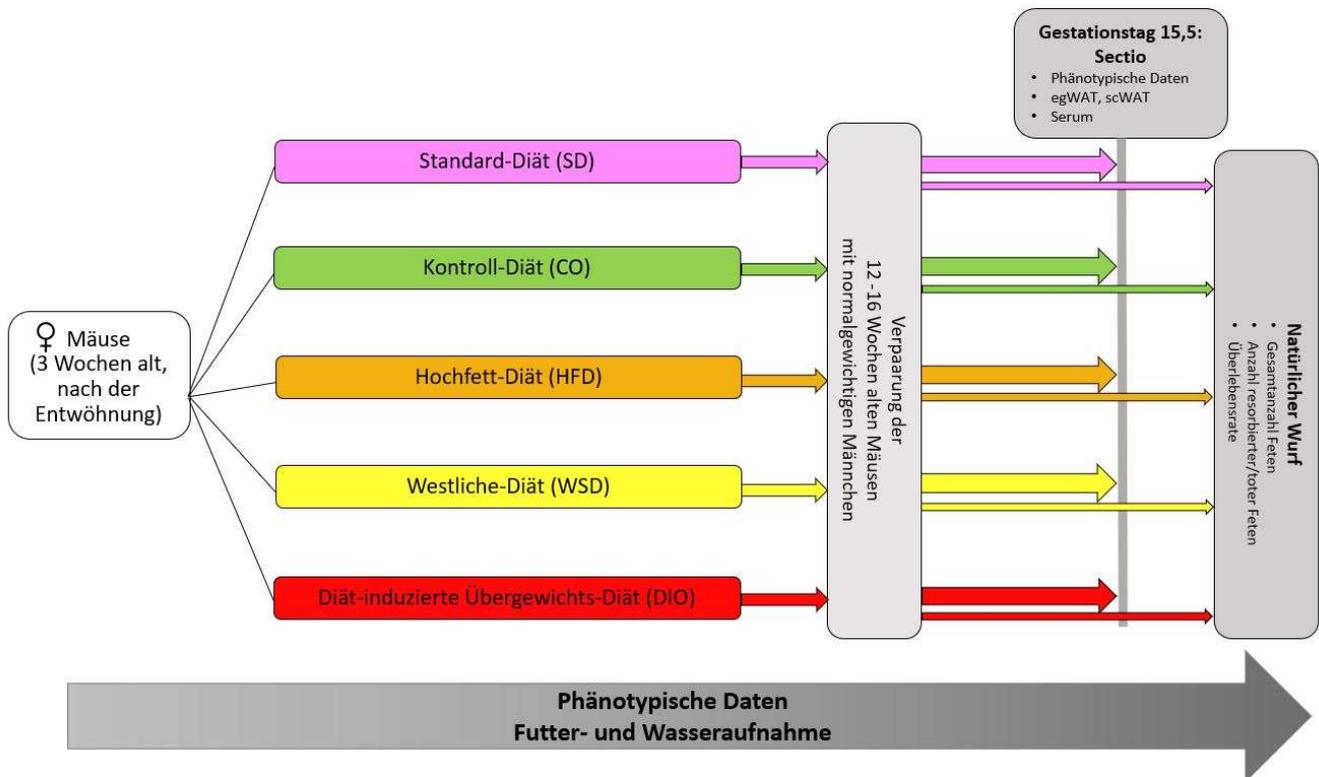


Abbildung 3: Aufbau des Tierversuchs

Weibliche C57BL/6N Wildtyp-Mäusen erhielten ab einem Alter von 3 Wochen eine von fünf verschiedenen Diäten. Im Alter von 12 bis 16 Wochen wurden sie verpaart und bei den meisten tragenden Tieren an G15,5 eine Sectio caesarea vorgenommen. In diesem Rahmen wurden phänotypische Daten bestimmt, epigonadales (egWAT) und subcutanes Fettgewebe (scWAT) sowie Vollblut aus dem Herzen entnommen. Es wurden außerdem die Gesamtanzahl der Feten sowie die Anzahl der resorbierten und toten Feten bestimmt. Einige Weibchen konnten auch natürlich werfen, um die Nachkommen weiter zu untersuchen um u.a. die Überlebensrate zu bestimmen. Pro Gruppe wurde bei jeweils 5 Weibchen, die während des Versuchs nicht tragend wurden, ein μ CT durchgeführt.

Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurden bei allen Tieren Futter- und Wasseraufnahme sowie das Gewicht der weiblichen Tiere bestimmt.

In die weiteren Untersuchungen wurden ausschließlich Tiere eingeschlossen, die bei Verfütterung der SD- oder CO-Diät zum Zeitpunkt der Verpaarung unter 23,5 g wogen. Tiere, die HFD erhielten und bei der Verpaarung mindestens 23 g wogen, wurden ebenfalls eingeschlossen. Da die Übergewichtsinduktion mit DIO und WSD zum Zeitpunkt der Studie noch nicht etabliert war, wurden Tiere, die diese Diäten erhalten hatten, schon ab einem Gewicht von über 20 g zum Zeitpunkt der Verpaarung in die vorliegende Untersuchung eingeschlossen.

3.3 Methoden

Die ab hier beschriebenen Methoden wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, vollumfänglich von mir durchgeführt.

3.3.1 Histologie

Um die entnommenen Gewebe zu untersuchen, wurden zunächst 5 µm dicke Paraffin-Schnitte der Gewebeproben angefertigt, die anschließend mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefärbt wurden, um sie unter einem Lichtmikroskop untersuchen zu können. Danach wurden ausgewählte Schnitte im Slide-Scanner eingescannt und mittels der Programme *QuPath* und *Adiposoft* ausgewertet.

3.3.1.1 Vorbereitungen und Anfertigung der Schnitte

Wie bereits in Kapitel 3.2.4 beschrieben, wurden im Rahmen der Präparation egWAT sowie scWAT entnommen. Um die natürliche Struktur des Gewebes zu erhalten, wurden sie in Formalin fixiert. Dafür wurden die Gewebe direkt nach Entnahme in 4 %-Roti®-Histofix gegeben, in der sie für die Fixierung bei 4°C für 24 h verblieben. Es folgte die Lagerung des Gewebes über Nacht in 70 %igem Isopropanol. Am nächsten Tag konnte das Gewebe mit Hilfe des Gewebeinfiltrationsautomaten ASP 300S (Leica, Wetzlar, Deutschland) und der Paraffinausgießstation EG1150 H (Leica, Wetzlar, Deutschland) in Paraffin eingebettet werden.

Für die nun folgende morphologische Untersuchung des Fettgewebes mussten zunächst 5 µm dicke Schnitte der in Paraffinblöcke eingebetteten Gewebe angefertigt werden. Zur besseren Handhabbarkeit des Gewebes wurde es zuvor über Nacht bei -20°C im Gefrierschrank gekühlt. Um die Temperatur des Paraffinblocks weiterhin niedrig zu halten, wurde eine -5°C kalte Kühlplatte (Leica EG1150 C, Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet, auf der die Blöcke bis zur Verarbeitung verblieben. Nach dem Einspannen des Blocks in der Halterung des Rotationsmikrotoms (Rotationsmikrotom RM2255, Leica, Wetzlar, Deutschland) konnten 5 µm dünne Schnitte angefertigt werden. Diese wurden mit dünnen Pinseln von der Mikrotomklinge (R35, pfm medical ag, Köln, Deutschland) abgenommen und in einem Heißwasserbad aufgefangen. Die Temperatur von 45-55°C sorgte dafür, dass sich die Schnitte streckten und so vorsichtig auf Objektträger gezogen werden konnten.

Auf einen Adhäsionsobjektträger (SuperFrost Plus, Thermo Scientific, Waltham, USA) konnten auf diese Art drei bis vier Schnitte längs hintereinander aufgezogen werden. Diese Objektträger lagerten dann zum Trocknen mindestens für eine Nacht bei 37°C im Trockenschrank.

Es wurde darauf geachtet, Schnitte aus unterschiedlichen Gebieten des Gewebes zu verwenden und ausreichend Platz zwischen den einzelnen aufgezogenen Schnitten zu lassen, um insgesamt repräsentative Fettzellen für das gesamte Gewebe darzustellen. Dafür wurden zwischen je zwei aufgezogenen Schnitten mindestens drei Schnitte verworfen. Außerdem mussten alle beschädigten oder nicht optimal auf den Objektträger gezogenen Schnitte verworfen werden. Nach dem Trocknen wurden verschiedene Schnitte pro Fettgewebstyp (scWAT und egWAT) und Tier für die darauffolgende Färbung ausgewählt. Dabei entscheidend waren die Unversehrtheit des Schnittes sowie ein ausreichender Abstand zu den anderen ausgewählten Schnitten. Bei fraglicher Eignung der Schnitte mussten die Objektträger mit einem Auflichtmikroskop (Olympus BX43, Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland) begutachtet werden, um anschließend zu entscheiden, ob sie verwendet werden konnten.

3.3.1.2 Färbung

Die so ausgewählten Schnitte wurden anschließend mittels HE-Färbung gefärbt, um die Morphologie beurteilen zu können. Dafür musste zunächst saure Hämalaunlösung nach Mayer gefiltert werden. Eosinlösung G 0,5 % wurde ebenfalls gefiltert und anschließend mit einem Tropfen Eisessig pro 100 ml Lösung versetzt. Nach diesen Vorbereitungsmaßnahmen erfolgte das Entparaffinieren. Dazu kamen die Objektträger zunächst dreimal für jeweils 20 Minuten in Neoclear®. Anschließend folgte eine absteigende Alkoholreihe von 100 %, über 96 %, 80 % bis 70 % Ethanol für jeweils eine Minute.

Danach erfolgte eine Waschung in destilliertem Wasser für eine Minute. Für die Färbung verblieben die Schnitte für vier bis sieben Minuten in der sauren Hämalaunlösung nach Mayer. Nach einer weiteren kurzen Waschung in destilliertem Wasser erfolgte das Bläuen in kaltem Leitungswasser durch eine pH-Wert-Verschiebung für fünf Minuten. Nach einer erneuten kurzen Waschung in destilliertem Wasser verblieben die Schnitte für zwei Minuten in Eosin G 0,5 %-Lösung, um anschließend zweimal kurz in destilliertem Wasser gewaschen zu

werden. Zum Entwässern wurden die Objektträger nun in eine aufsteigende Alkoholreihe von 70 %-, 80 %-, 96 %- und 100 %-igem Ethanol für jeweils eine Minute getaucht, um abschließend zwei Mal für jeweils fünf Minuten in Neoclear® zu verweilen. Die noch feuchten Präparate wurden mit einem Tropfen mit Neomount® benetzt und vorsichtig Deckgläschen (VWR International, Darmstadt, Deutschland) aufgelegt. Eventuell noch verbleibende Luftbläschen wurden vorsichtig mit der Spitze einer Pinzette herausgedrückt und die nun eingedeckten Objektträger möglichst bläschenfrei über Nacht trocknen gelassen. Waren die Deckgläschen komplett durchgetrocknet, konnten alle überschüssigen Neomount®-Reste mit einer Rasierklinge entfernt werden.

3.3.1.3 Digitalisierung und Analyse

Aus den gefärbten und eingedeckten Schnitten wurden pro Tier und Gewebearart (scWAT und egWAT) jeweils fünf Schnitte ausgewählt, die daraufhin mit Hilfe eines Slide Scanners (SCN400 im CECAD, Leica, Wetzlar, Deutschland) in 40-facher Vergrößerung eingescannt wurden. Dabei wurde darauf geachtet mit den Bildern eine möglichst große Bandbreite an Fettgewebe abzubilden. Deswegen wurden keine aufeinanderfolgenden Schnitte ausgewählt. Die Scanbilder wurden dann computergestützt ausgewertet, wobei der Fokus auf der Bestimmung der Fettzellgrößen lag.

Die ersten Bearbeitungen der Bilder erfolgte in *QuPath* (Version 0.2.0 m2, University of Edinburgh, Edinburgh, Großbritannien), welches für das Umranden und Zuschneiden komplexer Gewebebilder besonders gut geeignet ist.¹⁴¹ Zunächst erfolgte die Umrandung des Präparates in dem eingescannten Bild (vergleiche Abbildung 4 A + B).

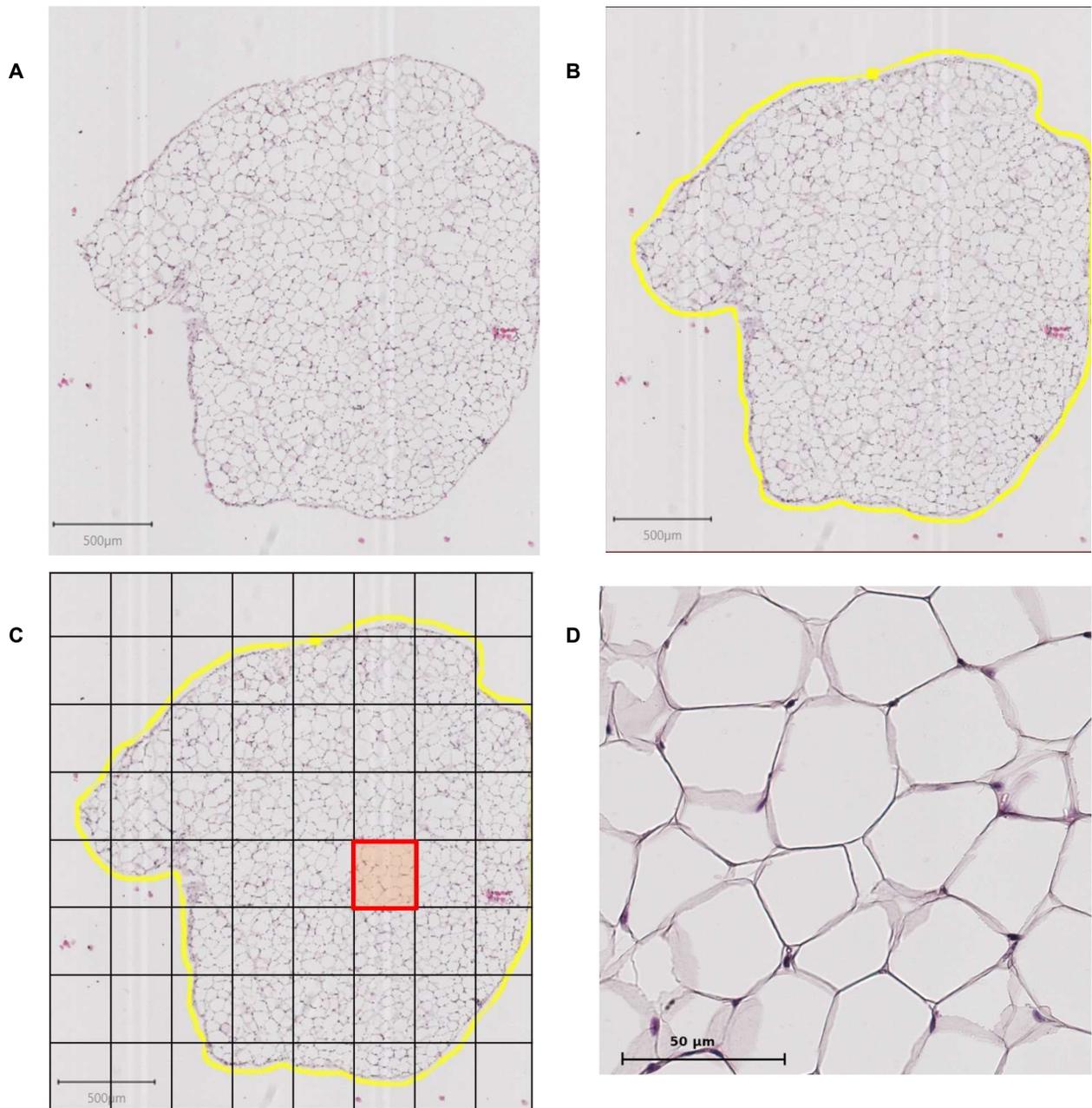


Abbildung 4: Verarbeitung eines histologischen Bildes des egWAT eines WSD-Versuchstiers mittels QuPath

Nach Entnahme des Fettgewebes (egWAT + scWAT) im Rahmen der Präparation an G15,5 erfolgte zunächst die Einbettung in Paraffin und das Anfertigen von 5 µm dünnen Schnitten an einem Rotationsmikrotom. Diese Schnitte wurden anschließend mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt und dann mit Hilfe eines Slide-Scanners in 40-facher Vergrößerung eingescannt. Scalebar: A-C = 500 µm, D = 50 µm

A Mittels Slide Scanner eingescannter Gewebeschnitt vor der computergestützten Bearbeitung

B Gewebeschnitt nach der Umrandung mithilfe der Software *QuPath*

C Einteilung des Gewebeschnitts in 1200 x 1200 Pixel große Kacheln (Symbolbild)

D Ausschnitt von 1200 x 1200 Pixeln Kantenlänge, der randomisiert aus den zerschnittenen Kacheln ausgewählt wurde

Mit Hilfe des Programms *QuPath* wurde das umrandete Areal anschließend in 1200 x 1200 Pixel große Kacheln zerschnitten (Zusammenarbeit mit Peter Zentis von der Imaging Facility des Exzellenzclusters Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECADs), vergleiche Abbildung 4 C + D). Mittels der randomisierten Auswahl durch die Internetseite *random.org* (Randomness and Integrity Services, Dublin, Irland) konnten hieraus anschließend zufällig fünf Bilder ausgewählt werden.

Dabei mussten die ausgewählten Bilder folgende Kriterien erfüllen:

- Größe 1200 x 1200 Pixel
- Kein Bildabschnitt ohne Fettzellen enthalten
- Mindestens drei auswertbare Zellen enthalten

3.3.1.4 Auswertung der Fettzellgröße

Die fünf randomisiert ausgewählten Bilder konnten anschließend mithilfe des Plugins *Adiposoft* (CIMA, Universidad de Navarra, Pamplona, Spanien) der Software *Image J* (NIH Image, Rasband, Bethesda, USA) ausgewertet werden, welches in der Lage ist, selbständig Fettzellen zu erkennen und zu markieren.¹⁴³ Der minimale Cut-off für den Fettzeldurchmesser lag bei 10 μm und der Maximaldurchmesser bei 140 μm .

Da die automatische Erkennung aber nicht fehlerfrei war, mussten Zellen gelöscht werden, wenn:

- die markierte Struktur keine Zelle war
- die Zellgrenzen nicht klar erkennbar waren
- die markierte Zelle nicht vollständig im Bild enthalten war
- eine Fettzelle als mehrere Zellen unterteilt markiert war
- zwei oder mehr Zellen zu einer zusammengefügt wurden
- die Markierung deutlich von den eigentlichen Zellgrenzen abwich

Grundsätzlich wurden keine zusätzlichen Fettzellmarkierungen hinzugefügt. Es wurden also nur die Zellen ausgewertet, die *Adiposoft* selbst erkannt hatte und die den Kriterien entsprachen und deshalb nicht gelöscht werden mussten (vergleiche Abbildung 12 A + B).

Diese Zellen wurden von *Adiposoft* ausgewertet und Durchmesser sowie Flächeninhalt in einer Exceltabelle ausgegeben. Aus diesen Daten wurde der mittlere Durchmesser und die mittlere Fläche berechnet, indem die Werte der fünf einzelnen

Bilder jeweils mit der Anzahl der erfassten Zellen je Bild multipliziert, die entstandenen fünf Werte summiert und durch die Gesamtzahl aller Zellen der fünf Bilder geteilt wurden. Die hier beschriebene Rechnung ist in der folgenden Formel beispielhaft für den Durchmesser dargestellt:

$$\bar{D}_{\text{gesamt}} = \frac{(\bar{D}_{\text{Bild1}} \times Z_{\text{Bild1}}) + (\bar{D}_{\text{Bild2}} \times Z_{\text{Bild2}}) + (\bar{D}_{\text{Bild3}} \times Z_{\text{Bild3}}) + (\bar{D}_{\text{Bild4}} \times Z_{\text{Bild4}})}{Z_1 + Z_2 + Z_3 + Z_4}$$

\bar{D}_{gesamt} : mittlerer Durchmesser der Fettzellen aller fünf Bilder eines Präparats

\bar{D}_{Bild} : mittlerer Durchmesser der Fettzellen eines Bildes

Z_{Bild} : erfasste Zellzahl eines Bildes

Die ermittelten Werte wurden für die finale Auswertung entblindet (siehe Kapitel 4.3).

3.3.2 Quantifizierung des Fettgewebes mittels μ CT

(Mikro-Computertomographie)

Um die Effekte am Fettgewebe durch die Diäten weiter zu quantifizieren, wurden weibliche Mäuse aus den Versuchsgruppen, die im Versuch nicht tragend wurden, weiter untersucht. Die Tiere wurden nach Feststellung der erfolglosen Verpaarung (etwa zwei Wochen nach dem letzten Verpaarungsversuch) durch zervikale Dislokation getötet und für die nachfolgenden Untersuchungen bei -80°C eingefroren. Die ab hier beschriebene Durchführung der Scans sowie die Analyse und Berechnung der Fettvolumina wurde durch die Mitarbeiter der Phenotyping Core Facility des Max-Planck-Instituts für Biologie des Alterns erbracht.

Die unversehrten Mäuse wurden für diese Untersuchung mit einem μ CT-Scanner (SkyScan 1176, Bruker, Belgien) mit folgenden Einstellungen gescannt:

- isotropen Voxelgröße: $35,26 \mu\text{m}^3$
- Röntgeneinstellungen: 45 kV, 475 μA unter Verwendung eines 0,5-mm-Aluminiumfilters
- Rotation von 360° , durchgeführt mit einem Rotationsschritt von $0,6^{\circ}$ und einer Rahmenmittelwertbildung von 2

Die entstandenen Bilder wurden anschließend mithilfe der Software *NRecon*, *CTAn* und *CTVox* (jeweils Bruker, Belgien) rekonstruiert, analysiert und visualisiert. Daraufhin konnten die Bilder basierend auf der Gewebedichte segmentiert werden, um sowohl das Gesamt- als auch das Fettvolumen zu bestimmen. Das so bestimmte Fettvolumen konnte, mithilfe der Bauchmuskelwand als Orientierung, weiter in viszerales und subkutanes Fett differenziert werden. Außerdem konnte somit das Gesamt- und viszerale Fettvolumen im Verhältnis zum Gesamtkörpervolumen der Mäuse (abzüglich der Lungenvolumina) berechnet werden.

3.3.3 Proteomics-Screen

Proteine sind die Hauptkomponenten beinahe aller metabolischen Stoffwechselfvorgänge. Da egWAT im Vergleich zu scWAT deutlich aktiver ist, vermehrt inflammatorische Faktoren sekretiert und enger mit durch Adipositas beeinflussten Erkrankungen assoziiert zu sein scheint, wurden nur die Proben des egWAT für die Proteomic-Analyse verwendet. Um die Vorgänge auf Proteinebene genauer zu untersuchen, wurden Proteine aus dem egWAT isoliert und per Massenspektrometrie analysiert. Für die Untersuchung wurde die Methode nach Protokollen der CECAD Proteomics Facility durchgeführt.^{151,152}

3.3.3.1 Proteinisolation

Als erster Schritt wurden etwa 50 mg des bei -80°C nativ eingefrorenen Fettgewebes mit Hilfe eines Skalpell zur weiteren Verarbeitung abgeschnitten. Das Gewebe wurde danach in ein Gefäß gegeben, in das zur Lyse 200 µl modifizierter RIPA-Puffer hinzugegeben wurde. Um das Gewebe zu zerkleinern, kam ein Mini-Mörser zur Anwendung, mit dem das Gewebe manuell zerstoßen wurde. Für die anschließende exakte Zerkleinerung wurde das Gewebe zweimal für jeweils 20 Sekunden mittels SONOPULS® HD 2070 (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) sonifiziert. Falls danach noch Gewebestücke vorhanden waren, wurden die Proben nach einer Pause ein weiteres Mal 20 Sekunden sonifiziert. Anschließend wurden alle Proben für eine Stunde auf Eis inkubiert und dann fünf Minuten bei 16.100 g und 4°C zentrifugiert. Der durch das Zentrifugieren gewonnene proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde eine Acetonfällung durchgeführt, indem 800 µl eiskaltes Aceton zu den Proben gegeben und die Lösung für 15 Minuten bei -80°C inkubiert wurde, gefolgt von einer weiteren Inkubation von 90 Minuten bei -20°C. Anschließend wurden die Röhrchen für 15 Minuten bei 16.000 g bei RT abzentrifugiert. Der dadurch entstandene Überstand wurde vorsichtig entfernt. Zu dem entstandenen Proteinpellet wurde erneut 500 µl eiskaltes Aceton hinzugegeben. Die Proben mussten erneut für 5 Minuten bei 16.000 g und RT abzentrifugiert und der Überstand verworfen werden. Dieser Reinigungsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor das Proteinpellet luftgetrocknet wurde, woraufhin das Pellet in 8 M Urea-Puffer resuspendiert und so über Nacht gelagert wurde.

3.3.3.2 Proteinverdau

Um die Proteine später analysieren zu können, musste das entstandene Proteinpellet zunächst wieder in Lösung gebracht, gereinigt und ein Proteinverdau durchgeführt werden.

Zunächst erfolgt die Zugabe von insgesamt 100 µl 8 M Urea-Puffer (8 M Urea, 50 mM TEAB) und 2 µl Protease-Inhibitor zu jeder Probe. Anschließend erfolgte der Abbau von Chromatin durch die Verwendung eines Bioruptors® für 10 Minuten in 30-Sekunden-Zyklen. Bei einigen Proben war auch nach diesem Schritt das Proteinpellet nicht aufgelöst, sodass weitere 100 µl 8 M Urea-Puffer und 2 µl Protease-Inhibitor hinzugefügt und erneut für 30 Sekunden im SONOPULS® HD 2070 (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) sonifiziert wurde.

Alle Proben wurden danach für 15 Minuten bei RT und 20.000 g abzentrifugiert und vorsichtig alle Zelltrümmer entfernt. Daraufhin erfolgte eine Bestimmung der Proteinmenge durch einen Multiskan FC. Es wurden 50 µg Protein pro Probe mit 8 M Urea-Puffer auf ein gesamtes Volumen von 100 µl aufgefüllt und zu diesem Dithiothreitol bis zu einer Endkonzentration von 5 mM hinzugefügt. Danach wurde das Gefäß gevortext und anschließend bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde Chloroacetamid bis zu einer Endkonzentration von 40 mM hinzugegeben, erneut gevortext und eine halbe Stunde in Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit konnte Lysyl Endopeptidase (Lys-C) Protease in einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:75 hinzugefügt und die Proben bei 37°C für vier Stunden inkubiert werden. Im Anschluss wurden die Proben mit 50 mM TEAB verdünnt, um eine finale Konzentration von ≤ 2 M Urea zu erreichen. Anschließend wurde Trypsin in einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:75 hinzugefügt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 %-ige Ameisensäure zu den Proben hinzugegeben, um den enzymatischen Verdau zu stoppen.

3.3.3.3 Aufbereitung

Die eigentliche Analyse erfolgte nach dem Auftragen der Proben auf StageTips. In diese sind zwei Material-Lagen eingebracht, einerseits SDB und andererseits ein C₁₈-Umkehrphasematerial. Um die StageTips zu equilibrieren, wurden 20 µl Methanol aufgetragen und dann die Proben für eine Minute bei RT und 2.600 rpm abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl Buffer B, gefolgt von einer einminütigen Zentrifugation bei RT und 2.600 rpm. Auch nach der Zugabe von 20 µl Buffer A erfolgte eine anderthalbminütige Zentrifugation bei RT und 2.600 rpm. Nach diesem Schritt wurde noch einmal 20 µl Buffer A zu den Proben hinzugegeben, die daraufhin für 2 Minuten bei RT und 2.600 rpm abzentrifugiert wurden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Spitzen nach diesem Schritt weiterhin leicht feucht waren. Bevor die letzten Schritte der Vorbereitung begonnen werden konnten, wurden die Lösungsmittel aus dem Sammelröhrchen entsorgt. Anschließend wurden die Proben erneut bei voller Geschwindigkeit für 5 Minuten bei RT abzentrifugiert. Die Proben wurden nun einzeln auf je ein StageTip aufgetragen. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 2.600 rpm und RT für 5 Minuten. Auch bei diesem Schritt musste darauf geachtet werden, die StageTips nicht vollständig trocken werden zu lassen.

Im Anschluss daran erfolgten noch einige Waschschrte: Zunächst wurden die StageTips mit 30 µl Buffer A gereinigt und 3 Minuten bei RT und 2.600 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden 30 µl Buffer B hinzugegeben und erneut für 3 Minuten bei RT und 2.600 rpm zentrifugiert. Als letzter Waschschrte musste erneut 30 µl Buffer B hinzugegeben und die Zentrifugation wiederholt werden. Abschließend wurden die StageTips vollständig mit Hilfe einer Spritze getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert, bis die Proben von den Mitarbeitern der Proteomics Facility im CECAD weiterverarbeitet werden konnten.

3.3.3.4 Proteinanalyse durch die Proteomics Facility

Nach den durchgeführten Vorbereitungsarbeiten mit Zellyse, Fraktionierung und Proteinverdau wurde das resultierende Peptidgemisch durch eine Umkehrchromatographie mit Nano-UHPLC-System getrennt. Während die Peptide von einer Säule eluierten, wurden sie ionisiert und dann mithilfe eines Quadrupol-Orbitrap-Hybrid-Massenspektrometers nachgewiesen. Alle ab hier beschriebenen Schritte der Proteinanalyse wurden von der Proteomics Facility durchgeführt.

Alle Proben wurden mithilfe eines Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) Massenspektrometers, gekoppelt an ein EASY nLC 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ausgewertet. Die Detektion erfolgte aufgrund der Auftrennung in verschiedene Laufgeschwindigkeiten der Proteine in der mobilen Phase (Proteine und Puffer B), welche sich durch Interaktionen mit der stationären Phase (Säule) erklären lässt. Die Beladung der Peptide erfolgte mit Lösungsmittel A (0,1 % Ameisensäure in Wasser) auf eine gepackte analytische Säule (50 cm-75 µm I.D., gefüllt mit 2,7 µm Poroshell EC120 C18, Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Die chromatographische Trennung der Peptide wurde bei einer konstanten Flussrate von 250 nL/min unter Verwendung des folgenden Gradienten durchgeführt:

- 3-5 % Lösungsmittel B (0,1 % Ameisensäure in 80 % Acetonitril) innerhalb von 1 min,
- 5-30 % Lösungsmittel B innerhalb von 119 min,
- 30-50 % Lösungsmittel B innerhalb von 19 min,
- 50-95 % Lösungsmittel B innerhalb von 1 min,

gefolgt von Waschen und Säulenäquilibrierung. Am Massenspektrometer wurde der datenabhängige Erfassungsmodus verwendet. Der MS1-Vermessungsscan wurde von 300-1750 m/z mit einer Auflösung von 70.000 erfasst. Die Isolierung der 10 häufigsten Peptide wurde innerhalb eines 2,1 Th-Fensters durchgeführt (MS1 Scan) und die Peptide wurden einer HCD-Fragmentierung bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 27 % unterzogen. Es wurde eine maximale Injektionszeit von 60 Millisekunden angewendet, da das AGC-Ziel auf 5e5 Ladungen festgelegt wurde. Die in diesem Prozess entstandenen Ionen wurden mit einer Auflösung von 17.500 im Orbitrap nachgewiesen. Der dynamische Ausschluss von Vorläufern wurde auf 25,0 Sekunden festgelegt.

3.3.3.5 Auswertung

Um die so gewonnenen Rohdaten aus der massenspektrometrischen Messung weiter analysieren zu können, wurden sie mithilfe der Software *MaxQuant* von Mitarbeitenden der Proteomic Facility weiterverarbeitet. Die erhaltenen Daten wurden dabei mit der *Uniprot MOUSEfasta-Datenbank* verglichen. Nur Peptide mit mindestens sieben Aminosäuren wurden für die weiteren statistischen Analysen berücksichtigt, welche von mir mit der Software *Perseus* durchgeführt wurden. Neben statistischen Transformationen der Daten wurden Proteine, die nur potenzielle Kontaminanten oder nicht eindeutig zu identifizieren waren, ausgeschlossen. Bei Proben, bei denen eines der sonst erkannten Proteine nicht detektiert werden konnte, wurden zufällige Randwerte aus dem gerade noch zu detektierenden Bereich des Massenspektrometers eingesetzt. Daraufhin erfolgte ein Vergleich der Gruppen durch ungepaarte T-Tests. Da dafür multiple Tests notwendig waren, wurden die ermittelten p-Werte anschließend durch eine permutations-basierte Methode korrigiert und damit die falsch positiven Ergebnisse verringert. Der daraus entstandene q-Wert wurde als signifikant gewertet, wenn er kleiner 0,05 war. Die Veränderung wurde nur dann als signifikant gewertet, wenn die Abweichung zur jeweiligen Vergleichsgruppe über das $2^{0,59}$ -fache ($\approx 1,5$ fach) vorlag. Für diese Arbeit wurden folgende Vergleiche genauer untersucht: HFD vs. SD, DIO vs. SD, WSD vs. SD, DIO vs. HFD und WSD vs. HFD. Anschließend konnten die detektierten Komponenten in einer Hauptkomponentenanalyse graphisch dargestellt werden.

Um die erhaltenen Datenmengen übersichtlich darzustellen, wurden mithilfe der Software *RStudio* die detektierten Proteine mittels Volcano Plots visualisiert. Nach dieser Abbildung der gesamten Daten wurden die Untersuchungsergebnisse weiter analysiert. Zunächst wurden nur die signifikant veränderten Proteine weiter betrachtet. Außerdem wurden nur diejenigen Werte in die weitere Untersuchung eingeschlossen, die entweder in allen Proben einer Versuchsgruppe (valid value = 5) oder in keiner Probe einer Gruppe (valid values = 0) nachgewiesen werden konnten. Vergleiche, bei denen in keiner Gruppe valid values vorlagen, wurden ausgeschlossen.

Nach diesen Vorarbeiten wurden die so spezifizierten Daten mit dem Programm *FunRich 3.1.3*¹⁴⁴ als Venn-Diagramm dargestellt, wodurch Überschneidungen in den detektierten Proteinveränderungen einerseits zwischen allen untersuchten Gruppen, sowie zwischen allen Vergleichen gegen SD (SD vs. HFD, SD vs. DIO, SD vs. WSD)

und andererseits zwischen allen Vergleichen gegen HFD (HFD vs. SD, HFD vs. DIO, HFD vs. WSD) sichtbar gemacht wurden.

Nach diesem Schritt wurden die Daten der gerade beschriebenen Gruppen für eine Analyse potenzieller Interaktionen in die online verfügbare Datenbank *STRING Database* eingefügt. Wurden die Protein-IDs nicht erkannt, erfolgte der Ersatz durch eine alternative Protein-ID aus der *UniProt-Datenbank*. Genauer wurden nur die Proteine betrachtet, die experimentell nachgewiesene Interaktionen aufwiesen. Proteine ohne experimentell nachgewiesene Interaktionen wurden aus der Darstellung ausgeschlossen. Die verbliebenen Proteine konnten nun auf sogenannte functional enrichments in Bezug auf Zellkomponenten, biologische Prozesse, molekulare Funktion oder KEGG Pathways untersucht werden.

Außerdem wurden die signifikanten Veränderungen der Gruppen mit jeweils 5/5 oder 0/5 valid values mit der Proteindatenbank *PANTHER (Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System* visualisiert. Dafür mussten erneut einige Protein-IDs durch Alternativen aus der *UniProt-Datenbank* ersetzt werden. Durch die in *PANTHER* hinterlegten Datenbanken konnten die detektierten Proteine im Hinblick auf ihre molekulare Funktion, die zelluläre Komponente, die biologischen Prozesse sowie die Pathways, an denen sie beteiligt sind, aufgeschlüsselt werden. Durch die Zusammenschau der *STRING*- und *PANTHER*-Analyse konnten somit besonders relevante und interessante Proteine für die weitere Betrachtung herausgefiltert werden. Mithilfe von fünf verschiedenen Schlagwörtern wurden potenziell relevante Proteine herausgefiltert, die dann individuell weiter betrachtet wurden.

3.3.4 Molekularbiologische Methoden

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist eine Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Nukleinsäuren (in diesem Fall mRNA). Hierfür muss zuerst ein Gewebelysat hergestellt werden, um anschließend RNA zu isolieren, welche dann in cDNA umgeschrieben werden kann. In dieser Arbeit wurde für die molekularbiologische Analyse des epigonadalen und subkutanen Fettgewebes eine sondenbasierte Realtime qPCR (RT qPCR) eingesetzt.

3.3.4.1 Grundlagen der RT-qPCR

Bei der RT-qPCR kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung bereits kleinster Mengen an definierten DNA-Abschnitten, die durch eine zyklische Wiederholung bestimmter Reaktionsschritte entsteht. Die folgenden drei Phasen werden in jedem Reaktionszyklus wiederholt:

1. Denaturierungsphase; Temperaturen von 95°C trennen die Stränge auf
2. Primerhybridisierungsphase; die Temperatur wird wieder gesenkt und Primer binden an die einzelsträngigen Templates
3. Elongationsphase; Synthese komplementärer Stränge durch DNA-Polymerase

Am Ende erfolgt die End-Elongation für etwa 10 Minuten, die dazu dient, alle Stränge fertig zu synthetisieren. In diesem Versuch wurden fluoreszenzgestützte Sonden im sogenannten Taqman-Verfahren verwendet, bei welcher sich Fluoreszenz durch Abspaltung im Laufe der PCR-Zyklen anreichert. Dabei bestehen die Sonden aus einem Reporter-Farbstoff (in diesem Versuch FAM) am 5'-Ende, der Nukleotidsequenz dazwischen und einem Quencher (in diesem Versuch TAMRA) am 3'-Ende (vergleiche Abbildung 5). Durch eine Analyse kann in Echtzeit die proportionale Zunahme des Fluoreszenzsignals beobachtet werden.¹⁵⁴



Abbildung 5: Eigene, schematische Darstellung der Grundlage der fluoreszenzgestützte Sonden im Taqman-Verfahren. Angelehnt an ¹⁵³.

R= Reporter, Q=Quencher

A Normalzustand

B Taqman-Sonde nach Abspaltung des Reporters

3.3.4.2 RNA-Isolation

Im ersten Schritt wurde die RNA-Isolation vorbereitet. Dafür musste ein Gewebelysat erstellt werden, indem eine etwa erbsengroße Menge des nativ bei -80°C eingefrorenen Fettgewebes mit einem Skalpell abgetrennt und in ein steriles Gefäß gegeben wurde. Hierzu wurde jeweils eine sterile Metallkugel und 1,5 ml TRI Reagent® hinzugegeben und das Gewebe zweimal für je 30 Sekunden in einer Gewebemühle (Schwingmühle MM400, Retsch, Haan, Deutschland) bei 30 Hz homogenisiert. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten lang bei RT inkubiert. Daraufhin wurde 300 μl Chloroform mit einer Multipipette hinzugegeben und die Proben gründlich mindestens 15 Sekunden gevortext, woraufhin sie erneut für 2,5 Minuten bei RT inkubiert wurden. Es folgte das Abzentrifugieren für 15 Minuten bei 13.680 g und 4°C in einer Zentrifuge (Z 216 MK, Hermle, Wehingen, Deutschland).

Durch diesen Schritt trennen sich drei Phasen: In der oberen, wässrig farblosen Phase befindet sich die gesamte gelöste RNA. In der ebenfalls wässrigen, trüben Intermediärphase befinden sich gelöste DNA und Proteine sowie Zelltrümmer. Die untere rötliche Phase besteht vor allem aus TRIzol, Phenol und Chloroform.

Vorsichtig konnte nun die obere RNA-Phase mit einer 200 μl Pipette abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. In dieses wurde nun 750 μl Isopropanol hinzugegeben, erneut gevortext und die Proben auf Eis für 20 Minuten inkubiert, wodurch die RNA präzipitierte. Nach dieser Inkubation wurden die Reaktionsgefäße für 15 Minuten bei 15.000 rpm und 4°C abzentrifugiert, wodurch RNA-haltige Pellets entstanden. Danach konnte das Isopropanol vorsichtig abpipettiert werden. Die RNA-haltigen Pellets wurden zwei Mal mit jeweils 1,5 ml 75 %-igem Ethanol gewaschen. Das Ethanol musste vorsichtig hinzugegeben werden, dann wurden die Proben behutsam geschwenkt und für 5 Minuten bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Ethanolreste wurden möglichst vorsichtig abpipettiert. Nach dem zweiten Waschvorgang konnte das Pellet für etwa 60 Minuten luftgetrocknet werden. War das Pellet vollständig getrocknet, musste es in 22 μl Aqua bidest RNase-frei (DEPC- H_2O) aufgelöst werden. Dabei wurde das Wasser hinzugegeben und die Proben besonders gründlich gevortext. Nach kurzem Abzentrifugieren konnte die nun isolierte und gelöste RNA entweder zur direkten Weiterverarbeitung auf Eis gegeben oder zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

3.3.4.3 RNA-Konzentration messen

Um nach der Isolation der RNA die Konzentration dieser zu bestimmen, wurde ein Mikrotiterplattenleser (Nano Quant infinite M200 Pro, Tecan, Crailsheim, Deutschland) verwendet, der aus einer 16-Felder-Platte und einem Analysegerät besteht. Bei dem Analysegerät handelt es sich um ein Spektrophotometer. Das bedeutet, dass das Gerät die Abschwächung von Licht beim Durchtritt durch ein Medium misst, also zwischen unterschiedlichen optischen Dichten (OD) unterscheiden kann. Dabei ist entscheidend, dass Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm haben, während das Absorptionsmaximum von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm liegt. Deswegen kann durch Bestimmung des OD_{260}/OD_{280} -Quotienten die Reinheit der RNA ermittelt werden, die zwischen 1,8 und 2,1 liegen sollte. Eine OD_{260} von 1 entspricht etwa 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Das Ergebnis wurde von der vom Tecan verwendeten Software *i-control 2.0* (Tecan, Crailsheim, Deutschland) in Form einer Exceldatei ausgegeben.

3.3.4.4 Umschreiben in cDNA

Um das mRNA-Expressionslevel beurteilen zu können, musste zunächst die mRNA in cDNA umgeschrieben werden, um anschließend mittels PCR vervielfältigt zu werden.

3.3.4.4.1 Grundlage des Umschreibens in cDNA

Im ersten Schritt wird ein zur mRNA komplementärer cDNA-Strang synthetisiert. Die DNA-Polymerase benötigt dabei verschiedene Primer, welche an die RNA binden. Der Oligo-dT Primer bindet an die Poly-A-Schwänze der RNA, während der Random Primer an verschiedensten Stellen der RNA bindet. Der RNA-Strang wird während der Synthese des neuen Strangs abgebaut. Letztendlich erhält man so eine doppelsträngige cDNA, die im Anschluss daran mittels qPCR vervielfältigt werden kann.

3.3.4.4.2 Durchführung des Umschreibens

In ein Reaktionsgefäß wurde als erstes DEPC-H₂O gegeben. Dann folgte 1 µg RNA pro Ansatz. Die Proben wurden gevortext und anschließend auf Eis gestellt. Um potenziell vorhandene genomische DNA abzubauen, wurde jeweils 1 µl DNase-I-Puffer und RNase-free DNaseI (RQ1/Promega) zum Ansatz gegeben und 15

Minuten bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1 µl 25mM EDTA (Stop-Solution) und 15-minütiger Inkubation bei 65°C gestoppt.

Anschließend wurden 5 µl des Mastermix A (0,6 µl Randomprimer (1:4; 0,5 µg/µl), 0,4 µl Oligo dt-Primer (0,5 µg/µl) und 4 µl DEPC H₂O) hinzugegeben. Während der folgenden 5-minütigen Inkubation in einem Heizblock bei 70°C lösten sich unspezifische RNA-Primer-Bindungen. Direkt danach kamen die Proben für eine Minute auf Eis, um eine Re-Hybridisierung zu verhindern. Anschließend wurden 10 µl Mastermix B hinzugegeben (5 µl gevortexter MMLV-buffer (5x), 1,25 µl dNTP-Mix (10 mM each) und 2,25 µl gevortexter DEPC-H₂O, nicht gevortext wurden 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) und 1 µl MMLV (Promega: 200 U/µl)) und die Proben bei 37°C im Heizblock inkubiert. Nach diesem Schritt mussten die Proben für eine Minute auf Eis gegeben, abzentrifugiert, gevortext und dann bei -20°C eingefroren werden.

3.3.4.5 RT-qPCR

Die zuvor synthetisierte doppelsträngige cDNA wurde nun mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) vervielfältigt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde für die RT-qPCR der Thermozykler (7500 Real Time PCR System Thermocycler) und die Software *7500 2.0.6* verwendet.

3.3.4.5.1 Analyisierte Gene

Die in Kapitel 3.3.4.1 beschriebene Methode der RT-qPCR wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die relative Genexpression inflammatorischer Faktoren zu messen. Konkret handelte es sich hierbei um IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α, CXCL1, CXCL10, CYB-A, CYB-B, NCF1, NCF2, NOX4, SOD1, GPX1 und CAT. Um als Vergleichsgrundlage Housekeeping-Gene festzulegen, wurden β-ACTIN, 18S, HPRT, GUSB und GAPDH getestet, die für Fettgewebe als besonders geeignet gelten.^{138,139} Letztendlich wurde sich für die Verwendung von 18S als Housekeeping für egWAT und β-ACTIN für scWAT entschieden, da diese in allen Gruppen die geringsten Schwankungen innerhalb der Gruppen aufwiesen (siehe Abbildung 18 in Kapitel 4.5). Eine vollständige Auflistung mit Angabe der entsprechenden Nukleotidsequenzen der einzelnen Primer sind in Tabelle 4 zu finden.

3.3.4.5.2 Durchführung der RT-qPCR

Je Probe wurden 12,5 µl qPCR-SuperMix (Platinum® qPCR SuperMix-UDG mit ROX), 8,5 µl HPLC-Wasser und jeweils 0,5 µl je Primer (2 µM taq-Primer, 6 µM for- und rev-Primer) in ein Reaktionsgefäß gegeben. Daraufhin wurde je Vertiefung einer Mikrotiterplatte 22,5 µl des Ansatzes aufgetragen. Anschließend wurden 2,5 µl der zuvor geschriebenen cDNA dazugegeben. Zu der Negativprobe wurde stattdessen 2,5 µl HPLC-Wasser hinzugegeben. Direkt im Anschluss wurde die Platte mit Clear Seal Folie eingeschweißt und somit versiegelt. Vor der eigentlichen Messung mit dem Thermozykler musste die Mikrotiterplatte noch für 3 Minuten bei 20°C und 338 g abzentrifugiert werden.

3.3.4.5.3 Auswertung der RT-qPCR

Die Auswertung fand grundsätzlich immer im Vergleich zu dem zuvor festgelegten und gemessenen Housekeeping als Referenz statt (siehe 3.3.4.5.1). Hierfür wurde die sogenannte $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode in Microsoft Excel verwendet, bei der ein Threshold-Cycle (CT-Wert) bestimmt wird.¹⁵⁵ Dieser CT-Wert gibt denjenigen PCR-Zyklus an, an dem die gemessene Fluoreszenz erstmals signifikant messbar wird, indem sie die unspezifische Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Letztendlich kann dann durch die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode die relative mRNA-Expression des Zielgens im Verhältnis zu einer Kontrollgruppe mit Normierung auf ein Housekeeping-Gen bestimmt werden.

3.3.5 Lipidomics-Analyse

Als weitere Methode erfolgte eine Serumanalyse des maternalen Blutes. Das Fettsäureprofil wurde von der Lipidomics Facility unter der Leitung von Frau Dr. Brodesser im CECAD mit Hilfe des *MPLEx*-Verfahrens (Metaboliten-, Protein- und Lipidextraktion) bestimmt.

3.3.5.1 Lipidextraktion per MPLEx

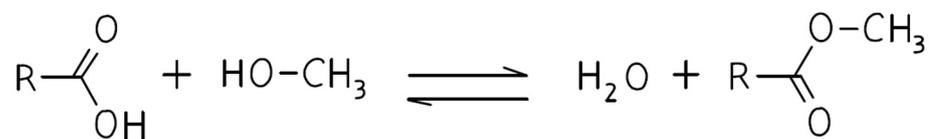
Für die Lipidextraktion wurden je 10 µl Mäuseserum, 100 µl eiskalte Extraktionslösung (bestehend aus MeOH und 0,025 % BHT, gelöst in H₂O im Verhältnis 50:50, bei -20°C) sowie 20 µl des internen Standards Myristinsäure-d₂₇ zugegeben. Die deuterierte Myristinsäure wurde in der weiteren Verarbeitung zur Standardisierung der Messergebnisse der Gas-Chromatographie verwendet, das BHT hingegen als Antioxidans.

Im nächsten Schritt wurden 1,5 ml eiskalte Chloroform-Methanol-Lösung (Verhältnis 2:1, -20°C) hinzugeben und die Mischung für 20 Sekunden gevortext. Anschließend wurden 600 µl H₂O hinzugeben und erneut gevortext, um daraufhin 5 Minuten auf Eis zu inkubieren. Dann wurden die Proben 30 Sekunden lang intensiv gevortext und konnten im Anschluss 10 Minuten lang bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert werden.

Dadurch trennten sich zwei Phasen: Die obere, methanolhaltige Schicht, in der alle weiteren Bestandteile der Probe zu finden waren, sowie die untere, chloroformhaltige Schicht, welche alle Lipide enthielt.¹⁵⁶ Diese lipidhaltige Phase wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend in einem Reacti-Therm III-Modul (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) eingedampft. Die so entstandenen Lipidpellets wurden bei -20°C bis zur weiteren Analyse trocken gelagert.

3.3.5.2 Überführung in FAMES

Das per MPLEx entstandene Lipidpellet bestand zu diesem Zeitpunkt aus Triglyceriden, für die Bestimmung des Fettsäureprofils im Serum per Gas-Chromatograph musste eine Überführung in Fettsäuremethylester (FAMES) erfolgen. Triglyceride bestehen aus einem Molekül Glycerin mit drei Fettsäureresten, durch Umesterung wird das Glycerinmolekül durch ein Methanolmolekül ersetzt. Die so entstehenden FAMES setzen sich also aus einem Methanolmolekül mit 3 Fettsäureresten zusammen. Die Reaktion ist schematisch in der folgenden Reaktionsformel wiedergegeben:



Um die Umesterung durchzuführen, wurden die einzelnen Lipidpellets in 500 µl Methanol-HCl-Lösung (Verhältnis 1:2) gelöst und anschließend 30 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Die Salzsäure fungiert in dieser Reaktion als Katalysator. Daraufhin wurden die Proben aus dem Wasserbad genommen, auf RT gekühlt und mittels 1-2 Pasteurpipetten Hexan die entstandenen FAMES extrahiert. In einem neuen Reaktionsgefäß wurde anschließend die Hexanphase eingedampft. Die nun konzentrierteren Proben wurden wieder in 100 µl Hexan gelöst und in Reaktionsgefäße mit Glasinsert gegeben. Direkt im Anschluss konnten die Proben mittels Gas-Chromatographie analysiert werden.

3.3.5.3 Messung per GC-MS

Um eine quantifizierte Aussage über die in den FAMES enthaltenen Fettsäuren treffen zu können, wurden die Proben mittels Gas-Chromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (7890A GC-System gekoppelt an ein 5975 Inert XL EI/CI MSD, Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA) weiter analysiert. Dafür wurden die Proben mittels eines Autosamplers (7693 Autosampler, Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA) nacheinander ins Inlet gegeben, verdampft und so mithilfe eines Trägergasstroms (mobile Phase) über die Trennsäule (HP-5MS, Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA) transportiert, auf der sich die stationäre Phase befindet (flüssiger Polymerfilm: 5 % Phenyl, 95 % Methylpolysiloxan). Dort verblieben die Probenbestandteile aufgrund der verschiedenen Siedepunkte und anderer

Eigenschaften unterschiedlich lange, sodass eine Auftrennung nach Retentionszeit stattfand. Daraufhin konnten sie in einem massensensitiven Detektor per Elektronenstoß ionisiert werden, wobei sie in Fragmente zerfielen. Diese Fragmente konnten dann anhand ihres elektrischen Signals identifiziert werden.

3.3.5.4 Auswertung

Zur Auswertung der detektierten elektrischen Signale aus dem Gesamt-Ionenstrom wurde die Software *AMDIS* genutzt. Mit deren Hilfe konnten anschließend die Signale durch einen Abgleich mit der *NIST 08 Referenzbibliothek*¹⁵⁷ der korrekten Fettsäure zugeordnet und diese somit identifiziert werden. Daraufhin wurden die Daten im Programm *RStudio* (RStudio, Boston, Massachusetts, USA) mithilfe der *Metab*-Erweiterung weiterverarbeitet, indem alle signifikanten Ergebnisse mithilfe des bereits erwähnten internen Standards (Myristinsäure-d₂₇) normalisiert wurden. Die Einheit der erhaltenen Ergebnisse lautet Area ratio/10 ml Plasma, da der Fettsäuregehalt durch den Quotienten aus Peakfläche der Probenfettsäure und internem Standard abgebildet wurde.

3.3.6 Statistik

Vor dem Beginn der Arbeit wurden alle Proben mittels randomisiert zugeteilten Buchstaben verblindet und erst für die Auswertung wieder entblindet. Die statistische Auswertung aller Analysen erfolgte mithilfe der Software *Graph Pad Prism 8*. Dabei wurden zunächst folgende Gruppen verglichen:

- SD vs. HFD
- SD vs. CO
- SD vs. WSD
- SD vs. DIO
- CO vs. WSD
- CO vs. DIO
- CO vs. HFD
- HFD vs. DIO
- HFD vs. WSD

Im Verlauf der statistischen Auswertung änderte sich dies, sodass bei den besonders aufwändigen Auswertungen des Proteomics-Screens nur die folgenden Gruppen verglichen wurden: SD vs. HFD, SD vs. DIO, HFD vs. DIO, HFD vs. WSD. Der genaue Hintergrund dazu findet sich im Ergebnisteil ab Seite 81 (Kapitel 4.1.3). Falls auch in anderen Gruppenvergleichen signifikante Veränderungen auftraten, wurden sie in dieser Arbeit nicht weiter aufgeführt.

Vor Beginn der statistischen Auswertung wurden zunächst Ausreißer ($p < 0,05$) mittels *Grubbs-Tests* identifiziert und maximal ein Wert pro Gruppe ausgeschlossen. Darauf folgte ein D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung. Alle hier untersuchten Gruppen wiesen keine Normalverteilung auf, weshalb anschließend mit allen Daten der zu vergleichenden Gruppen ein Mann-Witney-U-Test durchgeführt wurde. Bei den Ergebnissen wurde dementsprechend der Median inklusive des Interquartilsabstand (IQR) angegeben. Als signifikant galten Abweichungen ab einem p-Wert von $< 0,05$, dargestellt als *; p-Werte $< 0,01$ wurden als ** angegeben und p-Werte $< 0,001$ entsprechend als ***.

4 Ergebnisse

Im nun folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der in Kapitel 3.3 beschriebenen Methoden dargelegt. Ermittelte Ergebnisse, die nicht in diesem Kapitel dargestellt sind, befinden sich im Anhang (siehe ab Seite 186).

4.1 Phänotypische Daten der Mauskohorte

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurde den weiblichen C57BL/6N-Mäusen ab einem Alter von drei Wochen über die Verpaarung bis zum Ende des Versuchs jeweils eine von fünf Versuchsdiäten verfüttert. Dabei handelte es sich entweder um die Kontrolldiäten SD bzw. CO, um die Hochfett-Diät HFD oder um einer der Hochfett-/Hochzucker-Diäten DIO oder WSD. In den Analysen wurden zunächst die Gruppenvergleiche SD vs. HFD, SD vs. DIO, SD vs. WSD, SD vs. CO, CO vs. HFD, CO vs. DIO, CO vs. WSD, HFD vs. DIO und HFD vs. WSD genauer betrachtet. Im Verlauf dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden die Gruppen, welche gegeneinander verglichen wurden, jedoch noch einmal reevaluiert (siehe Kapitel 4.1.2).

Während der Versuchszeit wurden die weiblichen Mäuse regelmäßig gewogen, außerdem wurden Futter- und Wasseraufnahme bestimmt. In der vorliegenden Arbeit waren vor allem das Gewicht bei der Verpaarung sowie bei Sectio an G15,5 relevant. Außerdem wurde am Tag der Sectio die Länge des Tieres sowie das Gewicht des entnommenen egWAT bestimmt.

Einige Muttertiere konnten spontan werfen und phänotypische Daten der Nachkommen wie Rate an resorbierten Feten, Rate an Lebendgeburten sowie Überlebensrate in den ersten 21 Tagen nach Entbindung wurden bestimmt.

4.1.1 Körpergewicht, Körperlänge und Gewicht des egWAT

Da die weiblichen Mäuse ab einem Alter von drei Wochen unterschiedliche Diäten erhielten, untersuchten wir auf Gewichtsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen im Alter von 12 bis 16 Wochen, in dem die Verpaarung stattfand. Darüber hinaus wurden Gewichtsgrenzen für die Versuchsgruppen SD, CO und HFD gesetzt (siehe Kapitel 3.2.4). Die Mäuse der SD-Gruppe waren zum Zeitpunkt der Verpaarung (G0) mit 21,70 g signifikant leichter als die der HFD-Gruppe mit 24,89 g und die der WSD-Gruppe mit 22,80 g. Dasselbe gilt für die CO-Tiere mit 20,98 g, die ebenfalls signifikant leichter waren als die Tiere der HFD- und WSD-Gruppe (vgl. Abbildung 6 A). Das Körpergewicht der DIO-Gruppe mit 25,04 g zeigt sich zwar nicht

signifikant verändert, die Tendenz ist jedoch ein erhöhtes Gewicht als bei den Tieren der SD- und CO-Gruppe.

In Bezug auf das Sectiogewicht an G15,5 sieht man in Abbildung 6 B, dass die Mäuse aus der Gruppe SD mit 31,83 g und CO mit 30,35 g signifikant leichter waren als die Mäuse aus der HFD-Gruppe mit 35,73 g. Allerdings zeigt sich hier im Gegensatz zu G0 eine signifikante Veränderung von SD und CO zu DIO, welche mit 35,89 g deutlich schwerer waren. Es zeigten sich keine signifikante Veränderung zwischen DIO und WSD mit 33,95 g.

Die Wurfgröße könnte das Gewicht an G15,5 beeinflussen. Um dies auszuschließen, wurde auch die Wurfgröße ermittelt. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen, die Wurfgröße lag gemittelt über alle Gruppen bei 7,6 Feten pro Muttertier. Auch die Körperlänge der Tiere war zum Zeitpunkt der Sectio an G15,5 über alle Gruppen gemittelt mit 10,15 cm etwa gleich (vgl. Anhang, Abbildung 25 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Es ist daher wahrscheinlich, dass die detektierten Gewichtsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen weder durch eine unterschiedliche Wurfgröße noch durch eine signifikant veränderte Körperlänge verursacht wurden, sondern durch das Fettgewebe begründet ist.

In Abbildung 6 C ist das Gewicht des bei der Sectio an G15,5 entnommenen egWATs in Gramm zu sehen. Auffällig ist dabei, dass sowohl das egWAT der SD-Tiere mit 0,29 g als auch das der CO-Tiere mit 0,30 g signifikant leichter war als das egWAT der HFD-Tiere mit 0,95 g und der DIO-Tiere mit 0,86 g. Die Tiere der WSD-Gruppe zeigen mit 0,26 g keine signifikanten Veränderungen des egWAT-Gewichts im Vergleich zu anderen Versuchsgruppen. Um das Gewicht des egWATs zu normalisieren, wurde es auf das Sectiogewicht bezogen, indem ein Quotient aus den beiden Werten gebildet und das Ergebnis in % angegeben wurde (siehe Abbildung 6 D). Auch nach dieser Normalisierung war der Anteil des egWAT am Sectiogewicht bei der SD-Gruppe mit 0,88 % und der CO-Gruppe mit 0,99 % signifikant niedriger als der Anteil von 2,72 % bei HFD-Ernährung und 2,37 % bei Ernährung mit DIO. Im Vergleich zu den anderen Diäten war der Anteil des egWAT am Sectiogewicht in der WSD-Gruppe mit 0,80 % nicht signifikant verändert, auch eine eindeutige Tendenz lässt sich nicht feststellen.

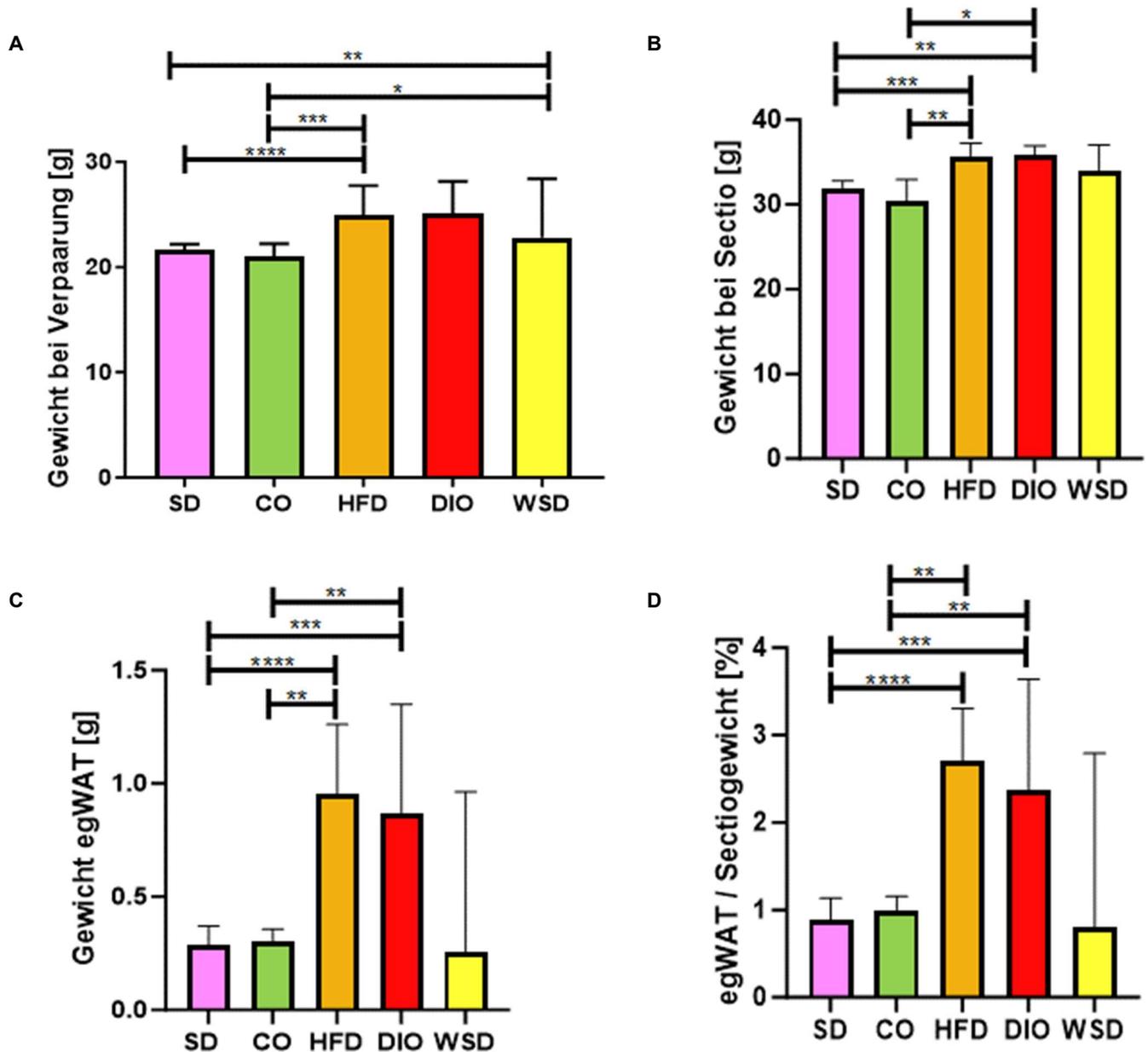


Abbildung 6: Körpergewicht und Gewicht des egWAT

Weibliche Wildtyp-Mäuse erhielten ab einem Alter von 3 Woche bis zum Versuchsende eine von fünf verschiedenen Diäten. Im Alter von 12 bis 16 Wochen wurden sie verpaart und bei den tragenden Tieren an G15,5 eine Sectio caesarea vorgenommen. Sowohl vor der Verpaarung als auch am Tag der Sectio wurden die weiblichen Mäuse gewogen. Im Rahmen der Präparation wurde das epigonadale Fettgewebe (egWAT) entnommen, gewogen und für die weiteren Versuche asserviert. Die statistische Auswertung erfolgt mittels *GraphPad Prism 8*.

Dargestellt sind Mediane mit IQR, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***

n: SD = 13, CO = 5, HFD = 11, DIO = 7, WSD = 5

A Körpergewicht bei Verpaarung (G0) in g

B Körpergewicht bei Sectio (G15,5) in g

C Gewicht des egWAT an G15,5 in g

D Anteil des egWAT am Sectiogewicht in %

4.1.2 Futter- und Wasseraufnahme

Nach der Verpaarung über Nacht mit gesunden Böckchen wurden mittels spezieller Futterraufen und Trinkflaschen die aufgenommene Futter- und Wassermenge ermittelt. Die Mengen wurden anschließend auf 24-Stunden berechnet.

In Abbildung 7 ist die Wasseraufnahme der weiblichen Mäuse in ml pro Maus pro Tag abgebildet. Durchschnittlich nahmen SD-Tiere 5,07 ml Wasser pro Tag auf, signifikant mehr als in allen anderen Gruppen. HFD-Tiere tranken etwa 3,65 ml, CO-Tiere 3,33 ml, DIO-Tiere 3,44 ml und WSD-Tiere 3,47 ml Wasser täglich.

Bei der Gesamtfutteraufnahme in kcal pro Maus pro Tag, die in **Abbildung 8** dargestellt ist, zeigt sich, dass die WSD-Versuchstiere mit durchschnittlich 17,06 kcal signifikant mehr Kalorien pro Tier und Tag aufnahmen als die CO- (13,29 kcal), HFD- (14,01 kcal) und DIO-Versuchstiere (14,41 kcal). Die Futteraufnahme aller anderen Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

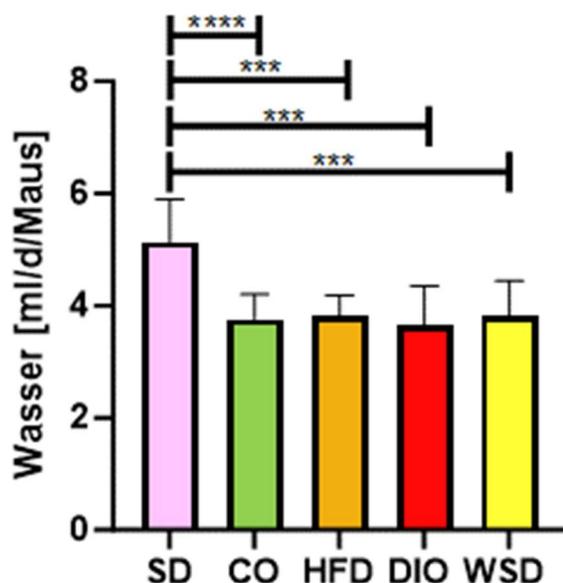


Abbildung 7: Wasseraufnahme der weiblichen Mäuse während der Trächtigkeit

Übersicht der Wasseraufnahme nach der Verpaarung von weiblichen C57BL/6N Wildtyp-Mäusen mit gesunden Böckchen über Nacht bis zur Sectio an G15,5. Die Messung der Wasseraufnahme erfolgte mittels präparierter Trinkflaschen, deren Wasserentnahme alle 24 Stunden dokumentiert wurde. Die Daten sind in ml pro Maus pro Tag angegeben.

Dargestellt sind Mediane mit IQR, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***

n: SD = 13, CO = 14, HFD = 11, DIO = 14, WSD = 13

Die Abbildung 9 zeigt die Futteraufnahme der Tiere sowohl insgesamt als auch auf die Bestandteile Zucker und Fett aufgeteilt in Gramm. Abbildung 9 A zeigt den Verlauf der Gesamtfutteraufnahme über die Gestationszeit in g pro Tag. Deutlich zu sehen ist die höchste Futteraufnahme bei den Tieren der SD-Gruppe mit durchschnittlich 4,77 g pro Tag und Maus. Die Futteraufnahme aller anderen Gruppen liegt deutlich näher beieinander, über alle Gruppen gemittelt bei 3,02 g pro Maus und Tag. Die zwei in dieser Arbeit besonders wichtigen Makromoleküle Zucker und Fett wurden genauer betrachtet. Abbildung 9 B bildet die Fettaufnahme über den Gestationszeitraum ab. Führend waren die Tiere der HFD-Gruppe mit durchschnittlich 0,91 g Fett pro Maus pro Tag, gefolgt von sehr ähnlichen Werten für DIO-Tiere und WSD-Tiere (jeweils gerundet 0,75 g Fett/Maus/Tag). Deutlich weniger Fettaufnahme finden sich bei Tieren der SD- und CO-Gruppe (gemittelt 0,16 g Fett/Maus/Tag).

Der zweite hier besonders relevante Bestandteil der verschiedenen Futterarten ist der Zuckergehalt, welche in Abbildung 9 C dargestellt ist. Die tägliche Zuckeraufnahme pro Maus ist bei WSD mit 1,27 g pro Tag deutlich am höchsten. Die zweithöchste Zuckeraufnahme zeigt sich bei Tieren der DIO-Gruppe mit 0,99 g Zucker pro Tier und Tag. Deutlich geringer fällt die Zuckeraufnahme in SD-, HFD- und CO-Gruppe aus, gemittelt liegt der Wert bei 0,30 g Zucker pro Maus und Tag.

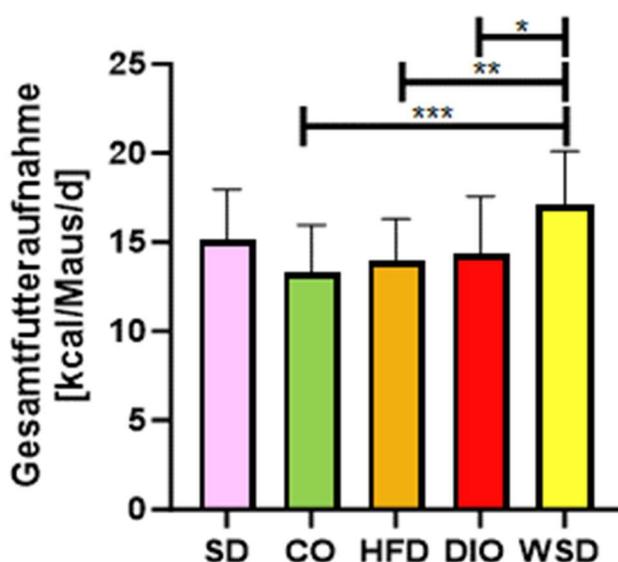


Abbildung 8: Gesamtfutteraufnahme der fünf Versuchsgruppen

Übersicht der Gesamtfutteraufnahme nach der Verpaarung von weiblichen C57BL/6N Wildtyp-Mäusen mit gesunden Böckchen über Nacht. Die Messung der Futteraufnahme erfolgte mittels spezieller Futterraufen. Hier ist die Gesamtfutteraufnahme in kcal pro Maus pro Tag dargestellt.

Dargestellt sind Mediane mit IQR, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***

n: SD = 17, CO = 15, HFD = 16, DIO = 16, WSD = 14

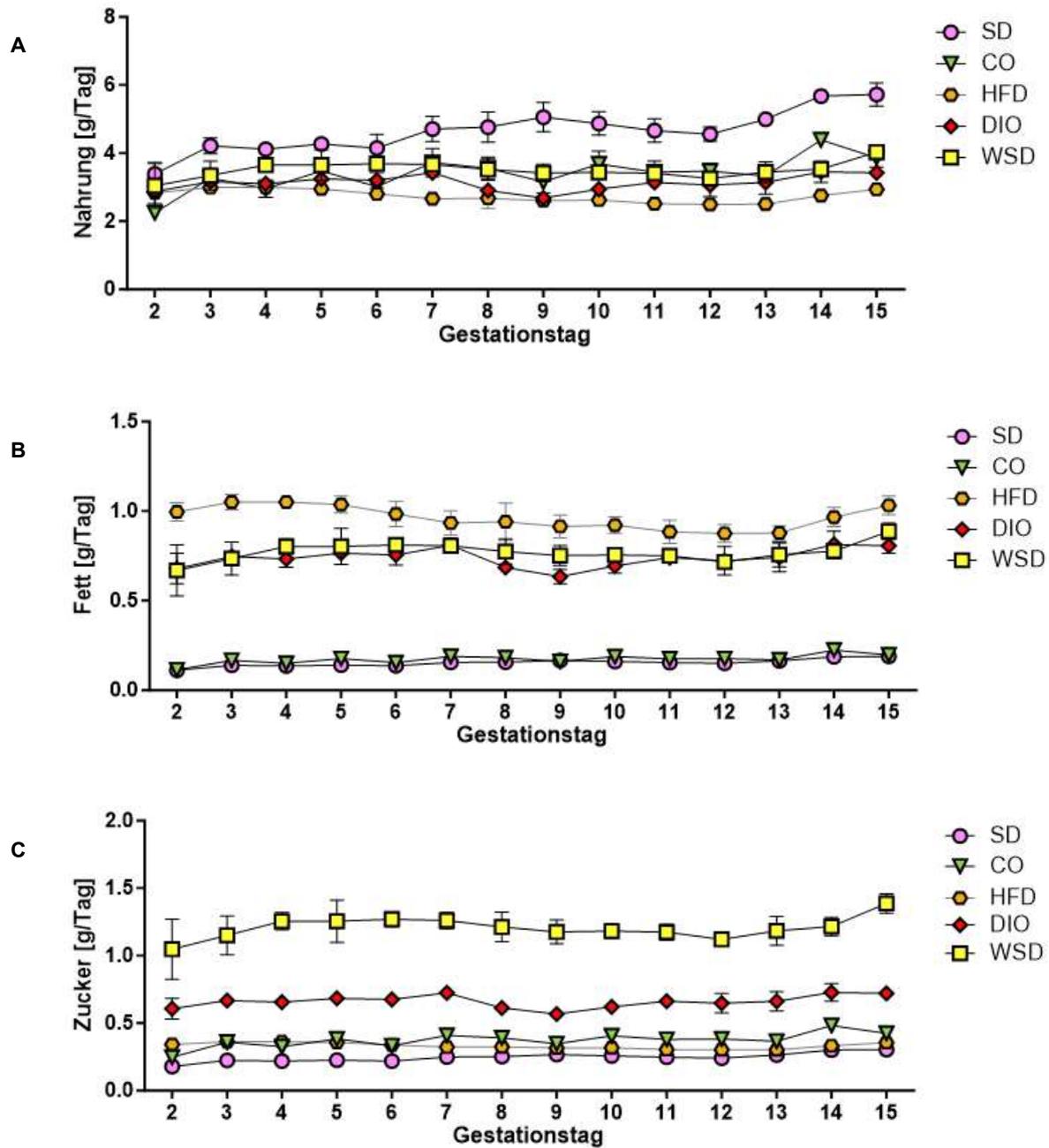


Abbildung 9: Futteraufnahme der Versuchstiere über den Gestationszeitraum

Übersicht der Futteraufnahme nach der Verpaarung von weiblichen C57BL/6N Wildtyp-Mäusen mit gesunden Böckchen über Nacht. Die Messung der Futteraufnahme erfolgte mittels spezieller Futterraufen.

Die Daten wurde tageweise über alle Gestationstage aufgetragen, die Angaben erfolgten in g pro Tag.

n: SD = 17, CO = 15, HFD = 16, DIO = 16, WSD = 14

A Gesamtfutteraufnahme in g/Tag

B Fettaufnahme in g/Tag

C Zuckeraufnahme in g/Tag

4.1.3 Schwierigkeiten im Rahmen der Zucht unter der CO- und WSD-Diät

Im Verlauf des Tierversuchs zeigten sich Probleme mit der Zucht der Tiere der CO- und WSD-Gruppe. So fiel bereits bei der Bestimmung der Trächtigkeitsrate nach einer Verpaarung über Nacht auf, dass die Weibchen der WSD-Gruppe mit 27,59 % deutlich seltener trächtig wurden als beispielsweise Tiere der HFD-Gruppe (34,78 %). Die Trächtigkeitsraten lagen für Tiere der CO-Gruppe mit 34,62 % zwar auch unter der Rate der Tiere der SD- (34,78 %), HFD- und DIO-Gruppe (38,10 %), jedoch nur geringfügig.

Darüber hinaus zeigten sich Auffälligkeiten bei weiteren Tieruntersuchungen mit modifiziertem Versuchsaufbau in der Arbeitsgruppe. Dort wurden weibliche Mäuse unter zu in Kapitel 2.2.1. beschriebenen identischen Bedingungen gehalten und verpaart, allerdings konnten die Tiere spontan gebären, während bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tieren an G15,5 eine Sectio durchgeführt wurde. Bei den spontan gebärenden Tieren wurde die Überlebensrate der Nachkommen bei Geburt, am zweiten Lebenstag sowie am Lebenstag 21 bestimmt.

Tabelle 9: Trächtigkeits- und Überlebensrate der Nachkommen von C57BL/6N Wildtyp-Mäusen der fünf verschiedenen Diätgruppen bei spontanem Wurf, sowie an Tag 2 und bis Tag 21 in Prozent

Weibliche C57BL/6N Wildtyp-Mäuse aller fünf Versuchsgruppen wurden im Alter von 12 bis 16 Wochen über Nacht mit gesunden normalgewichtigen Böckchen verpaart. Im weiteren Verlauf wurde die Trächtigkeitsrate bestimmt. Einige Muttertiere konnten spontan werfen, um die Nachkommen weiter untersuchen zu können. Für dieses Projekt wurden die Anzahl an lebendig geborenen Feten, sowie die Überlebensrate der Nachkommen bis Tag 2 und bis Tag 21 ausgewertet. Die Ergebnisse werden in Prozent (%) angegeben.

n: SD = 14, CO = 5, HFD = 11, DIO = 7, WSD = 5

	SD	CO	HFD	DIO	WSD
Trächtigkeitsrate [%]	34,78	34,62	34,62	38,10	27,59
Lebendig geboren [%]	98,73	87,1	89,04	97,78	73,21
Überlebensrate an Tag 2 [%]	97,44	94,12	89,23	90,91	82,93
Überlebensrate bis Tag 21 [%]	100	81,48	100	94,44	100

Anhand der in Tabelle 9 gezeigten Daten sieht man, dass der Anteil der lebendig geborenen Nachkommen bei Ernährung der Mutter mit CO (87,1 %) oder WSD (73,21 %) geringer ausfällt als bei Ernährung mit den anderen Diäten (SD 98,73 %, HFD 89,04 %, DIO 97,78 %). Während am zweiten Lebenstag vor allem die geringe Überlebensrate der Nachkommen der WSD mit nur 82,93 % auffällt, ist die Überlebensrate zwischen dem 2. bis zum 21. Lebenstag bei den Nachkommen der CO-Tiere mit nur 81,48 % besonders niedrig.

In Zusammenschau dieser Analysen wurde entschieden, dass sowohl die CO-Diät als auch die WSD für Zuchtzwecke bei Mäusen nur wenig geeignet erscheinen, da sowohl die Trächtigkeitsrate, vor allem bei WSD-Ernährung, als auch das Langzeitüberleben der Nachkommen geringer als in allen anderen untersuchten Gruppen ist.

Deswegen werden diese Diäten im Folgenden zwar noch weiter untersucht, die Vergleiche SD vs. CO, CO vs. HFD, CO vs. DIO sowie CO vs. WSD entfallen jedoch bei der besonders aufwändigen Auswertung des Proteomics-Screens.

4.2 Quantifizierung der Fettgewebsvolumen mittels μ CT (Mikro-Computertomographie)

Bei nicht tragenden Mäusen der fünf Versuchsgruppen wurde mittels μ CT von der Phenotyping Core Facility des Max-Planck-Instituts für Biologie des Alterns das Fettgewebe quantifiziert. In Abbildung 10 werden links das subkutane, mittig das viszerale und rechts beide Fettgewebsarten graphisch dargestellt. Da es sich um eine dreidimensionale Darstellung handelt, erfolgt aus Gründen der Übersichtlichkeit hier keine Darstellung des Maßstabs. Die Abbildungen derselben Maus (also einer Zeile) sind jedoch maßstabsgetreu. Eine beispielhafte Darstellung einer Maus der CO-Gruppe mit Maßstab findet sich im Anhang (vgl. Anhang, Abbildung 26 auf Seite 188).

Auf den bestimmten Daten von Gesamtvolumen, Gesamtfettvolumen sowie dem Volumen des viszeralen Fettgewebes basiert Abbildung 11. In Abbildung 11 A wird der Quotient aus Gesamtfettvolumen und Gesamtvolumen in % dargestellt. Hier zeigt sich deutlich, dass die Tiere der SD-Gruppe mit 3,70 % signifikant weniger Gesamtfettanteil ausbilden als die Tiere der diätinduzierten Übergewichts-Versuchsgruppen (DIO 23,14 %, WSD 27,28 %, HFD 29,51 %). Ebenso signifikant verringert ist das Verhältnis von Gesamtfett zu Körpervolumen zwischen der CO-Gruppe (6,30 %) und den WSD-Tieren. In Abbildung 11 B ist das Volumen des viszeralen Fettgewebes bezogen auf das Gesamtvolumen der Mäuse dargestellt. Hierbei zeigt sich bei den SD-Tieren mit 1,19 % ein signifikant geringerer Anteil als bei den Tieren der HFD-, DIO- und WSD-Gruppe, gefolgt von der CO-Gruppe mit 2,40 %, welche ein signifikant geringeres Verhältnis aufweist als die Tiere der WSD-Versuchsgruppe. Der Anteil des viszeralen Fettgewebes am Gesamtvolumen liegt bei der DIO-Gruppe bei 8,32 %, in der WSD-Gruppe bei 8,89 % und ist in der HFD-Gruppe mit 10,16 % am höchsten.

A



B



C

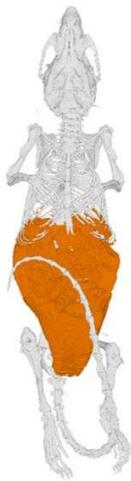




Abbildung 10: μ CT der nicht-tragenden Mäuse

Weibliche Wildtyp-Mäuse wurden im Alter von 3 Wochen bis Versuchsende eine der fünf folgenden Diäten verfüttert: Standard-Diät (SD), Kontroll-Diät (CO), Hochfett-Diät (HFD), Übergewichtsinduzierende-Diät (DIO) oder westliche Diät (WSD). Wurden die Weibchen nach bis zu 3 Verpaarungsversuchen über Nacht im Alter von 12-16 Wochen nicht tragend, wurden einige Tiere durch zervikale Dislokation getötet und mittels eines μ CTs eingescannt. Anschließend erfolgt eine computergestützte Bildauswertung durch die Phenotyping Core Facility des Max Plank Insituts für Biologie des Alterns. Jeweils links und etwas heller abgebildet ist das subkutane Fettgewebe (scWAT). In der Mitte etwas dunkler ist das epigonadale Fettgewebe (egWAT) dargestellt. Rechts sieht man in der 3D-Darstellung beide Fettgewebsarten gemeinsam dargestellt.

Aufgrund der 3D-Darstellung ist kein Maßstab abgebildet, aber alle Bilder einer Zeile sind maßstabsgetreu dargestellt.

- A Maus der SD-Gruppe
- B Maus der CO-Gruppe
- C Maus der HFD-Gruppe
- D Maus der DIO-Gruppe
- E Maus der WSD-Gruppe

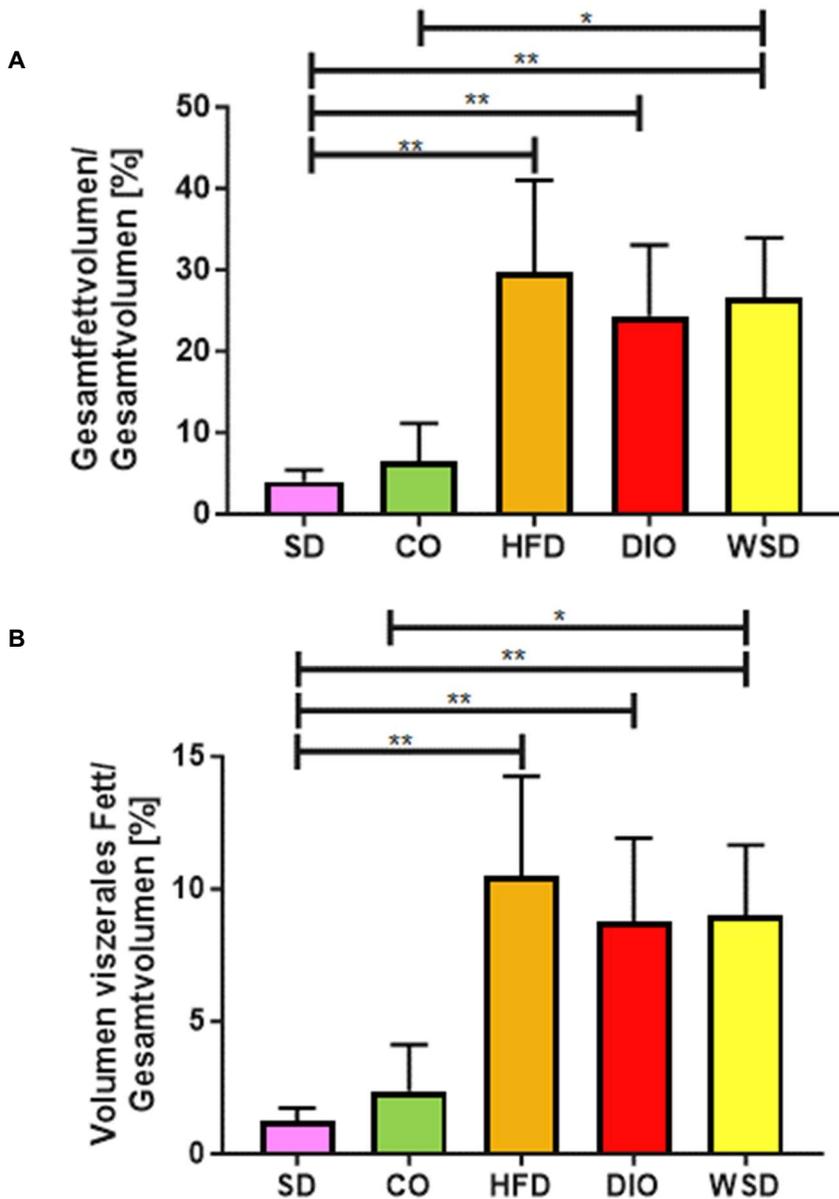


Abbildung 11: Ergebnisse der μ CT-Auswertung nicht tragender Mäuse

Weibliche Wildtypmäuse wurden im Alter von 3 Wochen in fünf verschiedene Versuchsgruppen eingeteilt und erhielten über den gesamten Versuchszeitraum jeweils eine dieser fünf Futterarten: Standard- (SD), Kontroll- (CO), Hochfett- (HFD), Übergewichtsinduzierende- (DIO) oder westliche Diät (WSD). Im Alter von 12-16 Wochen wurden 1-3 Verpaarungsversuche unternommen. Einige der Mäuse die nicht trächtig wurden, wurden durch zervikale Dislokation getötet und für die vorliegende Untersuchung in einem μ CT gescannt. Computergestützt wurden die erhaltenen Bilder anschließend segmentiert, um das Gesamtvolumen sowie das Fettvolumen zu bestimmen. Die Bauchmuskelwand wurde als Orientierung genutzt, um das viszerale vom subkutanen Fettgewebe abzugrenzen.

Dargestellt sind Mediane mit IQR, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***

n: SD = 5, CO = 4, HFD = 6, DIO = 6, WSD = 5.

A Volumen des gesamten Fettgewebes/Gesamtvolumen in %

B Volumen des viszeralen Fettgewebes/Gesamtfettvolumen in %

4.3 Morphologische Analyse der Fettgewebszellen

Von den bei der Präparation formalin-konservierten Anteilen des egWAT und scWAT wurden zunächst 5 µm dicke Schnitte hergestellt, anschließend HE-gefärbt, eingedeckt und mittels eines Slide-Scanners digitalisiert. Die anschließende computergestützte Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben mithilfe des Programms *QuPath* und *Image-J*. Abbildung 12 zeigt die finale Auswertung der Fettzellen mittels *Adiposoft*.

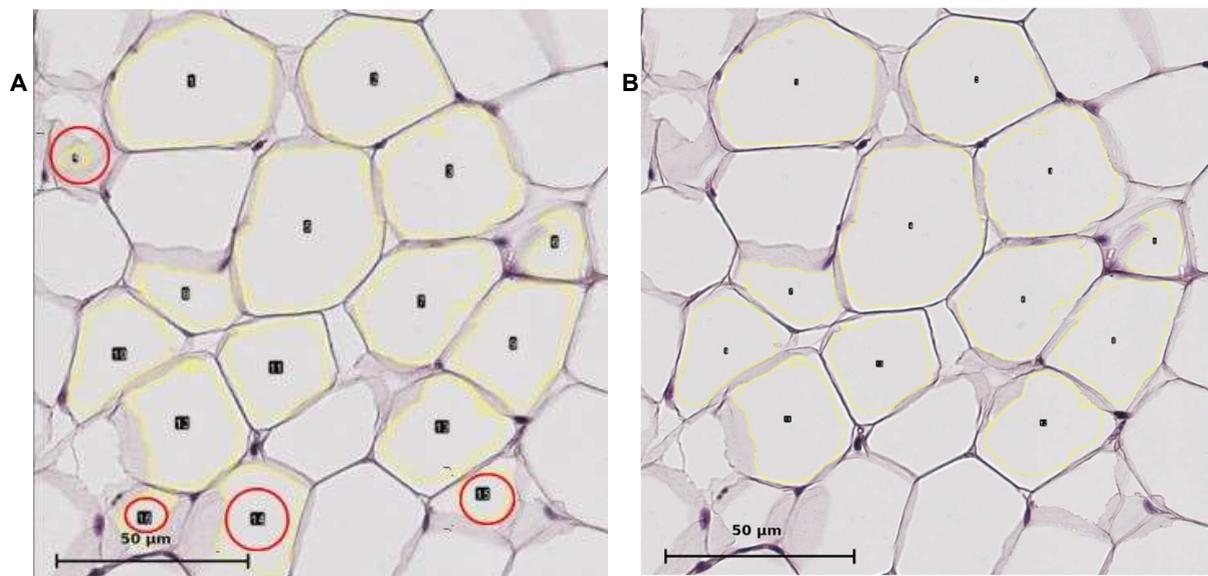


Abbildung 12: Auswertung der Fettzellen des egWATs eines Tieres der WSD-Versuchsgruppe mittels *Adiposoft* von *Image-J*

Im Rahmen der Präparation an G15,5 wurden den Versuchstieren egWAT- und scWAT-Proben entnommen. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und anschließend an einem Rotationsmikrotom 5 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt und dann mit Hilfe eines Slide-Scanners in 40-facher Vergrößerung eingescannt. Es erfolgte eine computergestützte Bildauswertung mittels *QuPath* und *Adiposoft*.

Scalebar = 50 µm

A Ausschnitt aus Abbildung 4 D nach der automatischen Bearbeitung durch *Adiposoft*. Dabei markiert *Adiposoft* computergestützt alle Strukturen, die vom Programm als Zellen erkannt wurden (siehe Kapitel 3.3.1.4). Die markierten Zellen 4, 14, 15 und 16 (rote Kreise) entsprechen nicht den in Kapitel 3.3.1.3 genannten Einschlusskriterien.

B Bildausschnitt aus Abbildung A nach der Entfernung aller Zellen, die nicht den Kriterien entsprechen. Alle nun gelb umrandeten Zellen wurden anschließend automatisiert durch *Adiposoft* ausgewertet

In Abbildung 13 A ist die mittlere Fläche der Fettzellen des egWAT dargestellt. Man sieht, dass die Fettzellen der SD-Tiere mit $1281,32 \mu\text{m}^2$ flächenmäßig signifikant kleinere sind als die Fettzellen der CO-Tiere mit $1449,98 \mu\text{m}^2$, der HFD-Tiere mit $2738,53 \mu\text{m}^2$ und der Tiere der DIO-Diät mit $2043,29 \mu\text{m}^2$. Ebenfalls signifikant ist der Unterschied zwischen CO und HFD, zwischen HFD und WSD ($1548,05 \mu\text{m}^2$) sowie zwischen DIO und WSD.

Abbildung 13 C stellt den mittleren Durchmesser der Fettzellen des egWAT dar. Der mittlere Durchmesser der Fettzellen der Tiere, die SD verfüttert bekommen hatten, ist mit $39,13 \mu\text{m}$ signifikant geringer als der der HFD-Tiere mit $55,92 \mu\text{m}$ und der der DIO-Tiere mit $47,51 \mu\text{m}$. Auch bei der CO-Gruppe war der mittlere Durchmesser mit $41,69 \mu\text{m}$ signifikant geringer als der der HFD-Tiere. Der Durchmesser des egWAT der WSD-Versuchsgruppe war mit $42,22 \mu\text{m}$ nicht signifikant gegenüber anderen Versuchsgruppen verändert.

Abbildung 13 B stellt die mittlere Fläche der Fettzellen des scWAT in μm^2 dar. Dabei hatten die Fettzellen der SD-Gruppe mit $760,00 \mu\text{m}^2$ eine signifikant geringere Fläche als der Tiere der HFD-Gruppe ($1613,99 \mu\text{m}^2$) oder derjenigen, die DIO erhielten ($1905,37 \mu\text{m}^2$). Ebenfalls signifikant war der Unterschied zum einen zwischen CO-Diät mit einer Fläche von $986,64 \mu\text{m}^2$ und den Tieren der HFD-Gruppe, zum anderen zwischen CO- und den Tieren der DIO-Gruppe. Die WSD-Versuchstiere zeigen mit einer Fettzellfläche von $1020,06 \mu\text{m}^2$ nur eine Tendenz zu einer größeren scWAT Fettzellfläche als die Tiere der SD- und CO-Gruppe.

Ein ähnliches Bild zeigt sich in Abbildung 13 D, in der der mittlere Durchmesser der Fettzellen des scWATs abgebildet ist. Der Durchmesser bei DIO-Tieren ist mit $46,60 \mu\text{m}$ signifikant größer als der Durchmesser bei SD-Tiere mit $29,72 \mu\text{m}$ und bei CO-Tiere mit $33,86 \mu\text{m}$. Signifikant ist außerdem der Unterschied zwischen CO- und HFD-Gruppe ($43,60 \mu\text{m}$). Auch Tiere der WSD-Versuchsgruppe zeigen mit $34,43 \mu\text{m}$ eine Tendenz zu einem vergrößerten Fettzelldurchmesser als Tiere der SD- und CO-Versuchsgruppe.

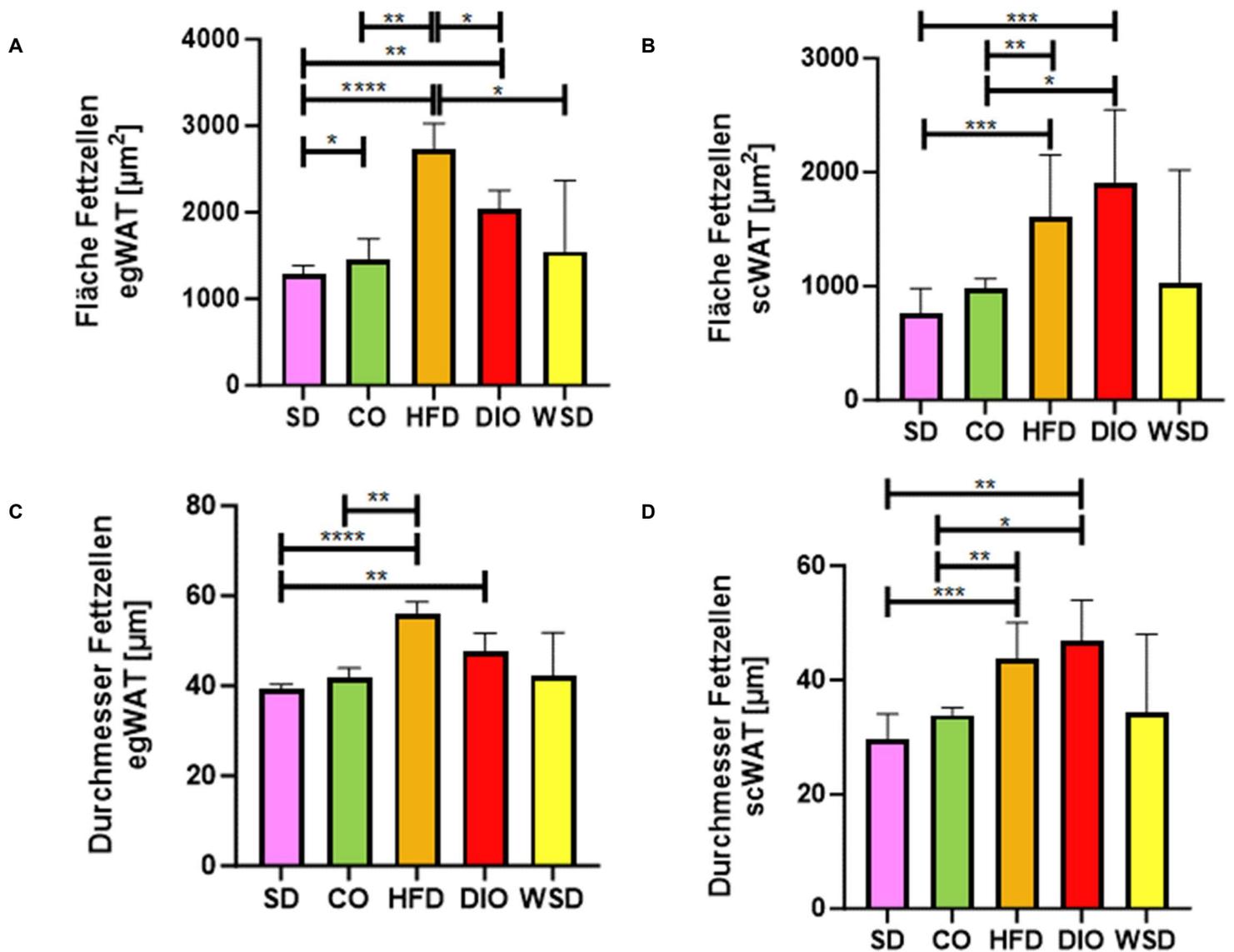


Abbildung 13: Auswertung der histologischen Untersuchungen der Fettzellen

Im Rahmen der Präparation an G15,5 erfolgte die Entnahme von subkutanem (scWAT) und epigonadalem Fettgewebe (egWAT). Beide Gewebsarten wurden in Paraffin gegossen, dann mit einem Rotationsmikrotom 5 μm dicke Schnitt angefertigt und diese mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Mit Hilfe eines Slide-Scanners wurden die Fettgewebsschnitt in 40-facher Vergrößerung eingescannt und anschließend computergestützt mithilfe von *QuPath* und *Adiposoft* ausgewertet. Die Fläche der Fettzellen wird in μm^2 , der Durchmesser der Fettzellen in μm angegeben.

Dargestellt sind Mediane mit IQR, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***

n egWAT: SD = 14, CO = 5, HFD = 11, DIO = 7, WSD = 5

n scWAT: SD = 13, CO = 5, HFD = 11, DIO = 7, WSD = 5

A Fläche der Fettzellen des egWAT in μm^2

B Fläche der Fettzellenn des scWAT in μm^2

C Durchmesser der Fettzellen des egWAT in μm

D Durchmesser der Fettzellen des scWAT in μm

4.4 Proteomics-Screen

Mit Hilfe der Proteomics-Facility des CECAD konnte das Gesamtproteom des egWAT der fünf verschiedenen Versuchsgruppen untersucht und insgesamt 3.577 Proteine identifiziert werden. Dabei wurden nach aufwendiger computergestützter Auswertung (siehe Kapitel 3.3.3.5) diejenigen Veränderungen als signifikant gewertet, welche $\approx 1,5$ fach hoch- oder herunterreguliert waren und einen q-Wert kleiner 0,05 besaßen. Dadurch konnte die Anzahl an relevanten Proteinen auf 1.128 reduziert werden.

Aufgrund der Schwierigkeiten in der Zucht mit CO- und WSD-Diät (siehe Kapitel 4.1.2) wurde die Anzahl an Vergleichen auf die folgenden fünf reduziert: HFD vs. SD, DIO vs. SD, WSD vs. SD, DIO vs. HFD, WSD vs. HFD.

Weiter betrachtet wurden (wenn nicht anders angegeben) nur diejenigen signifikanten Proteine, die entweder in allen Proben einer Gruppe nachgewiesen werden konnten (valid values = 5) oder in keiner Probe einer Gruppe detektiert wurden (valid values = 0). So wurden Proteine mit folgenden valid values eingeschlossen: 5 vs. 5, 0 vs. 5 und 5 vs. 0. Dadurch wurden 900 Proteine weiter betrachtet, eine detailliertere Aufführung der Anzahl untersuchter Proteine je Vergleich erfolgt in Tabelle 10.

Tabelle 10: Anzahl der betrachteten Proteine nach dem Proteomic-Screen

An G15,5 wurden den tragenden Tieren im Rahmen einer Sectio caesarea egWAT entnommen. Jeweils fünf Tiere aus jeder Gruppe wurden ausgewählt und aus dem egWAT die enthaltenen Proteine isoliert. Diese wurden mittels LC-MS detektiert und computergestützt weiter analysiert. Hier gezeigt sind die weiter untersuchten Vergleiche jeweils mit Gesamtzahl der signifikanten Proteine (Fold-Change 1,5; q-value < 0,05) sowie die Anzahl an signifikanten Proteine mit 5 vs. 5, 5 vs. 0 oder 0 vs. 5 valid values.

Vergleiche	Gesamtzahl signifikanter Proteine	davon Proteine mit valid values 5 vs. 5, 5 vs. 0 oder 0 vs. 5
HFD vs. SD	258	203
DIO vs. SD	255	191
WSD vs. SD	293	241
DIO vs. HFD	101	77
WSD vs. HFD	221	188
Gesamtanzahl	1.128	900

4.4.1 Principal Component Analysis (PCA)

Zunächst erfolgte eine PCA aller 3.577 detektierten Proteine. Abbildung 14 zeigt die globale Proteinexpression im egWAT der tragenden Mäuse der fünf verschiedenen Diätgruppen. Deutlich unterscheidet sich das Expressionsmuster der HFD- und SD-Gruppen, welche sichtbar isoliert abgebildet sind. Während sich die Proteinexpression der CO-Gruppe relativ eng beieinander gruppiert, sieht man bei der DIO- und WSD-Gruppe eine breite, sich teilweise überlappende Streuung.

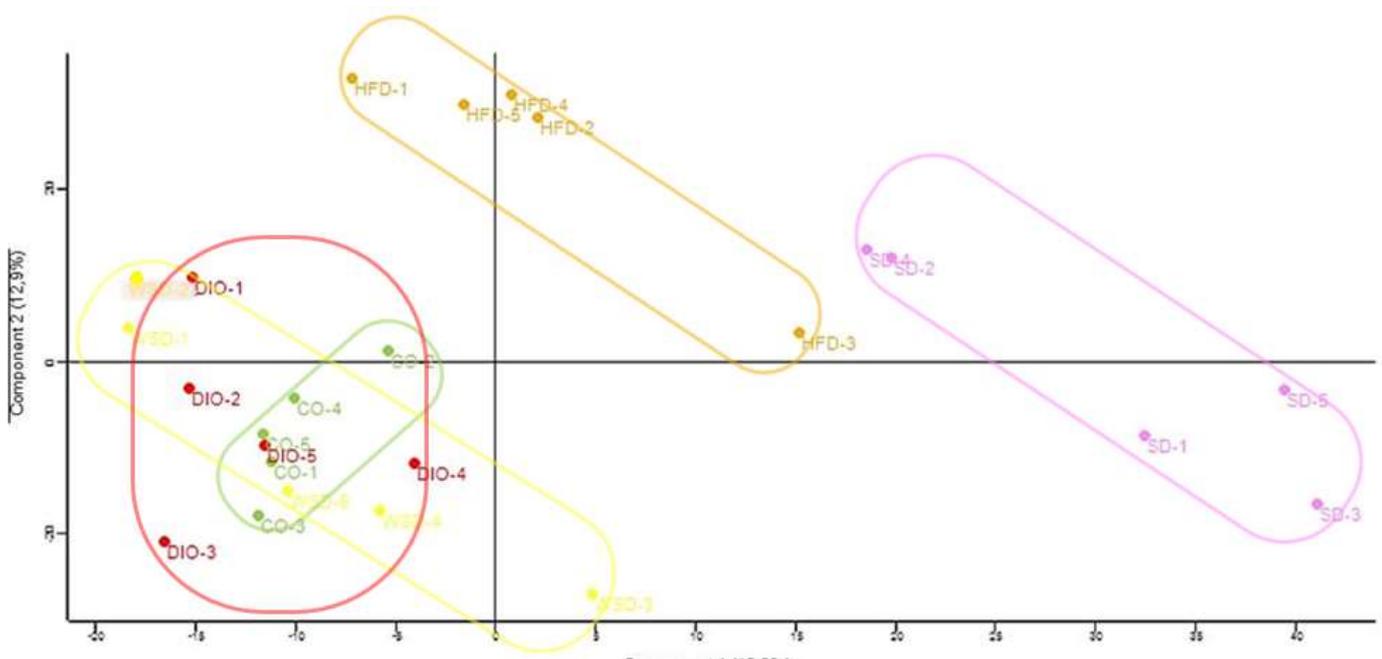


Abbildung 14: Principal Component Analysis (PCA) aller detektierten Proteine des egWATs an G15,5

Nach Entnahme von egWAT an G15,5 wurde daraus die vorhandenen Proteine isoliert und durch die Proteomic Facility anschließend mittels LC-MS detektiert. Es erfolgte eine aufwendige computergestützte Analyse mittels der Software *MaxQuant* und *Perseus 1.6.1.1*, mit deren Hilfe auch die PCA erstellt wurde.

n: SD = 5, CO = 5, HFD = 5, DIO = 5, WSD = 5

SD = Standard-Diät, rosa

CO = Kontroll-Diät, grün

HFD = Hochfett-Diät, orange

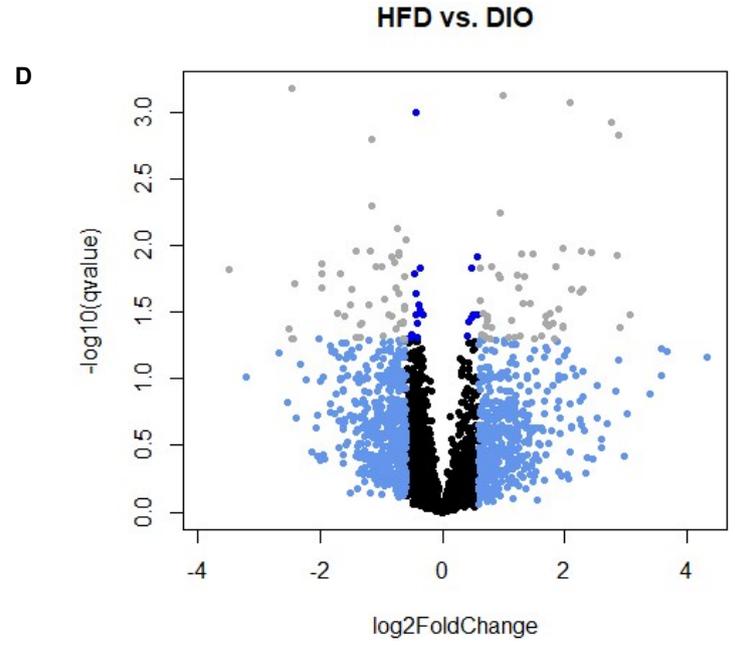
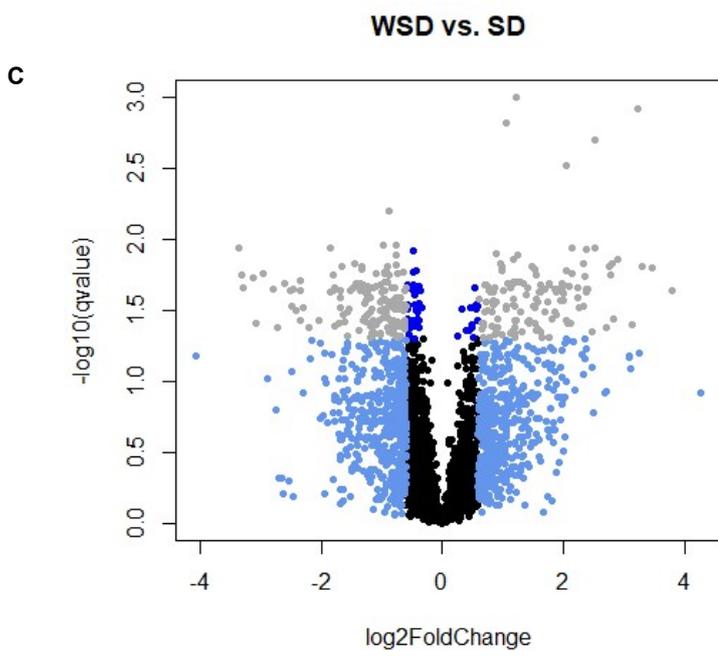
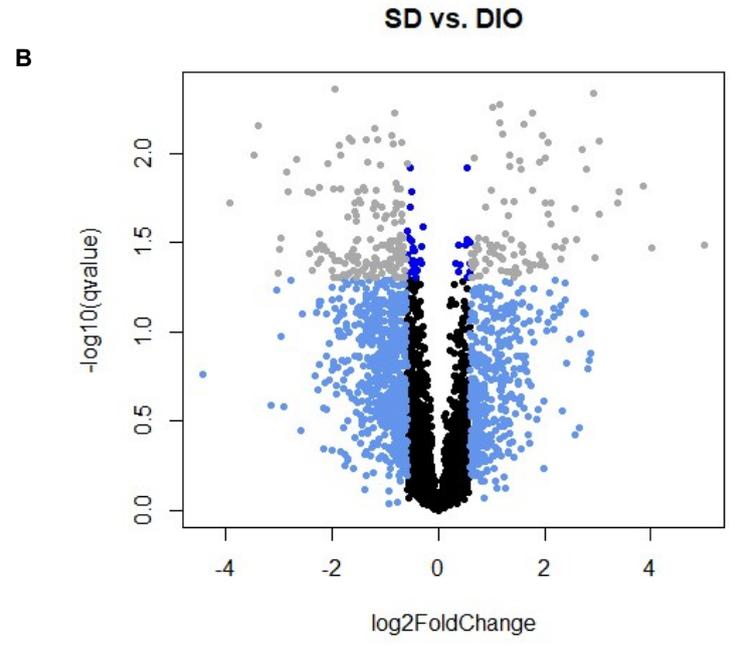
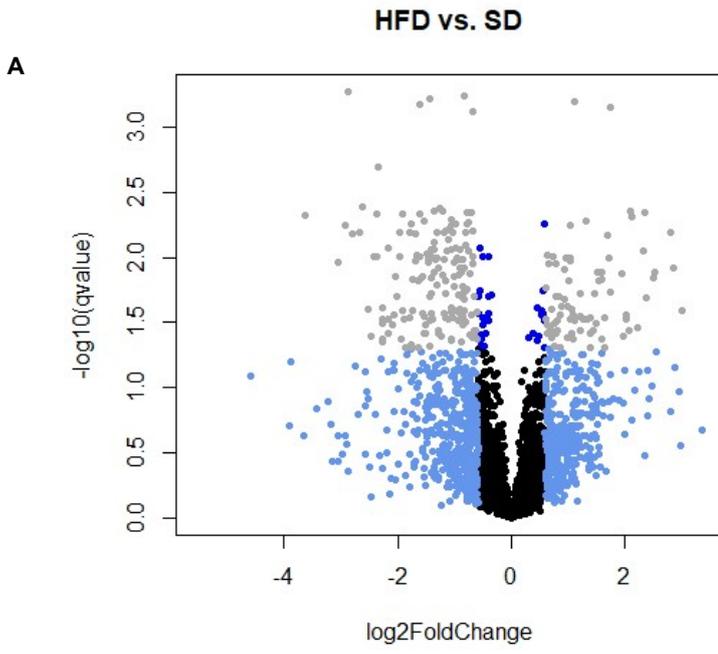
DIO = Übergewichtsinduzierende-Diät, rot

WSD = Westliche Diät, gelb

4.4.2 Volcano Plots

Nach der Darstellung aller identifizierten Proteine als PCA erfolgte die weitere Darstellung aller Proteine mit Hilfe des Programms *RStudio*. Abgebildet wurden die Proteine der verschiedenen Vergleiche, wobei die signifikant veränderten Proteine mit einem Fold-Change von mind. 1,5 und einem q-Wert $< 0,05$ in grau dargestellt sind. Proteine, die nicht diesen Kriterien entsprechen, wurden in verschiedenen Blautönen und schwarz dargestellt (siehe Abbildung 15).

In der Übersicht der verschiedenen Volcano Plots sieht man, dass die Analyse WSD vs. SD (Abbildung 15 C) mehr signifikante Ergebnisse ergeben hat als die Vergleiche HFD vs. SD (Abbildung 15 A) und DIO vs. SD (Abbildung 15 B). Im Gegensatz dazu scheint es, dass im Vergleich DIO vs. HFD (Abbildung 15 D) deutlich weniger signifikante Proteine detektiert wurden als in den anderen Vergleichen. Insgesamt zeigen sich also deutliche Unterschiede zwischen den fünf untersuchten und hier abgebildeten Vergleichen (siehe auch Tabelle 11).



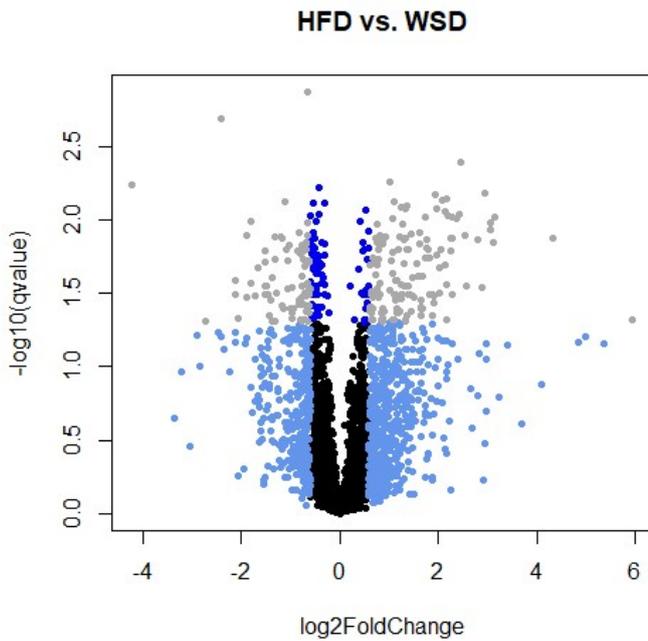
E

Abbildung 15: Volcano Plots der im egWAT detektierten Proteine an G15,5

Nach Entnahme des egWAT an G15,5 wurden daraus die vorhandenen Proteine isoliert und durch die Proteomic Facility anschließend mittels LC-MS detektiert. Es erfolgte eine aufwendige computergestützte Analyse mittels der Software *MaxQuant* und *Perseus 1.6.1.1*, sowie die vorliegende Darstellung mit *RStudio*. Zu sehen sind jeweils alle identifizierten Proteine zweier Vergleichsgruppen, sowie die dazugehörigen Fold-Changes und q-Werte in logarithmischer Darstellung. Die Fold-Change gibt dabei die Hoch- bzw. Runterregulation an, während es sich bei den q-Werten um auf multiples Testen korrigierte p-Werte handelt. In grau abgebildet sind die signifikant veränderten Proteine, welche also mindestens 1,5fach Hoch- oder Herunterreguliert und einen q-Wert < 0,05 besitzen. Die Punkte in unterschiedlichen Blautönen sowie in schwarz stehen für Proteine, deren Fold-Change < 1,5 oder q-Wert > 0,05 beträgt ($\pm 0,59$ log2Fold-Change und q-Wert > 0,05).

Farbkodierung: **grau** = Fold-Change > 1,5 & q-Wert < 0,05, **schwarz** = Fold-Change < 1,5 & q-Wert > 0,05;

hellblau = Fold-Change > 1,5 & q-Wert > 0,05; **dunkelblau** = Fold-Change < 1,5 & q-Wert < 0,05 ,

n: SD = 5, CO = 5, HFD =5, DIO = 5, WSD = 5

A HFD vs. SD

B DIO vs. SD

C WSD vs. SD

D DIO vs. HFD

E WSD vs. HFD

4.4.3 Venn-Diagramme

Nach der Darstellung aller Proteine in Volcano Plots wurden die Überschneidungen der detektierten Proteine zwischen den einzelnen Vergleichen untersucht. Dazu wurden nur die signifikant veränderten Proteine mit einem Fold-Change > 1,5 sowie einem p-Wert < 0,05 betrachtet. Außerdem wurden nur Proteine betrachtet, die entweder in 0 oder 5 Proben detektiert wurden, abgebildet (valid values: 0 bzw. 5). Nicht abgebildet wurden Proben mit valid values 0 vs. 0. Insgesamt entsprachen 900 Proteine diesen Kriterien (vergleiche Tabelle 10).

Anschließend wurden die Überschneidungen zwischen den unterschiedlichen Vergleichen näher betrachtet. Tabelle 11 zeigt die Übersicht über alle Überschneidungen. Es zeigt sich, dass es die meisten Überschneidungen (27,1 % bzw. 92 Proteine) zwischen SD vs. WSD und SD vs. DIO gibt. 22,7 % bzw. 49 Proteine überschneiden sich zwischen HFD vs. DIO und HFD vs. WSD. Ähnlich viele Überschneidungen finden sich zwischen SD vs. DIO und SD vs. HFD (13,9 % bzw. 48 Proteine), HFD vs. WSD und SD vs. WSD (15,6 % bzw. 58 Proteine) sowie SD vs. WSD und SD vs. HFD (11,8 % bzw. 47 Proteine).

Tabelle 11: Übersicht aller Überschneidungen der fünf verschiedenen Vergleiche

Nach Entnahme von egWAT an G15,5 wurde daraus die vorhandenen Proteine isoliert und durch die Proteomic Facility anschließend mittels LC-MS detektiert. Es erfolgte eine aufwendige computergestützte Analyse mittels der Software MaxQuant und Perseus 1.6.1.1, sowie die vorliegende Darstellung mit FunRich 3.1.3. Abgebildet sind nur signifikant veränderte Proteine (Fold-Change > 1,5, q-Wert < 0,05), wobei Proben mit 0 vs. 5, 5 vs. 0 und 5 vs. 5 valid values eingeschlossen wurden.

n: SD = 5, CO = 5, HFD = 5, DIO = 5, WSD = 5

HFD vs. SD					
HFD vs. WSD	18 (4,8%)				
HFD vs. DIO	6 (2,2%)	49 (22,7%)			
SD vs. DIO	48 (13,9%)	22 (6,2%)	23 (9,4%)		
SD vs. WSD	47 (11,8%)	58 (15,6%)	17 (5,6%)	92 (27,1%)	
	HFD vs. SD	HFD vs. WSD	HFD vs. DIO	SD vs. DIO	SD vs. WSD

Anschließend wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit jeweils drei Vergleiche mittels Venn-Diagramm graphisch dargestellt. Zuerst wurden SD vs. HFD, SD vs. DIO und SD vs. WSD in Abbildung 16 A dargestellt. Zwischen SD vs. HFD und SD vs. DIO überschneiden sich 20 Proteine, während sich 19 Proteine bei SD vs. HFD sowie SD vs. WSD überschneiden. 64 Proteine sind sowohl bei SD vs. DIO als auch SD vs. WSD detektiert worden. Insgesamt zeigen sich 28 Proteine in allen 3 Vergleichen signifikant verändert.

Daraufhin wurden die drei Vergleiche, welche die HFD enthielten, in Abbildung 16 B graphisch dargestellt: HFD vs. SD, HFD vs. DIO und HFD vs. WSD. Zwischen HFD vs. WSD und HFD vs. DIO überschneiden sich 45 Proteine, während sich 14 Proteine sowohl in HFD vs. WSD und HFD vs. SD finden. Nur 2 Proteine wurden in HFD vs. SD und HFD vs. DIO detektiert. Insgesamt sind 4 Proteine in allen drei Vergleichsgruppen signifikant verändert.

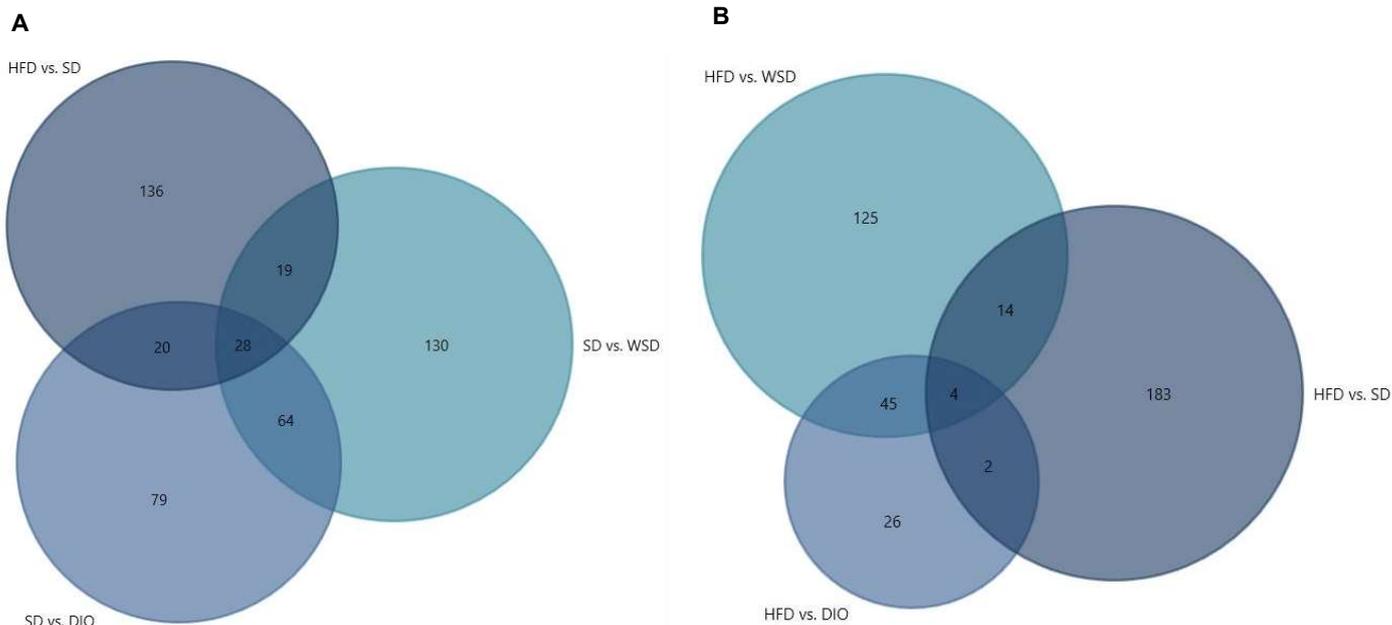


Abbildung 16: Venn Diagramme ausschließlich mit den signifikant veränderten Proteinen des egWAT an G15,5

Nach Entnahme von egWAT an G15,5 wurde daraus die vorhandenen Proteine isoliert und durch die Proteomic Facility anschließend mittels LC-MS detektiert. Es erfolgte eine aufwendige computergestützte Analyse mittels der Software *MaxQuant* und *Perseus 1.6.1.1*, sowie die vorliegende Darstellung mit *FunRich 3.1.3*. Abgebildet sind nur signifikant veränderte Proteine (Fold-Change > 1,5, q-Wert < 0,05), wobei Proben mit 0 vs. 5, 5 vs. 0 und 5 vs. 5 valid values eingeschlossen wurden.

n: SD = 5, CO = 5, HFD = 5, DIO = 5, WSD = 5

A Überschneidungen der Vergleiche: SD vs. HFD, SD vs. DIO, SD vs. WSD

B Überschneidungen der Vergleiche: HFD vs. SD, HFD vs. DIO, HFD vs. WSD

4.4.4 String-Analyse

Um die immer noch große Anzahl an identifizierten Proteinen zu reduzieren und für diese Studie interessante Proteine zu identifizieren, wurde die Software *STRING* in Kombination mit einer schlagwortbasierten Methode angewendet.

Um die große Anzahl an signifikanten Proteinen weiter zu untersuchen und die Ergebnisse weiter zu spezifizieren, wurde sich für die weitere Analyse dazu entschieden nur solche Proteine weiter zu analysieren, die folgende valid values hatten: 5 vs. 5, 0 vs. 5 oder 5 vs. 0 (siehe auch Tabelle 10). Durch diese Einschränkung konnten 900 Proteine identifiziert werden. Anschließend wurden diese Proteine in die *STRING*-Datenbank eingegeben, welche zunächst auf Grundlage verschiedener Protein-Datenbanken eine Kurzbeschreibung für jedes Protein angibt. Diese Kurzbeschreibungen wurden dann mithilfe der folgenden Schlagworte sowie deren verschiedener Varianten durchsucht:

1. oxidative stress
2. energy/fat metabolism/lipogenesis
3. adipocyte
4. inflammation
5. obesity

Dabei konnten insgesamt 65 Proteine in den 5 verschiedenen Vergleichen identifiziert werden (siehe Tabelle 12). Beispielhaft wurden die für den SD vs. WSD-Vergleich identifizierten Proteine in Abbildung 17 als Übersicht abgebildet. Alle durch die Methode als potenziell relevant identifizierte Proteine sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 12: Anzahl an signifikanten Proteinen, mit 5/5, 0/5 oder 5/0 valid values sowie den definierten Schlagworten in der Kurzbeschreibung in der *STRING*-Datenbank.

Schlagworte: oxidative stress, energy/fat metabolism/lipogenesis, adipocyte, inflammation, obesity

Vergleiche	Anzahl
SD vs. HFD	9
SD vs. DIO	11
SD vs. WSD	20
HFD vs. DIO	8
HFD vs. WSD	17
<i>Gesamt</i>	<i>65</i>

Abbildung 17: STRING-Mapping signifikant veränderter Proteine des SD vs. WSD- Vergleichs des egWAT an G15,5

Nach Entnahme von egWAT an G15,5 wurde daraus die vorhandenen Proteine isoliert und durch die Proteomic Facility anschließend mittels LC-MS detektiert. Es erfolgte eine aufwendige computergestützte Analyse mittels der Software *MaxQuant* und *Perseus 1.6.1.1*. Anschließend erfolgte ein Mapping mittels der *STRING*-Datenbank, wobei nur signifikant veränderte Proteine (Fold-Change > 1,5, q-Wert < 0,05) und Proben mit 0 vs. 5, 5 vs. 0 und 5 vs. 5 valid values abgebildet wurden. Dargestellt sind die identifizierten Proteine mit Hervorhebung der 20 durch Schlagworte identifizierten Proteine mittels roter Kreise.

n: SD = 5, CO = 5, HFD =5, DIO = 5, WSD = 5

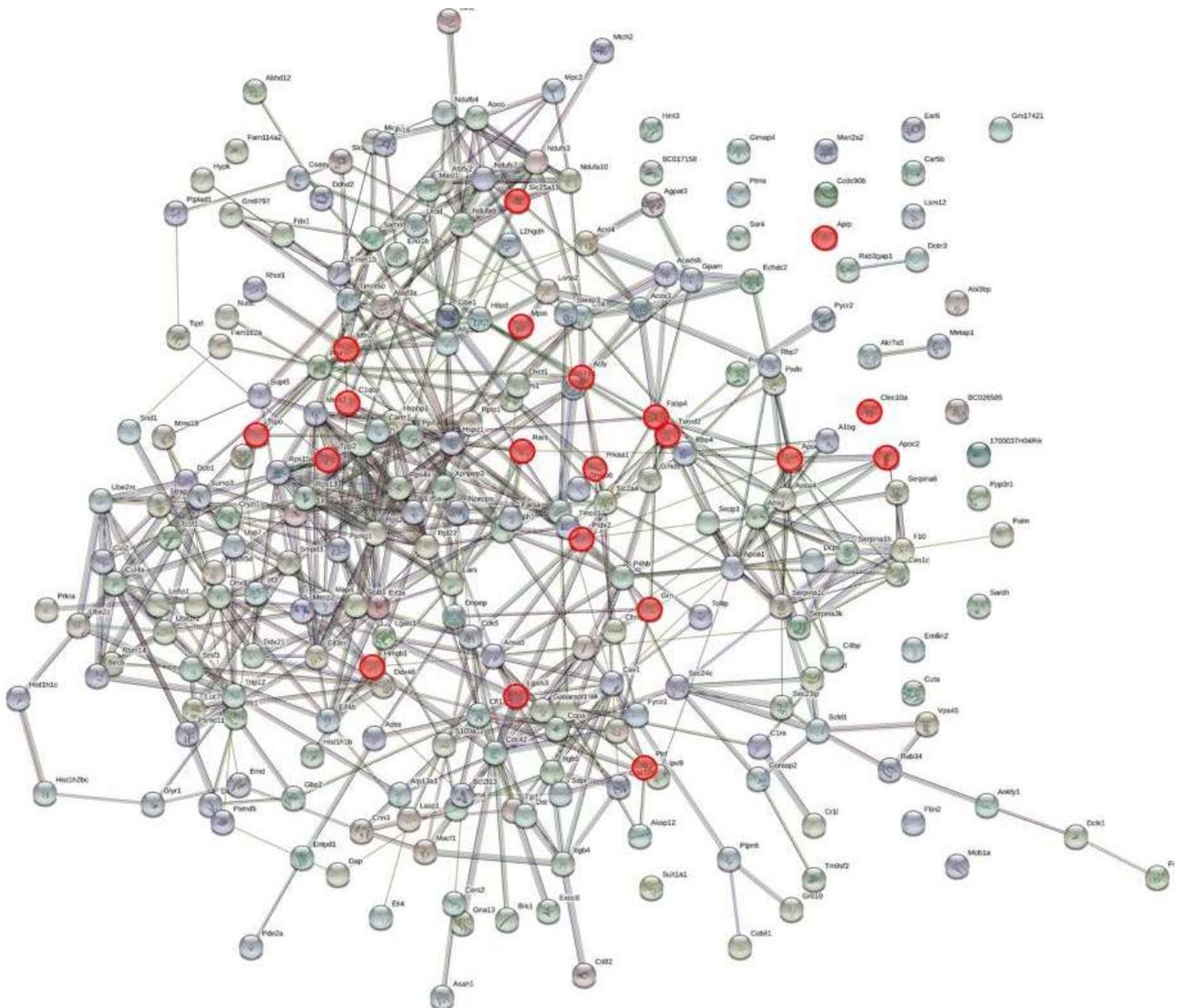


Tabelle 13: Auflistung der durch die Schlagwortbasierte Methode identifizierten Gene des Proteomic-Screens

Nach Entnahme von egWAT an G15,5 wurde daraus die vorhandenen Proteine isoliert und durch die Proteomic Facility anschließend mittels LC-MS detektiert. Es erfolgte eine aufwendige computergestützte Analyse mittels der Software MaxQuant und Perseus 1.6.1.1. Anschließend erfolgte eine Identifizierung von potenziell relevanten Proteinen mittels Schlagwortanalyse der durch die STRING-Datenbank aufgelisteten Kurzbeschreibungen. Dabei wurden nur signifikant veränderte Proteine (Fold-Change > 1,5, q-Wert < 0,05) und Proben mit 0 vs. 5, 5 vs. 0 und 5 vs. 5 valid values berücksichtigt, welche in ihrer Beschreibung eins der folgenden Worte oder eine seiner Varianten enthielten: *oxidative stress*, *energy/fat metabolism*, *adipocyte*, *inflammation* oder *lipogenesis/obesity*. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind hier aufgelistet.

n: SD = 5, CO = 5, HFD = 5, DIO = 5, WSD = 5

↑ - hochreguliert, ↓ - runterreguliert

Protein-ID	Protein-Name	Gen-Name	Schlagwort	HFD im Vergleich zu SD	DIO im Vergleich zu SD	WSD im Vergleich zu SD	DIO im Vergleich zu HFD	WSD im Vergleich zu HFD
J3QMN4	Thioredoxin reductase 2, mitochondrial	Txnrd2	oxidative stress	↓		↓		
A0A1L1SRX2	AMP deaminase 3	Ampd3	energy metabolism	↓				
G3UZY2	Thioredoxin, mitochondrial	Txn2	reactive oxygen species	↓			↑	↑
O09164	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	Sod3	reactive oxygen species	↑				
P10107	Annexin A1	Anxa1	inflammatory process	↑	↑			
P28063	Proteasome subunit beta type-8	Psmb8	inflammatory response, adipocyt differentiation	↓			↑	↑
Q3UW66	Sulfurtransferase	Mpst	antioxidant	↓		↓		
Q62264	Thyroid hormone-inducible hepatic protein	Thrsp	lipogenesis	↓	↓			

Q9JK42	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)]kinase isozyme 2, mitochondrial	Pdk2	fat metabolism	↓				↑
A0A0N4SVV4	Retinoic acid receptor responder protein 2	Rarres2	adipogenesis, metabolism, inflammation		↑			
E9Q4Z2	Acetyl-CoA carboxylase 2	Acacb	lipid and glucose metabolism, adipose tissue		↓			
P04117	Fatty acid-binding protein, adipocyte	Fabp4	adipocyte		↑	↑		
P06728	Apolipoprotein A-IV	Apoa4	apolipoprotein		↑			
Q8C253	Galectin	Lgals3	inflammatory response		↓	↓		
Q3U9N4	Granulins	Grn	inflammation		↓	↓		↓
Q61171	Peroxiredoxin-2	Prdx2	oxidative stress		↑	↑		↑
Q8R5L1	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	C1qbp	inflammation		↓	↓		
Q99KH8	Serine/threonine-protein kinase 24	Stk24	oxidative-stress		↑			
A0A0J9YUD8	High mobility group protein B1	Hmgb1	inflammatory response			↓		↓
F8WHB7	C-type lectin domain family 10 member A	Clec10a	inflammatory response, adipocytes			↓		↓
O54724	Polymerase I and transcript release factor	Ptrf	adipocytes			↑		

P09813	Apolipoprotein A-II	Apoa2	lipids, metabolism			↑		
P50637	Translocator protein	Tspo	lipid metabolism			↑		
Q05020	Apolipoprotein C-II	Apoc2	lipoprotein metabolism			↑		
Q3V117	Acly	Acly	lipid synthesis			↓		↑
Q5EG47	5-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1	Prkaa1	energy metabolism			↓		↓
Q64514	Tripeptidyl-peptidase 2	Tpp2	adipogenesis			↓		
Q80U63	Mitofusin-2	Mfn2	obesity			↓		
Q9CR62	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	Slc25a11	metabolic processes			↓		
Q9D0I9	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	Rars	inflammatory			↓		
Q9WVQ5	Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	Apip	inflammation			↑		↑
A0A0U1RNP7	Perilipin-1	Plin1	adipocyt lipid metabolism				↓	↓
B1ASP2	Tyrosine-protein kinase	Jak1	inflammatory markers				↓	
P20108	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	Prdx3	oxidative stress				↑	↑
P70202	Latexin	Lxn	inflammation				↓	
Q8CC86	Nicotinate phosphoribosyltransferase	Naprt	oxidative stress				↑	

Q923B6	Metalloreductase STEAP4	Steap4	inflammatory and metabolic response					↓	
O08677	Kininogen-1	Kng1	inflammation						↑
Q9QXG4	Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic	Acss2	lipid synthesis						↑
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	Aldoa	glucose metabolism						↑
P13516	Acyl-CoA desaturase 1	Scd1	lipid neogenesis						↑
Q99J39	Malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial	Mlycd	metabolic balance						↑

4.5 RT-qPCR

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der RT-qPCR-Analysen aus egWAT und scWAT vorgestellt. Dabei ist zu beachten, dass nur die wichtigsten Ergebnisse in diesem Kapitel dargestellt werden, weitere Ergebnisse sind im Anhang zu finden. Alle Ergebnisse wurden wie in Kapitel 3.3.4.5.1 beschrieben auf ein Housekeeping-Gen normalisiert und mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet.

Als Housekeeping wurden verschiedene Gene getestet (18S, β -ACTIN und HPRT). Letztendlich wurde sich für 18S als Housekeeping für egWAT und β -ACTIN für scWAT entschieden, da diese Housekeeping-Gene die geringste Streuung aufwiesen (siehe Abbildung 18).

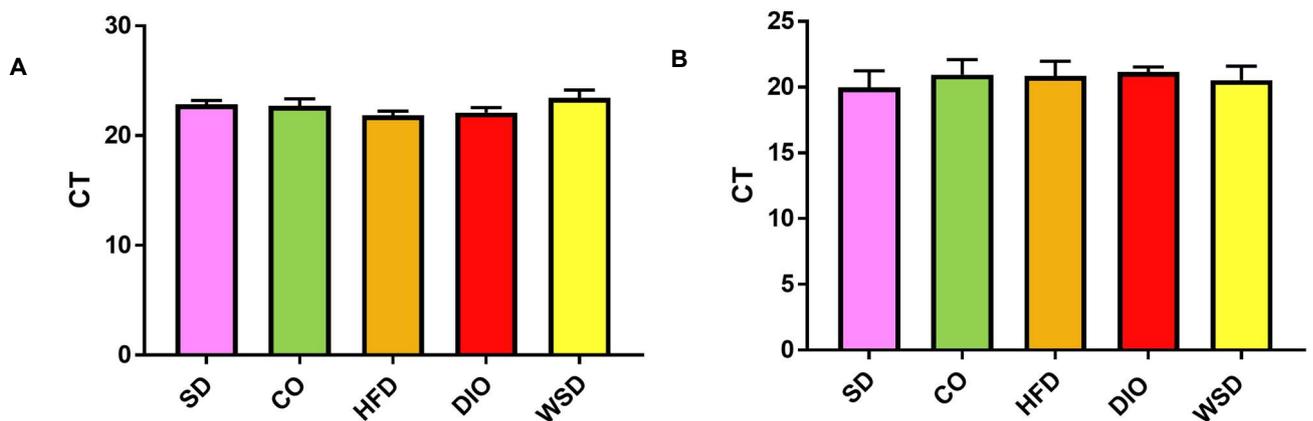


Abbildung 18: ausgewählte Housekeeping-Gene für die RT-qPCR-Auswertung

Zuerst wurden verschiedene Housekeeping-Gene im egWAT und scWAT gemessen und die Gene mit den geringsten Streuungen ausgewählt. Gezeigt sind die CT-Werte der Gene in den verschiedenen Diätgruppen.

n: SD = 14, CO = 5, HFD = 12, DIO = 7, WSD = 5

A 18S als Housekeeping für das egWAT

B β ACTIN als Housekeeping für das scWAT

In Abbildung 19 sind jeweils die relativen mRNA-Expressionen von Entzündungsfaktoren und oxidativen Stressmarkern verschiedener Diäten in Bezug aufeinander im egWAT an G15,5 abgebildet.

Dabei zeigt Abbildung 19 A die relative mRNA-Expression der HFD-Gruppe im Verhältnis zu den SD-Tieren. Signifikant ist dabei das niedrigere mRNA-Expressionslevel von IL-1 β als Entzündungsmarker, sowie SOD1 (antioxidativ) als Marker für oxidativen Stress. Dieselben Marker sind ebenfalls bei dem Vergleich der DIO-Tiere bezogen auf die SD-Gruppe signifikant erniedrigt (Abbildung 19 B). Insgesamt zeigt sich ein Trend in Richtung einer niedrigeren Expression von Entzündungs- und oxidativen Stressmarkern in der SD-Diät im Vergleich zur DIO-Diät. Hingegen zeigt Abbildung 19 C einen Trend zur gesteigerten mRNA-Expression in den Fettzellen der WSD-Tiere in Bezug auf die HFD-Gruppe. Signifikant ist hier die erhöhte mRNA-Expression von TNF- α als Entzündungsmarker und SOD1 als Marker für oxidativen Stress.

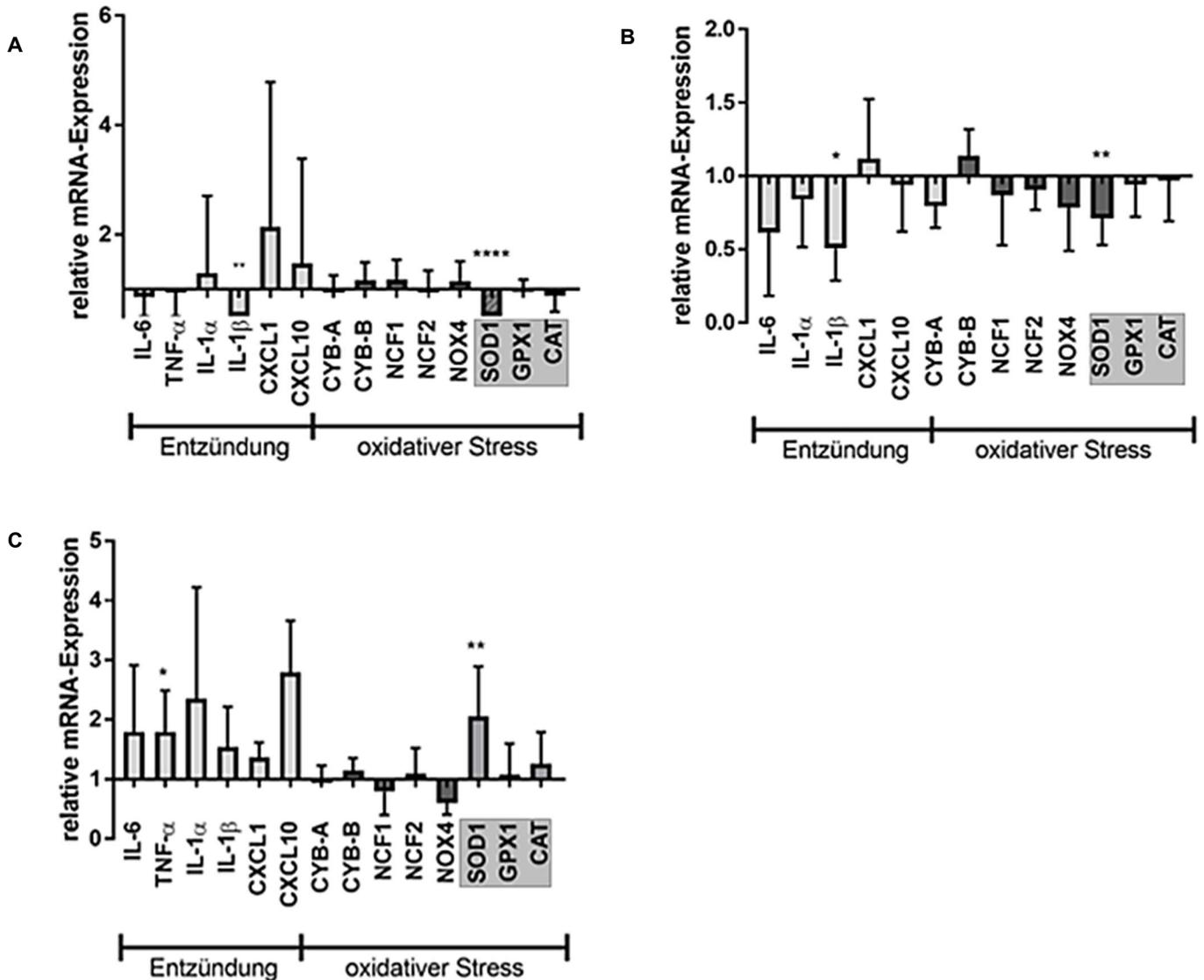


Abbildung 19: relative mRNA-Expression von Entzündungs- und oxidativen Stressmarkern im egWAT an G15,5

Die Expression von Entzündungsfaktoren und oxidativen Stressmarkern im egWAT der an G15,5 sektionierte Mäuse wurde durch RT-qPCR bestimmt und anschließend mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode analysiert. Zum Abgleich wurde das Housekeeping-Gen 18S verwendet. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression in Bezug auf die jeweilige Vergleichsgruppe (Vergleichsgruppe wurde auf 1 gesetzt). Dargestellt sind die Entzündungsmarker IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , CXCL1 und CXCL10. Als pro-oxidative Stressmarker sind CYB-A, CYB-B, NCF1, NCF2, NOX4 abgebildet; als anti-oxidative Stressmarker (grau hinterlegt) sind hier SOD1, GPX1 und CAT gezeigt.

Graphisch dargestellt sind die Mediane mit IQR, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***

n: SD = 14, HFD = 11, DIO = 7, WSD = 5

A RT-qPCR Ergebnisse des Vergleichs HFD vs. SD

B RT-qPCR Ergebnisse des Vergleichs DIO vs. SD

C RT-qPCR Ergebnisse des Vergleichs WSD vs. HFD

In Abbildung 20 A wird exemplarisch für die im egWAT gemessenen Entzündungsmarker die Expression von IL-1 β dargestellt. Man erkennt einen Trend einer niedrigeren relativen mRNA-Expression von IL-1 β in den Versuchsgruppen CO, HFD, DIO und WSD im Vergleich zur SD-Gruppe. Signifikant erniedrigt ist in diesem Vergleich die Expression in der HFD- und DIO-Versuchsgruppe. Als Beispiel für einen oxidativen Stressmarker im egWAT ist hier SOD1 dargestellt, welches antioxidativ wirkt (siehe Abbildung 20 B). In den Versuchsgruppen CO, HFD, DIO und WSD zeigt sich ein deutlicher Trend zur verringerten relativen mRNA-Expression an SOD1 im Vergleich zur SD-Gruppe. Signifikant sind erneut die Veränderungen zwischen SD und HFD sowie SD und DIO.

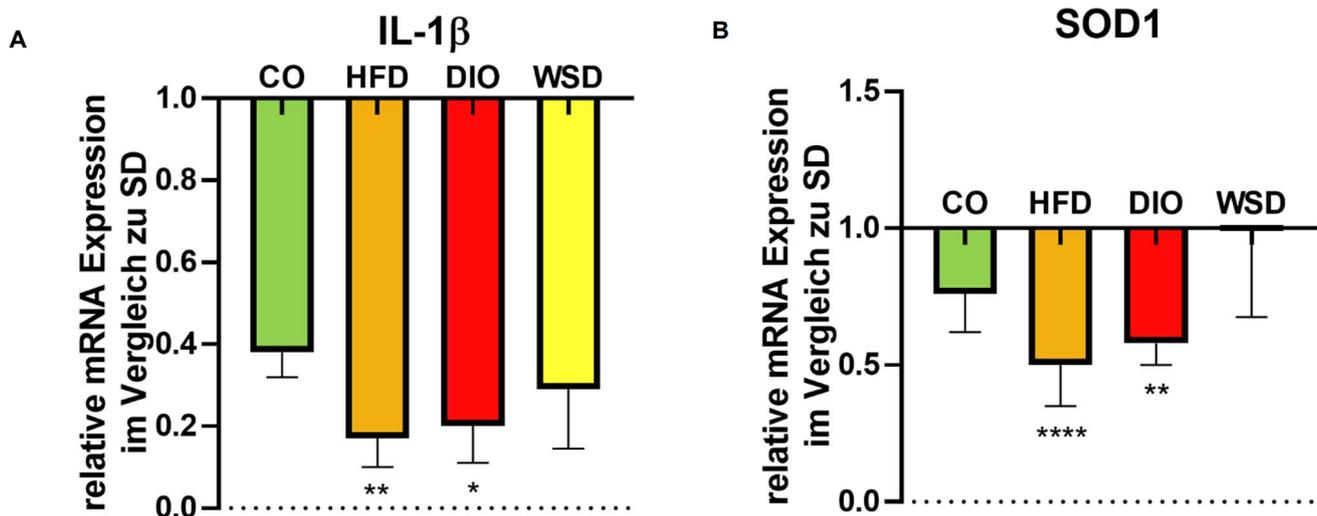


Abbildung 20: relative mRNA-Expression von IL-1 β und SOD1 im egWAT der Versuchsgruppen CO, HFD und WSD im Vergleich zur SD-Gruppe

Die Expression von Entzündungsfaktoren und oxidativen Stressmarkern im egWAT wurde durch RT-qPCR bestimmt und anschließend mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode analysiert. Es erfolgte eine Normalisierung auf das Housekeeping-Gen 18S. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression der Versuchsgruppen CO, HFD, DIO und WSD in Bezug auf die SD-Gruppe, wobei die Vergleichsgruppe (SD) auf 1 gesetzt wurde.

Dargestellt sind die Mediane mit IQR, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***

n: SD = 14, HFD = 11, DIO = 7, WSD = 5

A RT-qPCR Ergebnisse von IL-1 β der Gruppen CO, HFD, DIO und WSD jeweils vs. SD

B RT-qPCR Ergebnisse von SOD1 der Gruppen CO, HFD, DIO und WSD jeweils vs. SD

Abbildung 21 zeigt die relative mRNA-Expression von Entzündungs- und oxidativen Stressmarkern im scWAT unter Verwendung von β -ACTIN als Housekeeping.

Im Vergleich der HFD-Tiere mit der SD-Gruppe zeigt sich IL-1 β als Entzündungsmarker signifikant erniedrigt, ebenso wie die oxidativen Stressmarker CYB-A und CAT (Abbildung 21 A). Insgesamt zeigt sich ein deutlicher Trend zu erniedrigter mRNA-Expression von Entzündungs- und oxidativen Stressmarkern in der HFD- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe.

Abbildung 21 B stellt das gemessene mRNA-Expressionslevel der WSD-Gruppe bezogen auf die HFD-Gruppe dar. Hier zeigen sich die Entzündungsmarker TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , CXCL1 und CXCL10 signifikant erhöht. Auch die mRNA-Expression der oxidativen Stressmarker CYB-A, CYB-B, NCF1 und NCF2 war in diesem Vergleich signifikant erhöht. Insgesamt zeichnet sich ein Trend einer Erhöhung der mRNA-Expression im scWAT der DIO-Tiere gegenüber dem scWAT der WSD-Gruppe ab.

Ein ähnliches Muster sieht man in Abbildung 21 C, welche die relative mRNA-Expression im scWAT der DIO-Gruppe in Bezug auf das scWAT der Tiere der WSD-Versuchsgruppe darstellt. Signifikant erhöht zeigen sich die Entzündungsmarker TNF- α , IL-1 β und CXCL10. Unter den gemessenen oxidativen Stressmarkern sind CYB-A, NCF1 und NCF2 signifikant erhöht.

In Abbildung 22 A ist noch einmal die relative mRNA-Expression IL-1 β als Beispiel für die Entzündungsmarker im scWAT dargestellt. Hier zeigt sich eine signifikant verringerte Expression in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe. Auch die Tiere der DIO-Versuchsgruppe exprimieren im scWAT tendenziell weniger IL-1 β als die Tiere der SD-Gruppe. Im Gegensatz dazu zeigen sich tendenziell höhere mRNA-Expressionslevel in der CO- und WSD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe.

Beispielhaft für die gemessenen oxidativen Stress-Marker ist in Abbildung 22 B der prooxidative Marker CYB-A im Vergleich der verschiedenen Diäten zur SD-Gruppe dargestellt. Im Vergleich mit den SD-Tieren zeigt sich nur die mRNA-Expression in der HFD-Gruppe signifikant verringert. Während bei der CO- und DIO-Gruppe CYB-A zumindest tendenziell verringert ist, zeigt sich eine Tendenz zu einer erhöhten Expression bei den WSD-Tieren im Vergleich zur SD-Gruppe.

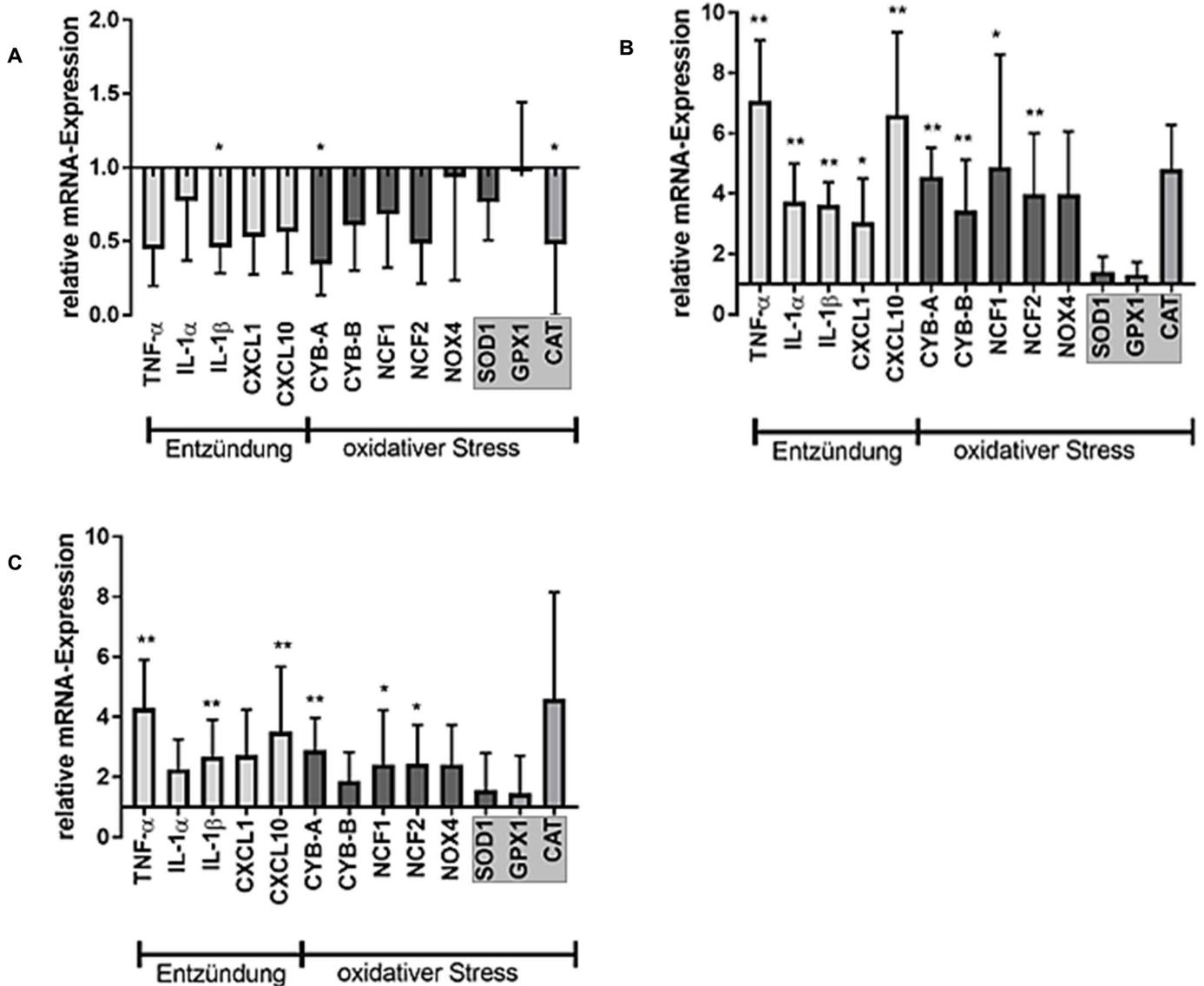


Abbildung 21: relative mRNA-Expression von Entzündungs- und oxidativen Stressmarkern im scWAT an G15,5

Die Expression von Entzündungsfaktoren und oxidativen Stressmarkern im scWAT der an G15,5 sektionierten Mäuse wurde durch RT-qPCR bestimmt und anschließend mithilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode analysiert. Zum Abgleich wurde das Housekeeping-Gen β -ACTIN verwendet. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression in Bezug auf die jeweilige Vergleichsgruppe (Vergleichsgruppe wurde auf 1 gesetzt). Dargestellt sind die Entzündungsmarker IL-6, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , CXCL1 und CXCL10. Als pro-oxidative Stressmarker sind CYB-A, CYB-B, NCF1, NCF2, NOX4 abgebildet; als anti-oxidative Stressmarker (grau hinterlegt) sind hier SOD1, GPX1 und CAT gezeigt.

Graphisch dargestellt sind die Mediane mit IQR, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***

n: SD = 14, HFD = 11, DIO = 7, WSD = 5

A RT-qPCR Ergebnisse des Vergleichs HFD vs. SD

B RT-qPCR Ergebnisse des Vergleichs WSD vs. HFD

C RT-qPCR Ergebnisse des Vergleichs DIO vs. WSD

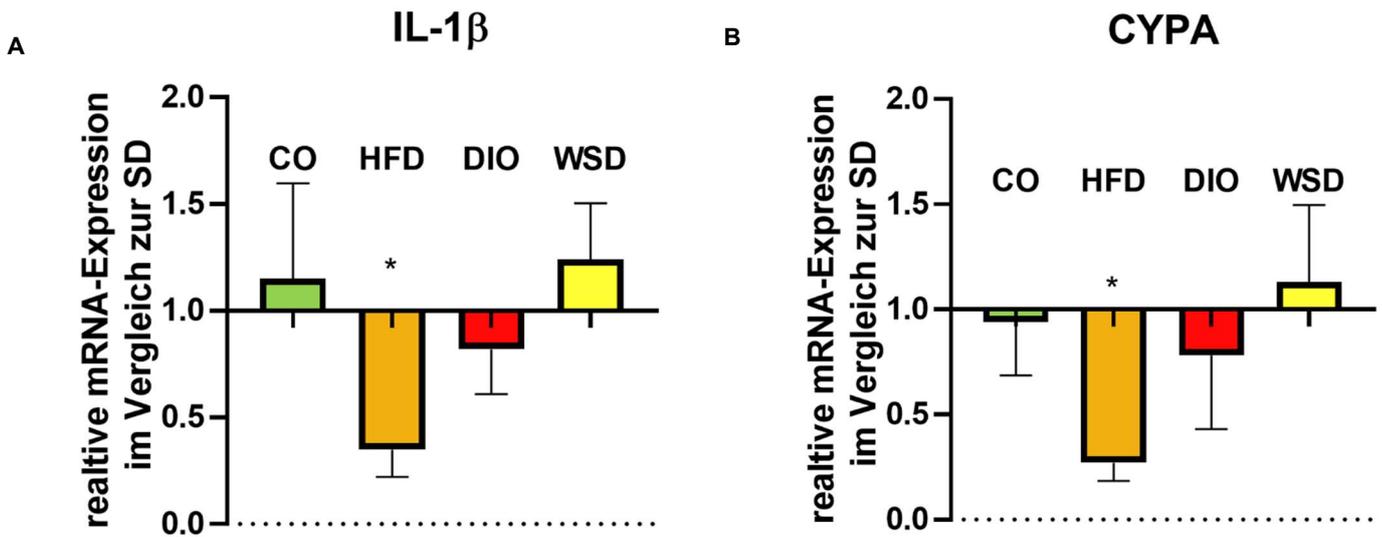


Abbildung 22: relative mRNA-Expression von IL-1 β und CYPA im scWAT der Versuchsgruppen CO, HFD, DIO und WSD im Vergleich zur SD-Gruppe

Die Expression von Entzündungsfaktoren und oxidativen Stressmarkern im egWAT wurde durch RT-qPCR bestimmt und anschließend mithilfe der $\Delta\Delta$ CT-Methode analysiert. Es erfolgte eine Normalisierung auf das Housekeeping-Gen β ACTIN. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression der Versuchsgruppen CO, HFD, DIO und WSD in Bezug auf SD-Gruppe, wobei die Vergleichsgruppe (SD) auf 1 gesetzt wurde.

Dargestellt sind die Mediane mit IQR, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***

n: SD = 14, HFD = 11, DIO = 7, WSD = 5

A RT-qPCR Ergebnisse von IL-1 β der Gruppen CO, HFD, DIO und WSD jeweils vs. SD

B RT-qPCR Ergebnisse von CYP-A der Gruppen CO, HFD, DIO und WSD jeweils vs. SD

4.6 Fettsäureprofil

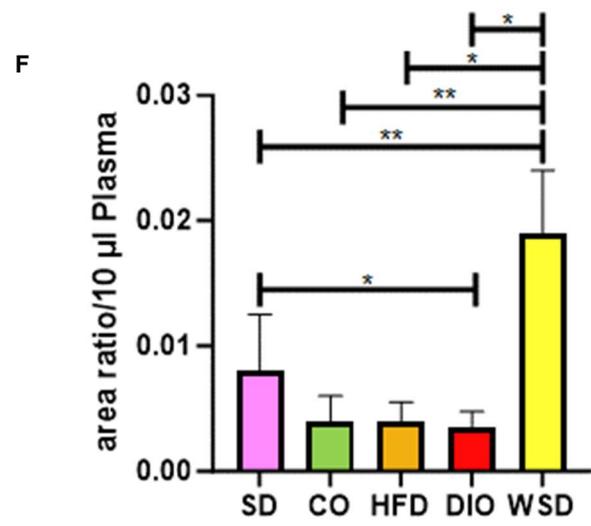
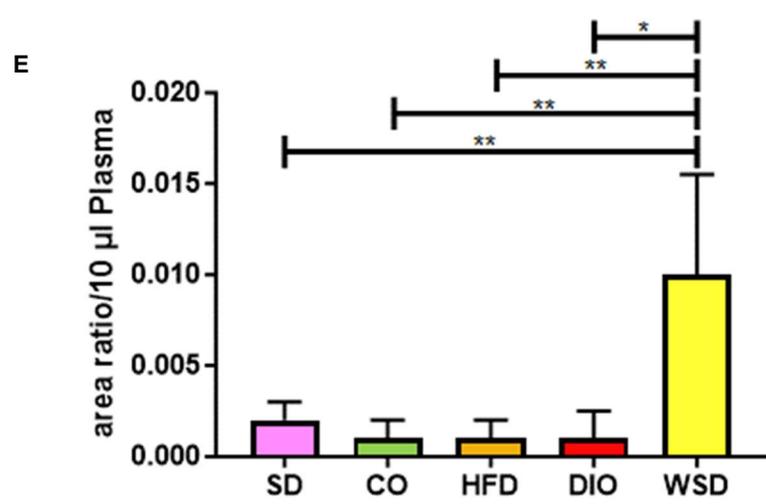
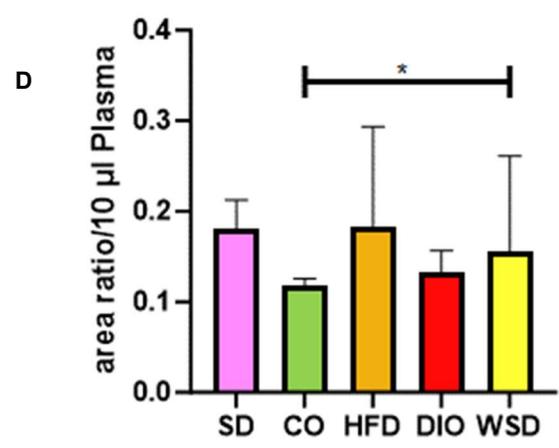
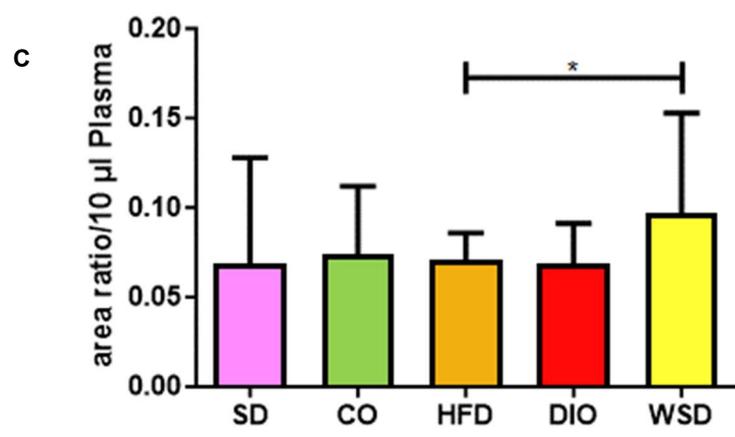
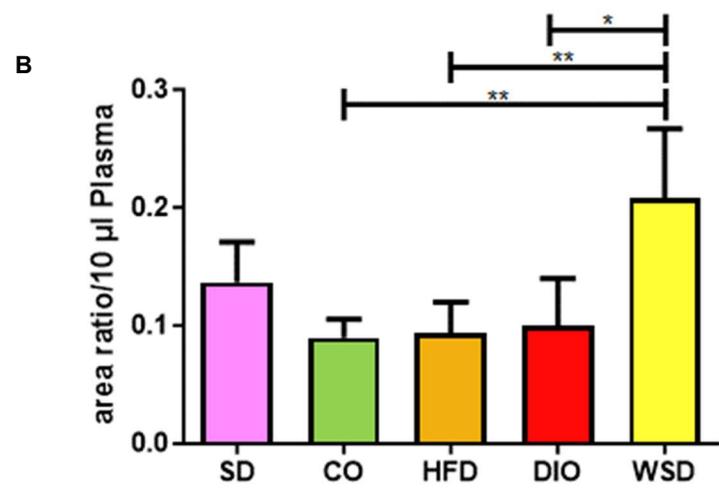
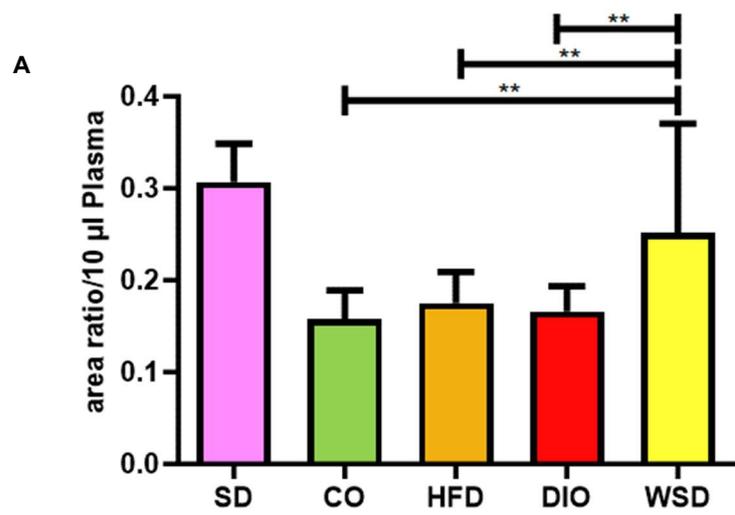
Das Fettsäureprofil im Serum der Mäuse der fünf verschiedenen Versuchsgruppen an G15,5 wurde von der Lipidomics Facility wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben bestimmt. Dabei wurden die Fettsäuren Palmitinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Stearinsäure, Myristinsäure, Palmitoleinsäure, Arachidonsäure und Docosahexansäure gemessen und in der Einheit area ratio / 10 µl Plasma angegeben.

Das Serum der WSD-Tiere enthielt signifikant mehr Palmitinsäure als das der Tiere der CO-, HFD- und der DIO-Gruppe (Abbildung 23 A). Daneben sieht man in Abbildung 23 B, dass auch der Gehalt an Ölsäure im Plasma der WSD-Tiere gegenüber den CO- und HFD-, sowie den DIO-Tieren signifikant höher war. Zwischen den SD- und HFD-Tieren gab es weder beim Ölsäure- noch beim Palmitinsäuregehalt signifikante Unterschiede.

Der Linolsäuregehalt im Mäuseserum zeigt lediglich einen signifikanten Unterschied zwischen den HFD- und den WSD-Tieren (Abbildung 23 C). Der Stearinsäuregehalt des Serums ist in Abbildung 23 D dargestellt. Hier zeigt sich eine signifikante Veränderung zwischen den Tieren, die CO-Diät fraßen, bei denen weniger Stearinsäure im Plasma nachzuweisen war als bei der WSD-Gruppe. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Veränderungen zwischen SD und HFD.

Mehr Veränderungen wurden bei der Analyse des Myristinsäuregehaltes des Mäuseserums festgestellt (Abbildung 23 E). Auffällig ist, dass bei Tieren, die WSD erhielten, signifikant mehr Myristinsäure im Serum nachweisbar war als bei allen anderen Gruppen. Dargestellt in Abbildung 23 F ist der Palmitoleinsäuregehalt des Mäuseserums. Auch bei diesem Vergleich ist der Gehalt im WSD-Serum signifikant höher als bei Tieren der SD-, CO-, HFD- und DIO-Versuchsgruppe. In diesem Vergleich gab es außerdem signifikante Veränderungen zwischen der SD und der DIO: der Palmitoleinsäuregehalt bei Tieren der SD-Versuchsgruppe war signifikant erhöht im Vergleich zu Tieren der DIO-Versuchsgruppe. Zwischen SD und HFD ergaben sich auch hier keine signifikanten Veränderungen.

Beim Arachidonsäure- sowie dem Docosahexansäuregehalt zeigten sich keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 23 G + H).



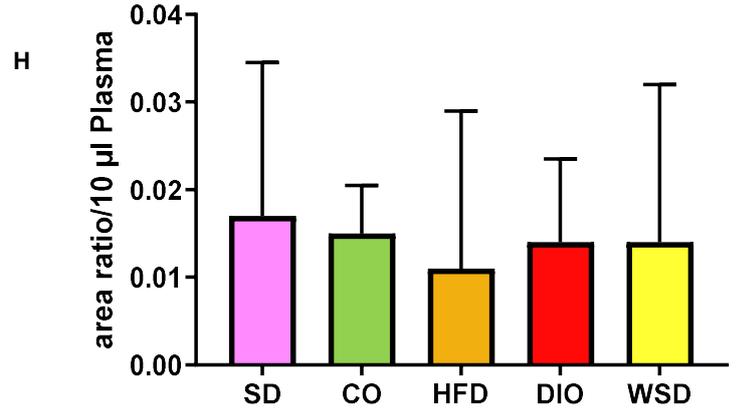
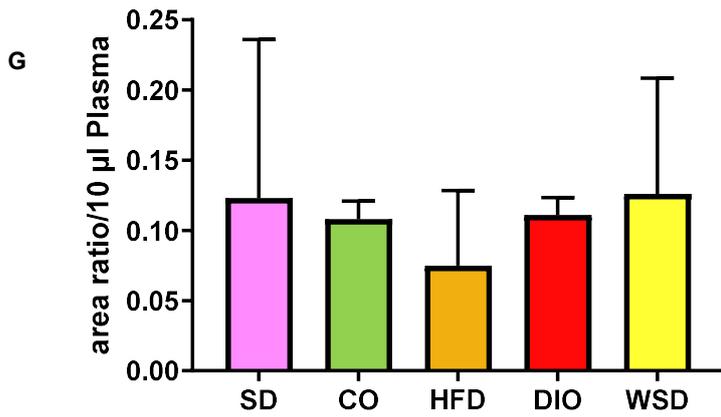


Abbildung 23: Ergebnisse des Fettsäureprofils im maternalen Serum

Im Rahmen der Präparation wurde den Muttertieren an G15,5 Vollblut aus dem Herzen entnommen und zu Serum abgesert. Anschließend wurde per MPLEx-Verfahren die Lipide aus dem Serum extrahiert, welche dann in FAMES überführt wurden. Daraufhin konnten die Proben mittels Gas-Chromatographen mit Massenspektrometrie analysiert und computergestützt ausgewertet werden. Die Einheit der analysierten Fettsäuren sind area ratio/10 µl Plasma.

Mediane mit IQR, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **

n: SD = 5, CO = 5, HFD = 5, DIO = 5, WSD = 5

- A Palmitinsäuregehalt
- B Ölsäuregehalt
- C Linolsäuregehalt
- D Stearinsäuregehalt
- E Myristinsäuregehalt
- F Palmitoleinsäuregehalt
- G Arachidonsäuregehalt
- H Docosahexansäuregehalt

5 Diskussion

Seit Jahrzehnten nimmt das Übergewicht in westlichen Ländern stark zu.² Dies gilt auch für die Anzahl an Schwangeren mit Übergewicht und Adipositas, deren Prävalenz stetig zunimmt. Damit steigt auch das Risiko für Folgeerkrankungen und Komplikationen sowohl für die Mutter als auch für das Kind. Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von adipositasassoziierten Folgeerkrankungen wie DM-II²⁸ oder der Erhöhung des kardiovaskulären Risikos scheint dabei das Fettgewebe selbst zu spielen. Neben Speicher- und Isolierfunktionen übernimmt das Fettgewebe auch endokrine Funktionen und beeinflusst somit den Gesamtorganismus.⁸⁹ Die durch Adipositas beeinflusste Dysfunktion des Fettgewebes gilt als entscheidender Faktor bei der Entstehung der Komplikationen, besonders Inflammation und oxidativem Stress kommt eine Schlüsselrolle zu.^{83,99} Um die Gesamtzusammenhänge besser zu verstehen und mögliche Therapieansätze entwickeln zu können, haben sich Tiermodelle bewährt,³ besonders Tiermodelle an Nagetieren konnten bereits beim besseren Verständnis der komplexen Zusammenhänge helfen. Dabei wurde bisher vor allem eine HFD eingesetzt, um bei den Tieren Adipositas zu induzieren. Ein genaues Protokoll mit klar definierter Diätzusammensetzung und -dauer wurde bisher jedoch nicht etabliert. Auch entspricht eine Diät, die neben Fett auch Zucker als hochkalorische Makromoleküle enthält, am ehesten den Ernährungsgewohnheiten der westlichen Welt, die zu Übergewicht führen.²³

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, fünf verschiedene Versuchsdäten miteinander zu vergleichen und letztendlich eine Aussage über die Verwendbarkeit der einzelnen Diäten als Standarddiäten zur Adipositasinduktion sowie die dazu passende Kontrolldiät treffen zu können.

5.1 Versuchsdäten

Ziel bei der Auswahl der fünf verschiedenen Diäten war es, einerseits die bisher häufig verwendeten Diäten HFD und SD abzubilden, die von unserer Arbeitsgruppe bisher zur Übergewichtsinduktion und als Kontrolle verwendet wurden.^{137,140} Die in Kapitel 3.2.3 beschriebene Zusammensetzung der hier verwendeten HFD wurde so bereits auch von anderen Arbeitsgruppen angewendet.¹²⁴ Um sich den realen Gegebenheiten der menschlichen Ernährung anzunähern, wurden zwei verschiedene Hochfett-/Hochzucker-Diäten ausgewählt: WSD und DIO. Beide enthalten etwa gleich viel Fett pro kg, unterscheiden sich jedoch deutlich beim

Zuckergehalt. Die WSD besteht zu 344 g pro kg aus Zucker, die DIO hingegen enthält nur 211 g/kg. Vorangegangene Studien haben die Theorie aufgestellt, dass die Kombination aus fett- und zuckerreicher Ernährung einen besonders negativen Einfluss auf das metabolische Gleichgewicht ausübt.^{158,159} Als fünfte Diät wurde die CO eingesetzt, eine besonders strenge Kontrolldiät, die einen besonders niedrigen Fett- und Zuckergehalt hat und als offizielle Kontrolldiät zur WSD vertrieben wird.

Die unterschiedliche Futterzusammensetzung spiegelt sich auch in den Daten zur täglichen Fett- und Zuckeraufnahme in Abbildung 9 wider: Die Fettaufnahme lag an allen Gestationstagen bei HFD-Tieren am höchsten, gefolgt von Tieren der DIO- und WSD-Gruppe. Deutlich weniger Fett nahmen SD- und CO-Tiere auf. Bei der Zuckeraufnahme hingegen nahmen die Tiere der WSD-Gruppe jeden Gestationstag deutlich mehr zu sich als alle anderen. Die zweitgrößte Menge an Zucker wurde von den DIO-Tieren gefressen, gefolgt von den drei anderen Versuchsgruppen mit ähnlichen Mengen an Zuckeraufnahme täglich.

Die Zusammenschau der Futterzusammensetzung in Kapitel 3.2.3 sowie den Daten zur Futteraufnahme in Abbildung 9 zeigt, dass es in der vorliegenden Arbeit gelungen ist, fünf Versuchsdiäten auszuwählen, die geeignet sind, um bei den hier verwendeten C57BL/6N-Mäusen die gewünschten Ernährungsmuster nachzubilden und sich mit den Hochfett-/Hochzucker-Diäten an menschliche Ernährungsgewohnheiten anzunähern.

5.2 Adipositasinduktion

In bisherigen Forschungsarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass eine HFD geeignet ist, um bei C57BL/6-Mäusen Adipositas zu induzieren.^{160,161} Auch in dieser Arbeit zeigte sich sowohl bei Verpaarung als auch bei Sectio eine deutliche Adipositasinduktion in der HFD-, aber auch in der DIO- und WSD-Versuchsgruppe. Das Gewicht des egWAT war sowohl total als auch in Bezug auf das Sectiogewicht bei HFD und DIO im Vergleich zu SD und CO signifikant erhöht. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, erfolgten zusätzlichen μ CT-Scans von nichttragenden weiblichen Mäusen, die ebenfalls randomisiert eine der fünf verschiedenen Versuchsdiäten erhielten. Auch dort konnte die Adipositasinduktion anhand von massiv gesteigerten Gesamtfett- und viszeralen Fettanteilen bei HFD, WSD und DIO nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden durch die Daten zum Gewicht bei Verpaarung und Sectio der tragenden Tiere unterstützt, die ein erhöhtes

Gesamtgewicht in der HFD-, DIO- und WSD-Gruppe zeigten (siehe Kapitel 4.1.1). Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die Versuchs- und Haltungsbedingungen sowie die Auswahl der konkreten HFD, DIO und WSD geeignet waren, um bei den Versuchstieren Adipositas zu induzieren.

5.3 Phänotypische Veränderungen

Wie in Kapitel 5.2 beschrieben, konnte bei der HFD-, DIO- und WSD-Versuchsgruppe eine Adipositasinduktion nachgewiesen werden. Zusätzlich zu Gewichtsdaten wurden über den gesamten Zeitraum des Versuchs verschiedene phänotypische Daten bestimmt und ausgewertet. In Abbildung 25 im Anhang ist die Körperlänge der weiblichen Mäuse am Tag der Sectio an G15,5 abgebildet, bei der sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen zeigt. Auch bei der Anzahl der Feten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, die Anzahl lag durchschnittlich bei 7,6 Feten pro Muttertier. Somit ist der nachgewiesene Gewichtsunterschied zwischen den Versuchsgruppen an G15,5 weder durch die Körperlänge noch durch eine abweichende Fetenanzahl begründet.

Durch die Daten zur Futteraufnahme konnte gezeigt werden, dass die Gewichtszunahme auch nicht auf eine Hyperphagie der HFD-, DIO- und WSD-Tiere zurückzuführen ist, wobei die Tiere der SD-Gruppe an allen Tagen eine größere Futtermenge aufnahmen als alle anderen Tiere (vgl. Abbildung 9 A). Dabei ist einer der Schlüsselfaktoren, die beim Menschen aber auch bei Mäusen über die Menge der Nahrungsaufnahme bestimmt, die Schmackhaftigkeit (englisch palatability) des Essens.¹⁶²⁻¹⁶⁴ In Versuchen, bei denen Nagetiere die Wahl zwischen Hochfett-/Hochzucker-Diäten oder Standardfutter gelassen wurde, zeigten sie eine hohe Präferenz gegen das Standardfutter,¹⁶⁵ sodass davon auszugehen ist, dass das SD-Futter weniger gut schmeckt als HFD, WSD oder DIO. Dass in unserer Versuchsanordnung dennoch die Gesamtmenge an aufgenommenem Futter in der SD deutlich höher war als in allen anderen Versuchsgruppen, könnte an der geringeren Dichte an Makronährstoffen liegen. Von allen Diäten enthielt die SD mit 3225 kcal/kg die geringste Menge an metabolisierbarer Energie (vgl. Kapitel 3.2.3). Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie von *Lindqvist et al.*, die ebenfalls eine höhere Gesamtfutteraufnahme von weiblichen Mäusen, die Standardfutter erhielten, als von Tieren, die eine Hochfett-, eine Hochzucker- oder eine kombinierte Diät erhielten, zeigte.¹⁶⁴ Insgesamt zeigten die Tiere der HFD-, DIO- und WSD-

Versuchsgruppe trotz geringerer Gesamtfutteraufnahme eine ähnliche tägliche Gesamtkalorienaufnahme (vgl. Abbildung 8). Trotzdem zeigten sie im Vergleich zu den Tieren der SD-Versuchsgruppe ein höheres Gewicht sowie eine erhöhte Gewichtszunahme. Es kann daraus geschlussfolgert werden, dass die in Kapitel 5.2 gezeigte Adipositasinduktion in der unterschiedlichen Futterzusammensetzung der fünf verschiedenen Versuchsgruppen begründet liegt, vor allem der Zuckergehalt der unterschiedlichen Futterarten unterscheidet sich deutlich (siehe Tabelle 8).

Im Verlauf des Versuchs fiel eine deutlich geminderte Schwangerschaftsrate bei WSD-Versuchstieren auch nach drei Übernacht-Verpaarungsversuchen auf. Dies deckt sich mit Erkenntnissen beim Menschen, bei denen auch bei normalem Zyklus die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Empfängnis mit jedem BMI-Punkt $>29 \text{ kg/m}^2$ linear abnahm.¹⁴ Auch die geringere Wahrscheinlichkeit einer Lebendgeburt wie hier sowohl in CO als auch WSD nachgewiesen, ist bereits beim Menschen mit einem besonders hohen¹³ und besonders niedrigen¹⁶⁶ BMI nachgewiesen. Dieser Effekt ist bei ausgeprägter Adipositas ($\text{BMI} > 40 \text{ kg/m}^2$) so stark, dass eine 50 % verringerte Wahrscheinlichkeit einer Lebendgeburt beschrieben wurde.¹⁵ Insgesamt zeigte sich, dass sich die WSD, aufgrund der niedrigen Trächtigkeitsrate und der geringen Rate an Lebendgeburten und die CO, aufgrund der niedrigen Rate an Lebendgeburten und der niedrigen Überlebensrate der verbleibenden Nachkommen, nicht für Zuchtzwecke eignen (vgl. 4.1.3).

5.4 Veränderungen der Fettgewebemorphologie

Mithilfe histologischer Analysen konnten deutliche Veränderungen im scWAT und egWAT unter dem Einfluss der fünf verschiedenen Diäten an G15,5 beobachtet werden (vgl. Abbildung 13). Die Adipozytenfläche der HFD-Tiere waren signifikant größer als die aller anderen Tiere. Auch der Durchmesser zeigte sich vergrößert, signifikant sowohl im Vergleich zu SD als auch zu CO. Die zweitgrößte Adipozytenfläche und -durchmesser finden sich bei der DIO-Gruppe, beide signifikant verändert zur SD-Gruppe (jeweils $p < 0,01$). Dabei ist eine vergrößerte Adipozytenfläche und -größe mit erhöhter Insulinresistenz und erhöhtem Diabetesrisiko,^{39,167-169} vermehrter Inflammation^{72,170,171} und vermehrten Zellfunktionsstörungen¹⁷² assoziiert.

Besonders eine Zunahme der Adipozytengröße des viszeralen Fettgewebes, hier durch egWAT repräsentiert, scheint ein signifikanter Prädiktor für kardiometabolische

Veränderungen zu sein, die mit Adipositas einhergehen.¹⁷² Ein Grund dafür könnte nach der Lipotoxizitätstheorie sein, dass große Adipozyten im viszeralen Kompartiment ein Marker für bereits ausgereizte hyperplastische Kapazität im subkutanen Fettgewebe sind.^{40,172} Somit wäre bei den Tieren, die HFD oder DIO fraßen, ein „Spill-over“ von zusätzlichen Fettsäuren in primär nicht fettspeichernde Gewebe wie Leber oder Pankreas und damit systemische lipotoxische Effekte¹⁷³ deutlicher wahrscheinlich als bei den Tieren der SD- oder CO-Gruppe.

5.5 Veränderungen der Proteinexpressionsmuster

Zusätzlich zu den anderen durchgeführten Methoden erfolgte die umfangreiche Analyse des Proteoms, um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen auch auf Proteinebene untersuchen zu können. Da egWAT metabolisch deutlich aktiver ist als das scWAT⁶⁶ - was auch in der vorliegenden Arbeit nochmal deutlich gemacht werden konnte (siehe Kapitel 5.6) - und es enger mit adipositasbedingten Folgeerkrankungen assoziiert ist,^{54,174} wurden nur egWAT-Proben für die Proteom-Analyse ausgewählt. Anhand der Hauptkomponentenanalyse konnte eine gute Differenzierung der globalen Proteinexpressionsmuster zwischen den Versuchsgruppen gezeigt werden, vor allem zwischen den hier besonders relevanten Gruppen HFD, SD sowie DIO. Die Versuchsgruppen CO und WSD wurden aufgrund der Schwierigkeiten in der Zucht (siehe Kapitel 4.1.3) bei der Auswertung nachrangig beachtet, scheinen aber ein ähnliches Proteinexpressionsmuster wie die Tiere der DIO-Gruppe zu zeigen, da sie in der Hauptkomponentenanalyse in räumlicher Nähe zueinander liegen. Die größte Anzahl an signifikant veränderten Proteinen (Fold-Change > 1,5, q-Wert < 0,05) findet sich mit 293 im Vergleich zwischen SD und WSD, gefolgt von SD vs. HFD (258) und SD vs. DIO (255). Insgesamt konnten 1.128 signifikant veränderte Proteine identifiziert werden.

Um diese Anzahl weiter zu reduzieren, wurden von diesen Proteinen nur diejenigen in die Auswertung eingeschlossen, die entweder in allen Proben einer Gruppe identifiziert wurden (valid value: 5) oder in keiner (valid value: 0), sodass folgende valid value-Kombinationen in der Auswertung erhalten sind: 5 vs. 5, 5 vs. 0, 0 vs. 5 und 0 vs. 0. Die sich daraus ergebenden 900 Proteine wurden nun mithilfe der in Kapitel 3.3.3.5 beschriebenen schlagwortbasierten Methode durchsucht, mit deren Hilfe 65 potenziell relevante, veränderte Proteine identifiziert werden konnten. Die

Proteine werden hier kapitelweise, anhand der fünf zur Identifikation relevanter Veränderungen verwendeten Schlagworte, diskutiert. In der nachfolgenden Beschreibung werden die Proteine mit ihrem in Tabelle 13 definierten Gennamens bezeichnet, um die Lesbarkeit zu verbessern.

5.5.1 Schlagwort: *oxidative stress*

Wahrscheinlich kam es in der evolutionären Entwicklung von aeroben Organismen in sauerstoffreicher Umgebung zur Notwendigkeit eines wirksamen Abwehrsystems von ROS.¹⁷⁵ Während unter physiologischen Bedingungen die normalen ROS-Konzentrationen wichtig für Zellsignalwege und der Reaktion auf Krankheitserreger ist, führt eine pathologisch erhöhte Konzentration von ROS wie beispielsweise unter adipösen Bedingungen zur Entstehung verschiedener Erkrankungen wie Krebs, Bluthochdruck, DM-II, Atherosklerose, Entzündungen und vorzeitiger Alterung.^{86,91,92,175,176} Wie in Tabelle 13 nachzulesen, konnten 8 Proteine mithilfe des Schlagwortes *oxidative stress* identifiziert werden. Davon gehörte ein Protein zur Familie der Superoxiddismutasen (SOD), insgesamt drei Proteine erfüllen Aufgaben im Thioredoxinsystem, während zwei Proteine als Peroxiredoxine bekannt sind. Zwei weitere Proteine scheinen ohne bisher bekannten Zusammenhang zu den anderen identifizierten Proteinen zu stehen, aber dennoch auf relevante Weise die pro- bzw. antioxidativen Signalwege zu beeinflussen.

5.5.1.1 Superoxiddismutasen (SOD)

Die Familie der SOD sind eine der ersten und damit auch wichtigsten Bestandteile der antioxidativen Enzymabwehr gegen ROS, die ubiquitär vorkommt.¹⁷⁵ Durch diese antioxidativen Enzyme kommt es einerseits zu einer Katalyse von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, andererseits zu einer Beeinflussung der Immunreaktion.¹⁷⁶ Entdeckt wurden drei verschiedene Isoformen, zytosolisches SOD1, mitochondriales SOD2 und extrazelluläres SOD3.¹⁷⁶ SOD3 wurde bereits beim Menschen im Fettgewebe gefunden,¹⁷⁷ besonders im WAT.¹⁷⁸ Außerdem wurde SOD3 bereits im Serum verschiedener Säugetiere, auch Mäusen nachgewiesen.¹⁷⁹ Im hier untersuchten egWAT wurde es in der HFD- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe vermehrt nachgewiesen.

Nguyen et al. zeigen in ihrer Übersichtsarbeit, dass SOD3 in vielen entzündlich bedingten Erkrankungen wie Psoriasis, Neurodermitis, Akne vulgaris, UV-Dermatitis,

Arthritis, Lungenfibrose, COPD oder diabetische Nephropathie die Immunreaktion sowie die Pathogenese der Krankheiten moduliert.¹⁷⁶

Ein besonderer Fokus soll hier auf die diabetisch bedingten kardiovaskulären Erkrankungen gelegt werden. Die Oxidation von Lipiden, besonders Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) wird durch ROS induziert, ein Prozess, der für die Entstehung atherosklerotischer Plaques in den Gefäßen wichtig ist.¹⁸⁰ Somit gilt oxidativer Stress als eine der Ursachen für die Entstehung verschiedener Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Atherosklerose und Bluthochdruck, deren Prävalenz bei Adipösen erhöht ist.^{28,99} Außerdem haben Diabetiker ein 3-fach erhöhtes Risiko eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln als Nichtdiabetiker, was nach einer Arbeit von *Soedamah-Muthu et al.* auf ein erhöhtes oxidatives Stresslevel zurückzuführen sein könnte.¹⁸¹ In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass endogenes SOD3 für Schutz und Aufrechterhaltung des Endothels eine wichtige Rolle spielt¹⁸² und bei diabetischen Trägern einer Mutation im für SOD3 kodierenden Gen ein erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu finden ist.¹⁸³ Eine Studie aus dem Jahr 2003 konnte eine starke Korrelation zwischen elevierten SOD3-Serumspiegeln und dem Schweregrad von diabetisch bedingten vaskulären Komplikationen beobachten.¹⁸⁴ Dabei konnten bereits verschiedene Stimuli identifiziert werden, die SOD3 hochregulieren: in menschlichen Fibroblasten wurde der SOD3-Spiegel durch Interferone (IFN) und IL-1 erhöht,¹⁸⁵ Sertoli-Zellen der Ratten zeigen ebenfalls eine Induktion durch IL-1,¹⁸⁶ INF und TNF scheinen ebenfalls eine wirksame Kombination für die Induktion von SOD3 in alveolären Typ II Pneumozyten zu sein.¹⁸⁷ Weniger Daten liegen bisher zur Ausschüttung im Fettgewebe vor.

Die signifikante Erhöhung von SOD3 unter HFD im Vergleich zur SD stimmt mit den bisher nachgewiesenen Veränderungen im Fettgewebe bei übergewichtigen (ob/ob) Mäusen überein. Bei diesen konnte im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung des SOD3-Spiegels in Leber, Niere, Hoden, Gastrocnemius-Muskel, WAT, braunem Fettgewebe (BAT) und Plasma nachgewiesen werden, wobei auch die mRNA-Expression erhöht war.¹⁷⁷ Die hier nachgewiesene Erhöhung im egWAT der HFD-Versuchsgruppe könnte ein wichtiges Anzeichen für ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung oxidativer-Stress-bedingter Folgeerkrankungen sein.

5.5.1.2 Thioredoxinsystem

Eine wichtige Proteingruppe zur Sicherung des Gleichgewichts zwischen mitochondrial produzierten ROS und antioxidativen Signalkaskaden sind neben Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidasen und -reduktasen die Enzyme des Thioredoxinsystems, zu denen auch Thioredoxin-Reduktase 2 (Txnrd2) gehört.¹⁸⁸ Txnrd2 steuert gemeinsam mit Thioredoxin (Txn2) und Glutathion die Freisetzung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) aus den Mitochondrien. Es ist bekannt, dass Txnrd2 eine zentrale Komponente verschiedener zellulärer Signalwege ist, die für die Zellfunktion, Zellproliferation, den antioxidativen Schutz und redoxregulierte Signalkaskaden entscheidend sind.¹⁸⁹ Dabei moduliert Txn2 selbst die Funktion von 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase (Mpst), wodurch Schwefel für thiophile Akzeptoren bereitgestellt wird.¹⁹⁰

Hier signifikant verändert war Txnrd2, welches sowohl in der HFD-, als auch in der WSD- jeweils im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe runterreguliert war. Außerdem war Txn2 ebenfalls bei HFD vs. SD vermindert exprimiert, während es bei DIO und WSD jeweils im Vergleich zu HFD hochreguliert ist. Mpst konnte einerseits bei HFD- und andererseits WSD-Verfütterung jeweils im Vergleich zu SD vermindert nachgewiesen werden.

Während das ROS-System schon länger bekannt ist, wird die Rolle einzelner Proteine erst allmählich erkannt.¹⁹¹ Bisher gibt es vor allem Erkenntnisse zur Rolle von Txnrd2 im vaskulären System, aus denen jedoch auf die Funktion in anderen Geweben geschlossen werden kann: Es konnte gezeigt werden, dass Txn2 in Endothelzellen während eines ischämischen Insults herunterreguliert ist; wird das Enzym jedoch überexprimiert, wird der üblicherweise beobachtete ROS-Anstieg, die Leukozyten-Infiltration sowie die Apoptosereaktion vermindert.¹⁹² Auch *Widder et al.* konnten zeigen, dass eine ubiquitäre Txn2-Überexpression einen Angiotensin-II-induzierten ROS-Anstieg begrenzen konnte.¹⁹³ In vitro führte eine Deletion von Txnrd2 zu erhöhten ROS sowie einer Beeinträchtigung des Membranpotenzials.¹⁸⁸ Ein Versuch an Schweinen konnte direkt in verschiedenen Geweben einen reduzierten Spiegel an Txnrd2 nach Inflammationsreiz nachweisen,¹⁹⁴ sowie bestätigen, dass Txnrd2 selenabhängig ist. *Mou et al.* zeigten daraufhin, dass eine Supplementierung von trächtigen Sauen mit Selen sowohl das Outcome (mehr lebend geborene Ferkel) verbessert, als auch die Konzentration an antioxidativen Selenoproteinen wie Txnrd2 in der Plazenta und der Leber der neugeborenen Ferkel

erhöht sowie die erniedrigte IL-6-Konzentrationen im Serum bewirkt.¹⁹⁵ Im Mausmodell zeigten Tiere mit einem endothelialen Verlust von Txnrd2 eine erhöhte Gefäßsteifigkeit, sowie einen prothrombotischen, proinflammatorischen Gefäßphänotyp.¹⁸⁸ Dies sind wichtige Kennzeichen einer endothelialen Dysfunktion, die Ursache chronischer Gefäßerkrankungen und spielen damit potenziell eine Rolle als Bindeglied zwischen Adipositasbedingtem oxidativen Stress und Adipositasinduzierten, vaskulären Folgeerkrankungen.

Als vorgeschaltetes Katalyse-Enzym sorgt Mps1 für die Bereitstellung von Schwefel für die darauffolgenden Reaktionen im Thioredoxinsystem.¹⁹⁰ Dabei scheint Mps1 selbst auch eine antioxidative Rolle zuzukommen: bei genetischer Ablation von Mps1 bei Mäusen¹⁹⁶ konnte ein erhöhter oxidativer Stress sowie eine erhöhte Empfindlichkeit auf Oxidantien nachgewiesen werden. Dabei wird Mps1 im Fettgewebe sowohl in Prä-Adipozyten als auch in reifen Adipozyten exprimiert.^{197,198} Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mps1 bei Adipositas vermindert exprimiert wird.¹⁹⁸ Auch bei adipösen männlichen Mäusen unter HFD konnten bereits signifikant reduzierte Mps1-Level im Fettgewebe mit korrespondierend erniedrigter mRNA-Expression nachgewiesen werden.¹⁹⁹ Wir konnten mit der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass auch bei tragenden Weibchen die Expression von Mps1 bei HFD und WSD im Vergleich zur SD signifikant erniedrigt war, als Anzeichen einer erniedrigten antioxidativen Kapazität.

Die hier nachgewiesene verminderte Expression von Txnrd2 sowohl in der HFD- als auch in der WSD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe, unterstützt diese Hypothese. Weiter unterstützt wird diese Hypothese durch die erniedrigte Expression von Txn2 bei HFD im Vergleich zur SD, wobei sowohl in der DIO- als auch WSD-Versuchsgruppe Txn2 in Bezug auf HFD hochreguliert war. Dies könnte darauf hinweisen, dass nicht nur die antioxidative Kapazität unter den Übergewichtsinduzierenden Diäten deutlich eingeschränkt ist, sondern der Effekt bei Ernährung mit HFD am stärksten ausgeprägt ist.

5.5.1.3 Peroxiredoxine

Eine weitere Gruppe an gefundenen Proteinen sind Peroxiredoxine (Prdx), eine große Gruppe an Proteinen, die alle Peroxide reduzieren.²⁰⁰ Prdx kommen in fast allen Organismen vor, spielen also evolutionär wahrscheinlich eine wichtige Rolle.²⁰¹ Dabei scheint vor allem die Enzym-Aktivität gegenüber H₂O₂, organischen

Hydroperoxiden und anderen Oxidantien entscheidend für den Schutz vor Zellschäden durch oxidativen Stress zu sein.^{202,203} In der vorliegenden Arbeit konnten das cytosolische Prdx2²⁰⁴ sowie das mitochondriale Prdx3²⁰⁴ im egWAT nachgewiesen werden. Prdx2 zeigte sich im Vergleich zwischen WSD- und DIO-jeweils zur SD-Versuchsgruppe und auch bei WSD im Vergleich zu HFD vermehrt exprimiert. Prdx3 zeigte sich sowohl bei WSD als auch DIO im Vergleich zu HFD erhöht.

Prdx2 scheint eine wichtige Rolle bei der Immunreaktion zu spielen, da es nicht nur ROS reduziert, sondern auch die Reaktionsfähigkeit von Immunzellen auf ROS hemmt.²⁰⁵ Bei einem Mangel an Prdx2 kommt es zu einer erhöhten Exposition gegenüber ROS, wodurch es zur Proliferation von T-Lymphozyten und Differenzierung von dendritischen Zellen kommt.²⁰⁶ Außerdem konnte bei Prx2-/- Mäusen, die mit fettreicher Diät gefüttert wurden, eine signifikante Verringerung des Körpergewichts sowie eine Verbesserung der Glukose-Clearance im Glukosetoleranztest gezeigt werden.²⁰⁷ Hier konnte eine signifikante Hochregulation in der WSD- und DIO-Versuchsgruppe im Vergleich zur HFD gezeigt werden. Bei einem Versuch mit Skelettmuskelgewebe von HFD-Prdx2-Knockout-Mäusen konnten *Kim et al.* keine Unterschiede bezogen auf den oxidativen Stress und Insulinresistenz nachweisen.²⁰⁸ Dies kann ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Bedeutung von Fettgewebe, vor allem WAT, als Ausgangsmaterial für Untersuchungen des oxidativen Stresses lange unterschätzt wurde und weitere Untersuchungen von Prdx2 im Fettgewebe notwendig sind, um die Rolle für oxidativen Stress zu ergründen.

Das ebenfalls nachgewiesene Prdx3 ist vor allem in den Mitochondrien lokalisiert²⁰⁹ und scheint an der metabolischen Homöostase beteiligt zu sein. Bei Prdx3 -/- Tieren finden sich eine erhöhte Fettmasse bei Adipozytenhypertrophie, eine Dysregulation der Adipokine sowie eine Beeinflussung verschiedener mitochondrialer Enzyme, was schlussendlich in einer gestörten Glukosetoleranz und damit Insulinresistenz mündet.²¹⁰ Somit zählt Prdx3 zu den Schlüsselmolekülen zur Regulation von Adipozyten, die oxidativem Stress ausgesetzt sind.²¹⁰ Unsere Untersuchungen zeigten eine signifikante Hochregulierung bei DIO und WSD im Vergleich zu Tieren, die SD fraßen sowie eine Hochregulierung bei WSD gegenüber HFD. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen am Menschen, bei denen eine signifikante Verringerung an Prxd3 im perirenal Fettgewebe bei einem BMI über 25 nachgewiesen werden

konnte.²¹⁰ Weitergehende Forschungen an Mäusen können Hinweise dazu liefern, wie unsere Ergebnisse einzuordnen sind.

5.5.1.4 weitere Proteine

Ein weiteres mithilfe des Schlagwortes *oxidative stress* identifiziertes Protein ist die Serin/Threonin-Kinase 24 (Stk24). Die Hauptaufgabe des Enzyms scheint in der Regulation des Zellzyklus, Zellwachstums, der Migration und Entwicklung von Synapsen zu liegen.²¹¹⁻²¹³ Stk24 wurde in der Vergangenheit aber auch bereits als positiver Modulator von IL-17 identifiziert, einem Entzündungszytokin, das eine wichtige Rolle bei Gewebsinflammation und Autoimmunerkrankungen spielt und selbst proinflammatorischen Zytokine und Chemokine induziert.²¹⁴ Im Vergleich zur SD-Gruppe ist Stk24 bei DIO-Tieren hier signifikant vermehrt exprimiert, was ein indirekter Hinweis auf eine erhöhte IL-17 bedingte Gewebsinflammation sein kann.

Außerdem konnte eine vermehrte Expression der Nikotinat-Phosphoribosyltransferase (Naprt) in der DIO- gegenüber HFD-Versuchsgruppe nachgewiesen werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Naprt als extrazellulärer Ligand für den Toll-like-Rezeptor 4 fungiert, als schadensassoziiertes molekulares Muster (DAMP) wirkt und damit eine Schlüsselrolle bei Entzündungsreaktionen einnimmt.²¹⁵ Kommen menschliche oder Nagetier-Makrophagen mit Naprt in Kontakt, kommt es zu einer Aktivierung des Inflammasoms.²¹⁵ Studien weisen außerdem darauf hin, dass Naprt den zellulären Nicotinamidadenindinukleotid(NAD)-Spiegel erhöht und damit indirekt die Zytotoxizität von H₂O₂ reduziert und damit dem oxidativen Stress entgegenwirkt.²¹⁶ Der hier gezeigte vermehrte Nachweis in der DIO- im Vergleich zur HFD-Versuchsgruppe könnte also ein Hinweis auf einen erhöhten antioxidativen Bedarf geben.

5.5.1.5 Zusammenfassung

Insgesamt konnte durch die acht untersuchten Proteine eine Verminderung der antioxidativen Kapazität vor allem bei HFD, DIO und WSD jeweils im Vergleich zur SD nachgewiesen werden. Zusätzlich waren Marker, die für eine Erhöhung des oxidativen Stresslevels relevant sind, in diesen Versuchsgruppen hochreguliert. Für einige Proteine wie Prdx2 konnte sogar eine signifikant höhere (und damit potenziell pathologischere) Expression bei Tieren der WSD-Versuchsgruppe gegenüber den HFD-Tieren nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Induktion

von oxidativem Stress nicht nur bei Verwendung von HFD gelingt, sondern auch die Verfütterung von DIO oder WSD geeignet ist, um im Mausmodell oxidativen Stress abzubilden.

5.5.2 Schlagwort: *adipocyte*

Mithilfe des Schlagwortes *adipocyte* und seiner Abwandlungen konnten drei potenziell interessante Proteine nachgewiesen werden (siehe Tabelle 13). Ein Protein stammt aus der Gruppe der Lipidsignalweg-regulierenden fettsäurebindenden Proteine (Fabps), die beiden anderen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Adipozyten über die Caveolae.

5.5.2.1 Lipidsignalweg

Fabps tragen mithilfe verschiedener Lipid-Signalwege zur Regulation des Stoffwechsels bei. Unter anderem sind Fabps aktiv im Transport von Fettsäuren zu intrazellulären Organellen, bei der Transkriptionsregulierung im Zellkern sowie bei der Speicherung von Lipidtropfen im Zytoplasma eingebunden.²¹⁷ Hier konnte Fabp4 nachgewiesen werden, welches sowohl bei DIO- als auch WSD-Versuchsgruppen im Vergleich zu SD vermehrt exprimiert wurde. Linolsäure scheint die höchste Affinität für Fabp4 unter normalen Bedingungen zu haben,²¹⁸ was darauf hindeutet, dass eine der physiologischen Funktionen von Fabp4 auch den Transport von Linolsäure beinhaltet. Unter Bedingungen mit erhöhtem oxidativem Stress wie beispielsweise bei Fettleibigkeit zeigt jedoch Palmitinsäure eine hohe Affinität zu Fabp4.²¹⁸ So zeigen Makrophagen unter Behandlung mit rekombinantem Fabp4 nur in Anwesenheit von Palmitinsäure eine deutlich verstärkte Entzündungsreaktion mit Aktivierung des Chemokin-Signalwegs.²¹⁸

Dabei wird das hier gefundene Fabp4 vor allem in Adipozyten und Makrophagen exprimiert und spielt zusätzlich eine essenzielle Rolle in der Entwicklung von Insulinresistenz und Atherosklerose.²¹⁷ Es wird außerdem mit einer metabolisch bedingten, chronischen Inflammation in Verbindung gebracht.²¹⁹⁻²²¹ Induziert wird die Expression von Fabp4 unter anderem während der Adipozytendifferenzierung,²²² während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen,²²³ durch Fettsäuren²²⁴ und Insulin.²²⁵ Neben den direkten zellulären Effekten konnten parakrine sowie endokrine Effekte nachgewiesen werden, die die Rolle von Fabp4 als wichtiges metabolisches Regulatorprotein unterstreichen.²²⁶⁻²²⁹ Auch konnte eine starke Korrelation zwischen Adipositas und dem Fabp4-Plasmaspiegel nachgewiesen

werden.^{230,231} Studien konnten zeigen, dass Fabp4-defiziente Mäuse unter HFD und genetisch bedingter Adipositas eine geringere Insulinresistenz aufweisen.²³² Auch zeigten ob/ob-Fabp4-/- Mäuse einen noch adipöseren Phänotyp als ob/ob Mäuse mit erhöhtem Körpergewicht und größeren Fettpolstern bei verbesserter Insulinempfindlichkeit, geringerer Dyslipidämie und niedrigeren Plasma-Triglycerid- und Cholesterinwerten.²³³ Damit übereinstimmend zeigte sich bei erhöhten Fabp4-Serumspiegeln eine Assoziation mit Adipositas,²³¹ einem metabolischen Syndrom,²³⁴ Insulinresistenz,²³⁵ DM-II,²³⁶ Hypertension,²³⁷ Dyslipidämie,²³⁸ Atherosklerose²³⁹ und Herzversagen.²⁴⁰

Das im Serum nachzuweisende Fabp4 wird zum größten Teil von Adipozyten im Fettgewebe freigesetzt,²²⁹ sodass bei Adipositas vermutlich auch eine erhöhte Expression im Fettgewebe nachzuweisen ist. Damit übereinstimmend konnten wir die signifikant erhöhte Expression von Fabp4 in der DIO- und WSD-Versuchsgruppe jeweils im Vergleich zu SD nachweisen. Dies ist auch im Einklang mit den bisher nachgewiesenen positiven Korrelation von Fabp4 im Serum und Adipositas.²³⁰ Aufgrund des oben beschriebenen engen Zusammenhangs zwischen Fabp4 und metabolischen Veränderungen bei Adipositas ist davon auszugehen, dass Tiere, die DIO oder WSD erhielten, vermutlich ein erhöhtes Risiko für metabolisch bedingte Folgeerkrankungen wie Insulinresistenz oder Hypertension aufweisen.

Aufgrund der vielfältigen Effekte auf den Metabolismus scheint Fabp4 außerdem ein interessanter Kandidat für eine therapeutische Intervention bei metabolisch bedingten Folgeerkrankungen wie beispielsweise Insulinresistenz zu sein, wobei sich die Forschung dazu noch in einem experimentellen Stadium befindet.^{217,241,242} Nach den von uns gezeigten Ergebnissen scheint es sinnvoll zu sein, diese potenziellen medikamentösen Kandidaten im Tierversuch nicht nur unter HFD zu testen, sondern auch Versuchsgruppen unter Hochfett-/Hochzucker-Diäten ins Experiment einzuschließen. Somit könnten einerseits die tatsächlichen menschlichen Ernährungsmuster besser nachgestellt werden und möglicherweise ein stärkerer Effekt als bei reiner Hochfettdiät nachgewiesen werden.

5.5.2.2 Caveolae-assoziierte Proteine

Wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, scheint ein Schlüsselfaktor bei der Differenzierung zwischen metabolisch gesunden Übergewichtigen und metabolisch beeinträchtigten Übergewichtigen in dem Potenzial zur weiteren Ausdehnung des Fettgewebes und

damit dem „Spill-over“ von Fettsäuren in primär nicht fettspeichernde Gewebe mit anschließender Lipotoxizität zu liegen.^{52,243} Dabei ist Fettgewebe (vor allem scWAT) das Organ mit dem größten Ausdehnungspotenzial mittels Adipogenese, in Zeiten eines Kalorienüberschusses.²⁶ Bei Dysregulation der Adipogenese kommt es vermehrt zu Erkrankungen wie dem metabolischen Syndrom, DM-II, Dyslipidämie und kardiovaskulären Folgeerkrankungen.^{48,244}

Polymerase I und Transkriptionsfaktor (Ptrf) wurde 1998 das erste Mal kloniert und als Faktor bei der Beendigung der Transkription charakterisiert.²⁴⁵ In den letzten Jahren konnte außerdem eine wichtige Rolle bei der Bildung von Caveolae beschrieben werden, in denen Ptrf auch lokalisiert zu sein scheint.²⁴⁶ Caveolae nehmen eine Rolle als Membransensoren, Organisatoren der Plasmamembran und extrazellulären Matrix ein, steuern also die Interaktion der Zelle mit ihrer Umgebung.²⁴⁷ Zusätzlich konnte Ptrf im Cytoplasma und im Zellkern identifiziert werden,²⁴⁸ wobei die höchste Expression in Muskeln, Osteoblasten und Adipozyten zu finden ist.²⁴⁹ Die Caveolae in Adipozyten erhalten verschiedene Proteine, die zur Stoffwechsellagerung wichtig sind wie beispielsweise Fettsäure-Acyl-CoA-Synthetase (Acacb).²⁵⁰ Hier nachgewiesen werden konnte eine erhöhte Expression von Ptrf bei der WSD- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe bei erniedrigter Expression von Acacb in der DIO- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe.

Viel deutet darauf hin, dass sowohl eine Fettsäuresynthese als auch eine gestörte Fettsäureoxidation eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Adipositas und den damit verbundenen Stoffwechselveränderungen spielen.^{251,252} Wir konnten Acacb mithilfe des Proteomic-Screens als erniedrigt in der DIO- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe nachweisen. Dabei findet sich Acacb anderen Forschungen zufolge vor allem in Herz- und Muskelgewebe²⁵³ und weniger in Adipozyten als Acetyl-CoA-Carboxylase¹²⁵⁴ und fungiert als Hemmer der mitochondrialen Fettsäureoxidation.²⁵⁵ Nach bisherigen Erkenntnissen scheint Acacb eine essenzielle Rolle bei den metabolischen Veränderungen im Rahmen von Adipositas zu spielen, weshalb es extensive Forschung zum therapeutischen Nutzen von Acetyl-CoA-Carboxylase-Inhibitoren gibt.²⁵⁶⁻²⁵⁸ Im Gegensatz dazu steht die signifikant erniedrigte Expression von Acacb bei DIO gegenüber SD, die wir in dieser Arbeit nachweisen konnten. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der Verwendung von C57BL/6N-Mäusen mit reinem genetischem Hintergrund liegen. Auch bei Untersuchungen von *Hoehn et al.* zeigte sich bei C57BL/6N-Mäusen mit reinem genetischem Hintergrund ein

unterschiedlicher Phänotyp bei *Acacb*-defizienten Mäusen als bei anderen Mäusestämmen.²⁵⁹ Möglicherweise gibt es also eine besondere Interaktion zwischen genetischen Merkmalen bei C57BL/6N-Mäusen mit reinem genetischem Hintergrund und *Acacb*, der in Zukunft genauer untersucht werden sollte. Eine erneute Überprüfung der Ergebnisse mit tragenden Mäusen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen wie beispielsweise von *Abu-Elheiga et al.* vorgeschlagen,²⁶⁰⁻²⁶² ist notwendig, um eine verlässliche Aussage über den Einfluss der verschiedenen Diäten auf die *Acacb*-Expression treffen zu können.

In vorangegangenen Forschungsarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass *Ptrf* im scWAT eng mit der Glukosetoleranz assoziiert ist.²⁶³ So wurde *Ptrf* bei gestörter Glukosetoleranz hochreguliert, was selbst wiederum die Adipozytendifferenzierung negativ beeinflusste, die De-novo Lipogenese verringerte sowie zu einer vermehrten Lipolyse führte.²⁶³ Insulin vermindert einerseits die Expression von *Ptrf* direkt, sorgt andererseits aber auch für eine intrazelluläre Translokation des vorhandenen *Ptrf* auf außerhalb der Caveolae, was zur Umwandlung von Fettsäuren in Triacylglyceride bei erhöhter Anzahl zirkulierender Fettsäuren führt.²⁴⁸ Die in unserem Projekt gezeigte signifikante Erhöhung der *Ptrf*-Expression nach WSD-Verfütterung im Vergleich zu den Tieren der SD-Versuchsgruppe stimmt mit Proteomics-Untersuchungen des Fettgewebes mit WSD-gefütterter männlicher Mäuse überein.²⁶³ Dies ist ebenfalls übereinstimmend mit Ergebnissen im Fettgewebe von Patienten, bei denen jeweils auch eine erhöhte Freisetzung von *Ptrf* bei reduziertem Glukosetoleranzstatus unter Adipositas im scWAT nachgewiesen werden konnte.²⁶³ Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass die Hochregulation von *Ptrf* bei WSD-Tieren Veränderungen im Fettgewebe begünstigt, die die Glukosetoleranz im Fettgewebe herabsetzen sowie die Zirkulation von freien Fettsäuren fördern. Zusätzlich sprechen Daten aus dem Jahr 2011 dafür, dass *Ptrf* bei oxidativem Stress überexprimiert wird,²⁶⁴ was die bisherigen Ergebnisse zur WSD aus Kapitel 5.5.1 unterstützt.

5.5.2.3 Zusammenfassung

In Zusammenschau der Ergebnisse konnte vor allem für die WSD eine vermehrte Expression bei *Fabp4* und *Ptrf* im Vergleich zur SD gezeigt werden. Dies kann ein Hinweis auf eine verminderte Glukosetoleranz im Fettgewebe der WSD-Versuchstiere sein. Außerdem wird der klinische Nutzen beider Marker derzeit erforscht: während *Fabp4* als therapeutisches Target bei metabolischen Erkrankungen in Frage kommt, wird der Nutzen von *Ptrf* als Biomarker

beispielsweise bei Gliomen erforscht.²⁶⁵ Neben den direkten Schlussfolgerungen aus unseren Ergebnissen konnten wir mit dieser Arbeit zeigen, dass bei der Konzipierung von Tierversuchen zur Erprobung dieser Proteine eine Hochzucker-/Hochfett-Diät anstatt einer HFD zur Adipositasinduktion besser geeignet scheint.

5.5.3 Schlagwort: *obesity*

Es ist allgemein bekannt, dass Mitochondrien als Kraftwerke der Zelle fungieren. Weniger bekannt ist, dass Mitochondrien hochdynamische Zellorganellen sind, die sich ständig teilen, fusionieren und migrieren.²⁶⁶ Dies ermöglicht unter anderem die Übertragung von Mitochondrien auf Tochterzellen während der Zellteilung sowie eine Beeinflussung der Apoptose.²⁶⁷

Mitochondrien können durch den Austausch untereinander mittels Fusion genetische Fehlfunktionen überwinden und somit funktionsfähig bleiben.²⁶⁸ Ein wichtiges Regulationsprotein für die Fusion von Mitochondrien ist Mitofusin-2 (Mfn2).²⁶⁹ Veränderungen in der Mfn2-Expression konnten bereits bei DM-II, Übergewicht und Insulinresistenz, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, nachgewiesen werden.^{270,271} *Bach et al.* konnten eine verminderte mRNA- und Proteinexpression von Mfn2 in Skelettmuskeln von menschlichen diabetischen und adipösen Patienten sowie Ratten nachweisen.²⁷² Dies stimmt mit unseren Erkenntnissen überein: Tiere der WSD-Gruppe zeigten im egWAT eine signifikant geringere Mfn2-Expression als Tiere unter SD (siehe Tabelle 13). Dabei ist eine Dysregulation der Mitochondrien unter anderem mit metabolischen Erkrankungen wie Adipositas und DM-II assoziiert.²⁷³ Auch die Morphologie der Mitochondrien ist bei Diabetikern und fettleibigen Ratten gestört, ein Zeichen verminderter Fusionskapazität. Diese reduzierte Fusionskapazität unter Adipositas konnte bisher vor allem in Skelettmuskeln nachgewiesen werden.²⁷⁴ *Mancini et al.* konnten allerdings auch eine Abnahme von Mfn2 in weißem und braunem Fettgewebe bei Beginn einer kalorienreichen Ernährung zeigen und ihre Ergebnisse sogar durch korrespondierende Ergebnisse bei adipösen Patienten untermauern.²⁷⁵ Anschließend konnten sie durch Züchtung einer Adipozytenspezifischen Mfn2-Knockout-Maus beweisen, dass mit vermindertem Mfn2-Spiegel in Adipozyten nicht nur eine verminderte mitochondriale Fusion einhergeht, sondern es auch zu zunehmenden Fettablagerungen in WAT und BAT kommt.²⁷⁵ Zusätzlich konnte eine Verringerung der Adipozytengröße bei gleichzeitiger Zunahme der Fettmasse bei den Knockout-Mäusen beobachtet werden.²⁷⁵ Somit könnte die reduzierte Mfn2-Expression bei den Tieren der WSD-

Versuchsgruppe ein Hinweis auf eine verminderte Fusionskapazität der Mitochondrien mit Konsequenzen für den Metabolismus im WAT sein.

5.5.4 Schlagwort: *energy/fat metabolism/lipogenesis*

Mithilfe der Schlagworte *energy/fat metabolism/lipogenesis* konnten insgesamt 15 signifikant veränderte Proteine identifiziert werden (siehe Tabelle 13). Darunter waren Schlüsselproteine des Acetyl-CoA-Stoffwechsels, Apolipoproteine, Proteine der Lipogenese sowie des mitochondrialen Stoffwechsels, aber auch einzelne regulierende Proteine des Energiestoffwechsels wie Aldoa.

5.5.4.1 Acetyl-Coenzym A-Metabolismus

Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) gilt bei fast allen Säugetieren und auch beim Menschen als wichtigstes Zwischenprodukt bei der zellulären Verstoffwechslung der drei Hauptnährstoffe Kohlenhydrate, Lipide und Aminosäuren.²⁷⁶ Dabei kann Acetyl-CoA bei verschiedenen Stoffwechselfvorgängen entstehen: Einerseits wird es durch Umwandlung von Pyruvat im Mitochondrium gebildet, einem Endprodukt der Glykolyse und des Protein- und Kohlenhydratabbaus.²⁷⁶ Dieser Schritt wird unter anderem durch das Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-Isoenzym 2 (Pdk2) reguliert. Andererseits entsteht Acetyl-CoA beim Abbau von Fettsäuren durch β -Oxidation.²⁷⁶ Dabei wird die Synthese von Acetyl-CoA aus kurzkettigen Fettsäuren durch die Acetyl-Coenzym A Synthetase (Acss2) katalysiert, die Umwandlung von Malonyl-CoA in Acetyl-CoA dahingegen durch Malonyl-Coenzym A Decarboxylase (Mlycd). Auch durch Spaltung von Citrat im Citrat-Zyklus entstehen Oxalacetat und Acetyl-CoA, eine Reaktion die durch die ATP-Citrat-Lyase (Acly) katalysiert wird.²⁷⁷ Das gebildete Acetyl-CoA kann dann entweder im Mitochondrium mithilfe des Citrat-Zyklus zu CO₂ und H₂O abgebaut werden, wobei für die Zelle nutzbare Energie in Form von ATP entsteht. Außerdem kann Acetyl-CoA auch zur Synthese energiereicher Verbindungen wie Ketonkörper, Cholesterin oder Triglyceride herangezogen werden, die für den Gesamtorganismus für den Anabolismus genutzt werden können.

Pdk2 konnte hier im Vergleich von HFD zu SD vermindert nachgewiesen werden, während wir eine erhöhte Expression bei WSD im Vergleich zu HFD-Versuchstieren zeigen konnten. Eine erhöhte Expression zeigte sich hingegen bei Mlycd und Acss2 im Vergleich von WSD zu HFD. Auch Acly wurde im selben Vergleich bei der WSD-

Versuchsgruppe vermehrt exprimiert, zusätzlich zeigte sich eine verminderte Expression bei WSD im Vergleich zu SD.

Wie bereits beschrieben übernimmt Pdk2 eine wichtige Rolle bei der Regulation von der Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, genauer hemmt sie die Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität und reguliert damit den Metabolitenfluss und hemmt damit letztlich auch die Bildung von Acetyl-CoA, verringert die Glukoseverwertung und erhöht damit den Fettstoffwechsel, eine Reaktion die eng mit der zellulären Reaktion auf Insulin verknüpft ist.²⁷⁸ Dabei reagiert Pdk2 empfindlich auf die Aktivierung durch Acetyl-CoA und NADH und die Hemmung durch Pyruvat.²⁷⁹ Die von Pdk2 vermittelte Inaktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes trägt zwar einerseits zur Aufrechterhaltung einer Euglykämie während des Fastens bei, trägt aber auch in einem solchen Maß bei DM-II zur Hyperglykämie bei, dass es als therapeutisches Ziel in Frage kommt.²⁸⁰ Bisher war vor allem das Isoenzym 4 der Pyruvatdehydrogenasekinase Gegenstand der Forschung.²⁸¹⁻²⁸³ Aber mithilfe einer Pdk2-Knockout-Maus konnte gezeigt werden, dass es bei einem Pdk2-Mangel im gefütterten Zustand zu einer erhöhten Insulinsensitivität kommt.²⁷⁸ Das kann ein Hinweis darauf sein, dass bei dem erhöhten Level von Pdk2, die bei den WSD-Tieren gegenüber der HFD-Versuchsgruppe festgestellt wurde, ein erhöhtes Risiko für eine Insulinresistenz vorliegen kann. Die hier gezeigte erniedrigte Expression in HFD im Vergleich zu SD wurde bisher noch nicht im egWAT von tragenden Mäusen beschrieben.

Zwei der identifizierten Proteine sind in der Umwandlung von Fettsäuren zu Acetyl-CoA beteiligt. Mlycd katalysiert die Umwandlung von Malonyl-CoA zu Acetyl-CoA,^{284,285} dabei wird Malonyl-CoA als zentraler und geschwindigkeitsbestimmender Metabolit sowohl der Fettsäuresynthese als auch der Oxidation langkettiger Fettsäuren beschrieben.²⁸⁶ Bisher wurden vor allem Effekte von Mlycd auf das Myokard bei ischämischen Herzerkrankungen erforscht^{285,287} sowie den Effekt auf den Hypothalamus.²⁸⁸ Dort kommt es bei Anstieg von Malonyl-CoA zu einem Rückgang der Nahrungsaufnahme sowie bei Malonyl-CoA-Abnahme zu erhöhter Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme bei Ratten und Mäusen.²⁸⁸ In dieser Arbeit zeigte sich die Gesamtproteinmenge von Mlycd in der WSD-Gruppe gegenüber HFD im egWAT erhöht, es kommt also vermutlich zu einem erhöhten Umsatz von Malonyl-CoA zu Acetyl-CoA, woraus ein erniedrigter Malonyl-CoA-Spiegel resultiert. Auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht geklärt sind, ist

eine direkte Beeinflussung des hypothalamen Malonyl-CoA durch das egWAT als metabolisch hochaktives Organ denkbar.²⁸⁹ Ein weiteres Protein dieser Gruppe ist Acss2, das bevorzugt kurz- und mittelkettige Fettsäuren verwertet und zu Acetyl-CoA umwandelt.²⁹⁰ Dies scheint nicht nur bei gesunden Zellen, sondern auch bei der Energiegewinnung von Tumorzellen ein Schlüsselschritt zu sein.²⁹¹ Ein Mangel an Acss2 zeigt bei Mäusen unter ernährungsbedingter Fettleibigkeit eine deutliche Verringerung des Körpergewichts und der Lebersteatose,²⁹² wobei auch eine verringerte Aufnahme von Nahrungsfetten durch den Darm, eine gestörte Umverteilung und Verwertung von Triglyceriden aus dem Fettgewebe in der Leber nachgewiesen werden konnte.²⁹² Eine Studie zur Phosphorylierung bei hochfettinduzierter Adipositas zeigte eine Veränderung der Akkumulation von Serumtriglyceriden bei Mutation von Acss2, woraus die Autoren die besondere Relevanz von Acss2 bei Fettleibigkeit ableiten.²⁹³ Die hier gezeigte signifikante Hochregulation in der WSD- gegenüber der HFD-Gruppe könnte auf eine vermehrte Verstoffwechslung von Nahrungsfetten mit einer Erhöhung des Körpergewichts hinweisen.

Ein weiteres Regulationsprotein, das in Glukose- und Lipidmetabolismus eingebunden und das signifikant in den betrachteten Gruppen verändert war, war die ATP-Citrat-Lyase (Acly). Acly nimmt dabei eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel ein, da es die Synthese von Citrat und Coenzym A zu Oxalacetat und Acetyl-Coenzym A katalysiert,²⁷⁷ wodurch es den Glukose- mit dem Fettsäurestoffwechsel verbindet. Auch dieser Schritt ist besonders relevant für Malignomzellen, die ihren enormen Energiebedarf meist durch De-novo-Lipidsynthese und Glykolyse decken (Warburg-Effekt) als auch bei Malignomen.²⁹⁴⁻²⁹⁷ Neben dem klinischen Nutzen von Acly als Therapieansatz bei Malignomen,^{294,298,299} geriet es als potenzielles Ziel zur Behandlung von Hyperlipidämie und Hypercholesterinämie in den Fokus. Acly-Inhibitoren konnten in klinischen Studien eine cholesterinsenkende Wirkung beim Menschen erzielen.^{300,301} In unseren Proteom-Analysen des egWAT konnte ein signifikant erniedrigtes Level von Acly bei WSD-Tieren im Vergleich zu SD, bei gleichzeitig signifikant erhöhtem Level gegenüber HFD nachgewiesen werden. In der WSD-Versuchsgruppe wurde also mehr Acly als bei HFD, aber weniger als bei SD nachgewiesen. Daten, die sich ebenfalls mit den Veränderungen von Acly im egWAT bei verschiedenen Diäten beschäftigen, gibt es bisher nicht. Eine Arbeit, die sich mit Citrat (einem Ausgangsprodukt der durch Acly katalysierten Reaktion) beschäftigt

hat, beschreibt eine erhöhte Nüchternglykämie, Glukoseintoleranz und Expression von proinflammatorischen Zytokinen bei Verfütterung von Citrat mit Saccharose an Mäuse.³⁰² Eine erhöhte Induktion von Acyl im egWAT könnte also zu einer Verschlechterung der metabolischen Situation bei Adipositas beitragen. Es muss aber davon ausgegangen werden, dass eine Beeinflussung durch Nahrungsaufnahme wahrscheinlich erscheint, sodass unsere Ergebnisse erneut nach Fastenbedingungen untersucht werden sollten.

Zuletzt konnte auch Acyl-Coenzym A Desaturase 1 (Scd1) nachgewiesen werden, ein Protein, das in der von Acetyl-CoA ausgehenden Lipogenese eine wichtige Rolle beim Aufbau von einfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem Oleat (C18:1) und Palmitoleat (C16:1) spielt.^{303,304} Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Triglyceridsynthese in hohem Maße von der Scd1-Genexpression abhängig ist.³⁰⁵ Knockout-Mäuse, denen global Scd1 fehlte, zeigten auch unter übergewichtsinduzierender Diät eine geringere Fettleibigkeit, eine höhere Insulinempfindlichkeit sowie eine Resistenz gegen die Gewichtszunahme und verringerte Plasma-Insulinspiegel.³⁰⁶ Auch konnten *Sampath et al.* zeigen, dass bei Mäusen bei Ernährung mit hohem Anteil an gesättigten Fettsäuren das Scd1-Gen als eines der ersten lipogenen Gene in der Leber induziert wird.³⁰⁷ Die Forschungsgruppe um *Sampath et al.* interpretiert ihre Ergebnisse so, dass Scd1 „*als molekularer Schalter bei der Förderung oder Verhinderung von lipidinduzierten Störungen, die durch den Verzehr eines Übermaßes an gesättigten Fetten hervorgerufen werden*“ (aus dem Englischen übersetzt aus Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat, Sampath et al., 2007)³⁰⁷ dient. Auch wir konnten ein erhöhtes Scd1-Level im egWAT bei WSD-Tieren gegenüber HFD-Tieren zeigen. Möglicherweise kommt es also zu einer erhöhten Triglyceridsynthese und -speicherung bei Tieren der WSD-Versuchsgruppe, da die Kapazität zur Verhinderung dieses Überflusses durch die erhöhten Scd1-Level erschöpft ist.

5.5.4.2 Apolipoproteine

Apolipoproteine bilden zusammen mit Phospholipiden eine hydrophile Oberfläche, die hilft die wasserunlöslichen Lipide im Blut zu transportieren. Sie werden vor allem in Leber und Dünndarm synthetisiert.³⁰⁸ Hier konnten wir ein verändertes Level an Apolipoprotein IV (Apoa4) zeigen, welches im Vergleich von DIO gegenüber SD vermehrt nachgewiesen wurde. Apoa4 wurde bisher vor allem in der Leber erforscht

und wird dort durch chronisch hohe Nahrungsfette induziert.³⁰⁹ Es konnte auch gezeigt werden, dass C57BL/6-Mäuse bei hoher Aufnahme von Nahrungsfetten nicht nur erhöhte ApoA4-Spiegel in der Leber zeigten, sondern auch um das 10-fache anfälliger für atherosklerotische Läsionen waren.³⁰⁹ Dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen, wir konnten eine signifikante Erhöhung der ApoA4-Expression in der DIO- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe nachweisen. Allerneueste Ergebnisse zeigen allerdings ein weniger gradliniges Bild bei ApoA4-Knockout-Mäusen,³¹⁰ sodass weitere Untersuchungen notwendig sind.

Apolipoprotein C-II (ApoC2) hingegen spielt eine Rolle beim Transport von VLDL, LDL und HDL im Plasma.³¹¹ Unser Tierversuch zeigte eine vermehrte Expression von ApoC2 bei WSD gegenüber SD. Das steht im Gegensatz zu bisherigen Daten, bei denen ApoC2-Mangel beim Menschen zu einer Hypertriglyceridämie führte.³¹² Möglicherweise ist das durch eine besonders kurze Halbwertszeit begründet, sodass eine erneute Untersuchung unter definierten Fastenbedingungen notwendig wäre, um die Ergebnisse besser interpretieren zu können.

Apolipoprotein A-II (ApoA2) ist vor allem im Stoffwechsel von HDL-Cholesterin eingebunden.^{313,314} In unseren Proteomanalysen im egWAT konnten wir ein erhöhtes Level an ApoA2 bei WSD- im Vergleich zu SD-Versuchsgruppen nachweisen. Beim Menschen wird ApoA2 größtenteils in der Leber und nur in geringerem Maß im Darm synthetisiert und sezerniert,³¹⁵ wobei die Plasmakonzentration anscheinend vor allem durch die Synthese festgelegt wird.³¹⁶ Niedriges HDL-Cholesterin und erhöhte Triglyceride sind zwei diagnoserelevante Stoffwechselfparameter bei Menschen mit Übergewicht und DM-II.³¹⁷ In in-vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass ApoA2 in der Lage ist Apolipoprotein A-I von der Oberfläche von HDL zu verdrängen,³¹⁸ wodurch die Funktion von HDL beeinträchtigt sein könnte.³¹⁹ Bei Zugabe von menschlichem ApoA2 in transgene Mäuse kam es zu einer Verringerung des HDL-Cholesterinspiegels und zur Bildung kleinerer HDL-Partikel.^{320,321} Hier konnten wir zeigen, dass die WSD-Versuchstiere signifikant mehr ApoA2 exprimierten als die Tiere der SD-Gruppe. Dies könnte für eine Erniedrigung des HDL-Spiegels bei WSD-Tieren sprechen, verbunden mit einer geringeren kardioprotektiven Wirkung, wobei die Daten bei ApoA2-Knockout-Mäusen nicht eindeutig sind.³²²

5.5.4.3 Lipogenese

In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2013 wird das Thyroidhormonabhängige-Protein (Thrsp) als Kernprotein mit besonderer Relevanz für den Lipidstoffwechsel beschrieben.³²³ Thrsp diene nach *Kuemmerle et al.* als „ein Motor der De-novo-Synthese gesättigter Fettsäuren in normalem und bösartigem Gewebe“ (aus THRSP (thyroid hormone responsive), *Kuemmerle et al.*, 2013).³²³ In der vorliegenden Arbeit konnte Thrsp in der HFD- und DIO- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe vermindert nachgewiesen werden. Eine Induktion ist durch Schilddrüsenhormone,³²⁴ Kohlenhydrataufnahme,³²⁴ Fettgewebisdifferenzierung³²³ und Laktation³²⁵ beschrieben, während Glukagon³²³ und Linolsäure³²⁶ die Expression hemmen. Dabei wird Thrsp hauptsächlich von Geweben exprimiert, die eng in die Fettsäuresynthese eingebunden sind wie weißes und braunes Fettgewebe, Brustgewebe und die Leber. Da die Expression bei malignen Erkrankungen verändert ist, dient Thrsp als Marker, der zur Beurteilung des Tumorphänotyps herangezogen wird.³²⁷ Ein Beispiel dafür ist beim Menschen Brustkrebs³²⁸, bei dem erhöhte Thrsp-Level als Hinweis auf ein aggressives Wachstum gewertet werden.³²⁹

Neueste Forschungsarbeiten konnten beim Menschen unter gesunden Bedingungen eine Induktion von Thrsp in menschlichen Fettgewebsbiopsien nach Hyperinsulinämie nachweisen.³³⁰ Außerdem konnte eine signifikante Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette sowie der Fettsäureoxidation bestätigt werden.³³⁰ Die für uns relevanteste Erkenntnis war jedoch, dass es bei Menschen mit diagnostizierter Insulinresistenz zu einer signifikanten Herunterregulation der Thrsp-Expression auch unter Hyperinsulinämie kam.³³⁰ Genau diese „paradoxe“ Herunterregulation konnten wir bei HFD und DIO im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe nachweisen. Dies steht im Einklang mit anderen Arbeiten, die eine abnorme Herunterregulation von Thrsp während des Fastens im Fettgewebe von fettleibigen Personen beweisen konnten.³³¹ Wir konnten hier also einen Hinweis dazu beitragen, dass bei ernährungsbedingter Adipositas die Bewertung des Thrsp-Levels als Marker für aggressives Wachstum von Malignomen der Mammae falsch niedrig sein könnte. Eine eingehende Erforschung dieser Theorie ist notwendig, da auch der Anteil an übergewichtigen Brustkrebspatientinnen und -patienten weiter zunimmt.³³²⁻³³⁴

5.5.4.4 Mitochondriale Proteine

Bei einem der gefundenen Proteine handelt es sich um den Transporter Translokatorprotein (Tspo), der in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und zahlreiche Funktionen erfüllt: neben der primären Aufgabe als Transporter ist Tspo in die Regulation der ROS-Produktion, der Apoptose und zellulärer Energie eingebunden und katalysiert den umsatzlimitierenden Schritt der Cholesterinaufnahme.³³⁵ Hier konnten wir eine Hochregulation von Tspo bei WSD im Vergleich zu SD nachweisen. Dabei wird Tspo sowohl im ZNS³³⁶ als auch in der Peripherie in Makrophagen bei Inflammationsreizen stark hochreguliert.³³⁷ Auch bei anderen Erkrankungen mit verändertem Energiebedarf, wie etwa bei neurodegenerativen Erkrankungen, gehen mit einer Dysregulation von Tspo einher.^{335,338} Bisher wurden Veränderungen in der Expression von Tspo in verschiedenen Geweben wie braunem Fettgewebe bei Änderungen in der Stoffwechsellage beschrieben.³³⁹ Auch zeigte sich bei einer Studie an Ratten eine Hochregulation von Tspo im WAT nach einem Stressreiz.³⁴⁰ Auch wir konnten bei Tieren die WSD fraßen signifikant mehr Tspo nachweisen als bei Tieren der SD-Gruppe. Diese Ergebnisse müssen in Zusammenhang mit den bisherigen Erkenntnissen über die Expression von Tspo bei diätinduzierter Adipositas betrachtet werden: *Thompson et al.* zeigten eine erniedrigte Expression im WAT bei DIO-Fütterung, jedoch eine erhöhte Expression in den Makrophagen im Fettgewebe.³⁴¹ Folgt man dieser Theorie, könnten unserer Ergebnisse darauf hinweisen, dass es in der WSD- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe zu einer verstärkten Einwanderung an proinflammatorischen Makrophagen kommen könnte, die zur Hochregulation von Tspo im WAT beitragen.

Auch das Carrierprotein Mitochondrial 2-Oxoglutarate/Malate Carrier-Protein (Slc25a11) konnte nachgewiesen werden, wobei es in der WSD-Gruppe im Vergleich zur SD herunterreguliert war. Unter physiologischen Bedingungen ist Slc25a11 am mitochondrialen Cholesterin-Stoffwechsel beteiligt.^{342,343} Daten zu Veränderungen im Fettgewebe sind bisher nicht verfügbar, bei Nierenzellen zeigt eine erhöhte Expression von Slc25a11 jedoch eine Schutzfunktion gegenüber oxidativem Stress.³⁴⁴ Ähnlich zeigte sich bei Herunterregulation von Slc25a11 in HCC-Zellen eine deutliche Sensibilisierung für Hypoxie-induzierte ROS, die in der Apoptose münden.³⁴² Daraus ließ sich für uns schlussfolgern, dass es in der WSD-

Versuchsgruppe aufgrund des erniedrigten Slc25a11-Spiegels zu einer erhöhten Anfälligkeit der Tiere für oxidativen Stress kommen könnte.

5.5.4.5 weitere Proteine

Mit Hilfe der Schlagworte *energy/fat metabolism/lipogenesis* und deren Abwandlungen konnten noch fünf weitere Proteine identifiziert werden. Wenig vielversprechend erscheinen die Ergebnisse von Perilipin-1 (Plin1), welches sowohl bei den WSD- als auch den DIO-Versuchstieren jeweils im Vergleich zur HFD-Gruppe vermindert nachgewiesen werden konnte. Bei Plin1 handelt es sich um ein Protein, dass bei der Formung der Oberfläche von Lipidtröpfchen eine relevante Rolle spielt.³⁴⁵ Außerdem ist es in die Regulation von Lipogenese und Lipolyse eingebunden.³⁴⁵ Die hier gezeigte Herunterregulation von Plin1 in DIO und WSD im Gegensatz zu HFD widerspricht bisherigen Erkenntnissen. Daten beim Menschen, bei denen eine Plin1-Haploinsuffizienz mit einer verbesserten metabolischen Gesamtlage sowie vermindertem Risiko für metabolischen Folgeerkrankungen verbunden³⁴⁶ und genetische Polymorphismen im Plin1-Gen mit einer exzessiven Ansammlung von Körperfett und Verschlechterung von kardiometabolischen Markern verbunden³⁴⁷ ist, könnten ein Hinweis darauf sein, dass Plin1 eine relevante Rolle bei Adipositas spielen könnte. Diese beiden Ergebnisse wurden erst 2022 veröffentlicht, weitergehende Forschung über die Bedeutung von Plin1 im Fettgewebe sind notwendig, um unsere Ergebnisse in die bisherigen Daten einfügen zu können.

Als weiteres wurden relevante Veränderungen in dem Protein AMP-Deaminase 3 (Ampd3) nachgewiesen: es zeigte sich eine erniedrigte Menge an Ampd3 in der HFD- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe. Ampd3 entfernt überschüssiges AMP, dass sich in energiearmen Zellen ansammelt und trägt zur Aufrechterhaltung eines stabilen zellulären Energiehaushaltes bei.³⁴⁸ Bisher wurden die verschiedenen vier Isoformen in Skelettmuskulatur, Leber und Erythrozyten nachgewiesen.³⁴⁹ Daten zur Expression im Fettgewebe fehlen bisher, weshalb die Interpretation unserer Ergebnisse der verminderten Expression in HFD gegenüber SD im egWAT bisher kaum möglich ist.

Ebenfalls nachgewiesen werden konnte eine signifikante Herunterregulation von 5-AMP-aktivierten-Proteinkinase-katalytische-Untereinheit-alpha-1 (Prkaa1) in WSD sowohl gegenüber HFD als auch SD. Unter physiologischen Bedingungen reguliert Prkaa1 viele verschiedene Stoffwechselwege,³⁵⁰ in anderen Forschungsarbeiten

über Veränderungen bei diätinduzierter Adipositas, zeigte eine Runterregulation von Prkaa1 eine protektive Wirkung gegen Adipositas³⁵¹ und Inflammation.^{350,352} Unsere Ergebnisse stehen also im Widerspruch zu den bisher gewonnenen Erkenntnissen über Prkaa1.

Im Gegensatz dazu werden unsere Ergebnisse zur Tripeptidylpeptidase II (Tpp2) durch einige bisher veröffentlichte Ergebnisse unterstützt: Tpp2 wurde in der WSD- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe vermindert nachgewiesen. Dabei ist Tpp2 die größte bisher bekannte Peptidase bei Eukaryoten und erfüllt gleich mehrere Funktionen: neben der Regulation des intrazellulären Proteinabbaus³⁵³ ist Tpp2 auch an anderen Prozessen wie Zellteilung und Antigenverarbeitung beteiligt.³⁵⁴ Die hier beschriebene Herunterregulierung von Tpp2 in der WSD-Versuchsgruppe gegenüber SD könnte die Zellen empfänglicher für die Apoptose machen.³⁵³ In Zellkulturversuchen scheint Tpp2 außerdem eine regulierende Wirkung bei der Adipogenese einzunehmen,³⁵⁵ weshalb weitere Untersuchungen zum Zusammenhang von Diät, Adipogenese, Apoptoseempfindlichkeit und Tpp2 notwendig erscheinen.

Als letztes Protein unter den Schlagworten *energy/fat metabolism/lipogenesis* wurde Fruktose-Bisphosphat-Aldolase A (Aldoa) identifiziert. Die Hauptaufgabe von Aldoa scheint in der Regulation der Glykolyse und Gluconeogenese zu liegen.³⁵⁶ Neue Studien weisen jedoch darauf hin, dass Aldoa auch eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Inflammasoms spielt.³⁵⁷ Aldoa war in der vorliegenden Arbeit in der WSD im Vergleich zur HFD signifikant hochreguliert; eine Entwicklung, die bereits bei Adipozyten unter Einfluss von Insulin in Zellkulturen nachgewiesen werden konnte.³⁵⁸ Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Aldoa über die Aktivierung von Inflammationsreizen die Insulinresistenz im Körper fördert, sodass bei langfristiger Verfütterung von WSD ein erhöhtes Risiko für eine Insulinresistenz bestehen könnte.

5.5.4.6 Zusammenfassung

Insgesamt waren die größte Anzahl an signifikant veränderten Proteinen zu den Schlagworten *energy/fat metabolism/lipogenesis* in der WSD-Gruppe entweder im Vergleich zur SD (n = 7) oder gegenüber HFD (n = 8) verändert. Dabei handelte es sich um Schlüsselproteine des Acetyl-CoA-Stoffwechsels, Apolipoproteine, Proteine des mitochondrialen Stoffwechsels sowie einzelne regulierende Proteine des Energiestoffwechsels wie Aldoa. In Zusammenschau aller Ergebnisse zeigen die

Tiere der WSD-Versuchsgruppe ein Proteinexpressionsmuster, dass auf eine vermehrte Bildung von und negative Beeinflussung durch oxidativen Stress, Lipotoxizität und Inflammation hinweisen.

5.5.5 Schlagwort: *inflammation*

Es ist schon lange bekannt, dass Übergewicht mit einer lokalen und systemischen Entzündungsreaktion einhergeht, die einen zentralen Bestandteil der Pathogenese von adipositasbedingten Folgeerkrankungen wie dem metabolischen Syndrom darstellt.⁷⁷ Damit übereinstimmend konnten in dieser Arbeit mithilfe des Schlagwortes *inflammation* und seinen Abwandlungen insgesamt 15 signifikant veränderte Proteine identifiziert werden. Bei genauerer Recherche zeigte sich, dass sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirkende Proteine vertreten waren. Außerdem konnten wir Proteine mit einer wichtigen Rolle in der Regulation der Adipozytendifferenzierung, dem Energiestoffwechsel aber auch der Apoptose sowie Proteine, die bereits im Rahmen von Schwangerschaftskomplikationen bei Adipositas nachgewiesen wurden, identifizieren. Dadurch konnten wir die These, dass im egWAT der drei diätbedingten Adipositas-Versuchsgruppen inflammationsbedingte Veränderungen einen Einfluss auf diverse Stoffwechselwege der Adipozyten nehmen, weiter belegen.

5.5.5.1 Proinflammatorische Proteine

Ein typisches proinflammatorisches Protein ist Clec10a (C-type Lectin-domain-Familie 10, Mitglied A), das in der Bindung von Kohlenhydratstrukturen wichtig ist.³⁵⁹ Wir konnten sowohl im Vergleich zur SD- als auch zur HFD-Versuchsgruppe eine verminderte Expression von Clec10a nachweisen. Dabei wird Clec10a vor allem von unreifen dendritischen Zellen³⁶⁰ sowie aktiven M2-Makrophagen³⁶¹ exprimiert. Auch ist es an der Verbesserung der Immunantwortaktivität verschiedener Immunzellen beteiligt,³⁶² unter anderem tumorassoziierte Antigene werden von Clec10a wirksam präsentiert.³⁶³ Somit kann unser Ergebnis darauf hinweisen, dass es zu einer verminderten Einwanderung von aktiven M2-Makrophagen ins Fettgewebe bei WSD kommen könnte. Vergleichende Daten zur Clec10a -Expression im Fettgewebe fehlen aber bisher, sodass eine genaue Aussage bisher nicht möglich ist.

Kininogen-1 (Kng1) ist nicht nur ein Bradykinin, sondern auch ein wichtiger proinflammatorischer und pro-apoptotischer Faktor, der sowohl bei Entzündungen als auch bei oxidativem Stress eine wichtige Rolle spielt³⁶⁴ und die Menge an frei zirkulierenden Adiponektinen reguliert.³⁶⁵ Wir konnten eine signifikante

Hochregulation von Kng1 im egWAT der Mäuse unter WSD gegenüber HFD-Verfütterung nachweisen. Bisher fehlen Erkenntnisse zur Expression von Kng1 im Fettgewebe, aufgrund von Erkenntnissen bei septischen menschlichen Patienten^{366,367} kann aber darauf geschlossen werden, dass es sich bei Kng1 um ein positives Akute-Phase-Protein handelt, das auch in unserem Tierversuch im Sinne einer Inflammationsreaktion des gesamten Körpers ebenfalls im egWAT bei WSD-Versuchstieren hochreguliert sein könnte.

Die Aktivierung bestimmter Janus-Kinase-Signaltransduktoren (Jaks) bestimmt die Wirkung einzelner Zytokine, wobei vier verschiedene Jaks bekannt sind. Das bei uns nachgewiesene Jak1 wurde in der DIO- im Vergleich zur HFD-Versuchsgruppe vermindert gemessen. Dabei ist Jak1 an der Signalisierung von γ c-Rezeptor-Zytokinen wie IL-2, IL-4 und IL-7 sowie an der Verarbeitung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IFN beteiligt.³⁶⁸ Vorangegangene Forschungen konnten zeigen, dass durch eine erhöhte Proteinexpression von Jak1 vermehrt IL-6-Signale weitergeleitet werden, wodurch eine gesteigerte Makrophagen/Monozyten-Chemoattraktion ausgelöst wird.³⁶⁹ Die hier gezeigte verminderte Expression von Jak1 in der DIO-Versuchsgruppe widerspricht nicht nur diesen bisherigen Erkenntnissen, es steht auch im Gegensatz zur mittels RT-qPCR nachgewiesenen, gesteigerten Expression von IL-6 bei DIO im Vergleich zur HFD-Versuchsgruppe.

5.5.5.2 Antiinflammatorisches Protein

Das Protein Annexin A1 (Anxa1) wird als typischerweise antiinflammatorisch wirkend beschrieben und war sowohl in der HFD- als auch in der DIO-Versuchsgruppe jeweils im Vergleich zur SD vermehrt nachzuweisen. Bei Anxa1 handelt es sich um ein endogenes Protein, das systemische entzündungshemmende Prozesse moduliert³⁷⁰ und somit eine zentrale Rolle bei der niedriggradigen Inflammation bei Adipositas spielt.³⁷¹ So konnte sowohl im Serum als auch im Fettgewebe von adipösen Patienten ein erhöhter Anxa1-Spiegel nachgewiesen werden, ein Hinweis darauf, dass der Organismus den systemischen und lokalen Entzündungsprozess zu regulieren versucht.^{372,373} Bei genauerer Analyse zeigte sich sogar, dass Anxa1 im Fettgewebe von übergewichtigen menschlichen Probanden vor allem gespalten vorliegt, was *Pietrani et al.* als Zeichen des Scheiterns der Entzündungshemmung im WAT deuteten.³⁷² Somit könnte die hier gezeigte Hochregulation von Anxa1 in der

HFD- und DIO-Versuchsgruppe gegenüber den SD-Tieren auf den Versuch einer Regulation des Entzündungsprozesses hinweisen.

5.5.5.3 Proteine der Adipozytendifferenzierung

Bei der Entstehung von Adipositas spielt auch die Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten eine entscheidende Rolle.^{374,375} Latexin (Lxn) ist ein Schlüsselprotein der Differenzierung und Proliferation verschiedener Stammzellen.^{376,377} Im egWAT der DIO-Versuchstiere konnten wir Lxn im Vergleich zur HFD vermindert nachweisen. Dabei spielt Lxn eine elementare Rolle als positiver Regulator der Proliferation von Adipozyten. Andere Forschungsgruppen konnten bereits nachweisen, dass Lxn über den Zeitraum der Gewichtszunahme bei ernährungsbedingter Fettleibigkeit kontinuierlich ansteigt.³⁷⁸ In dieses Bild können sich unsere Ergebnisse nicht einfügen, da wir trotz erhöhter Gewichtszunahme in der WSD-Versuchsgruppe ein reduziertes Lxn-Level im Vergleich zur HFD-Versuchsgruppe nachweisen konnten. Betrachtet man aber andere Forschungen, zeigt sich, dass die Adipozytendifferenzierung auch eng mit der Expression von Peroxisome Proliferator-aktivierter-Rezeptor-gamma (PPAR γ) assoziiert ist,^{379,380} wobei vor allem die Differenzierung aus Adipozytenvorläuferzellen vor allem über den PPAR γ -Signalweg reguliert wird.³⁸¹ Über eine negative Rückkopplung induziert PPAR γ die Expression von Fapb4 in Adipozyten, welches bei zu hohem Spiegel wiederum den Abbau von PPAR γ fördert.³⁸² Da wir, wie bereits in Kapitel 5.5.2.1 beschrieben, eine erhöhte Expression von Fapb4 nachweisen konnten, könnte es aufgrund der negativen Rückkopplung zu einer verminderten Expression von Lxn gekommen sein. Diese Theorie wird durch Ergebnisse von *Kann et al.* unterstützt, die bei Deletion von Lxn einen verringerten Gehalt an PPAR γ bei erhöhter Expression von Fapb4 nachweisen konnten.³⁷⁸

Ein weiteres Protein, das in die Differenzierung von Adipozyten eingreift, ist die Proteasome-Untereinheit-beta-Typ-8 (Psm8).³⁸³ In der vorliegenden Arbeit konnte einerseits eine verminderte Expression in der HFD- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe und andererseits eine Erhöhung bei DIO- und WSD- jeweils im Vergleich zur HFD-Versuchsgruppe nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Psm8 direkt die Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten reguliert und Psm8-Knockout-Mäuse langsamer an Gewicht zunehmen als Wildtyp-Mäuse und ein geringeres Fettgewebsvolumen und eine geringere Adipozytengröße aufwiesen.³⁸⁴ Somit erschien eine erhöhte Expression in den

Versuchsgruppen mit größerem Fettgewebsvolumen und signifikant erhöhter Adipozytengröße logisch. Hier hingegen zeigten HFD-Tiere signifikant weniger Psmb8 als die SD-Tiere. Bei DIO- und WSD-Verfütterung konnten wir jedoch eine signifikante Hochregulation gegenüber HFD nachweisen. Möglicherweise handelte es sich bei den Daten zur HFD also um einen Ausreißer, der aufgrund der geringen Gruppengröße nicht wieder normalisiert wurde. Für DIO- und WSD-Tiere könnte die erhöhte Expression auf eine vermehrte Differenzierung hin zu reifen und großen Adipozyten hinweisen, ein Prozess, der insgesamt in einer Zunahme des Fettgewebsvolumens mündet.³⁸³

5.5.5.4 Proteine des Energiestoffwechsels

Zwei Proteine, die am Energiestoffwechsel beteiligt sind, konnten mithilfe des Schlagwortes *inflammation* identifiziert werden: Sechs-Transmembran-Epithelial-Antigene der Prostata-4 (Steap4), welches in der DIO- im Vergleich zur HFD-Versuchsgruppe vermindert und das Retinsäure-Rezeptor-Responder-Protein 2 (Rarres2), welches in der DIO- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe vermehrt nachgewiesen wurde (vgl. Tabelle 13).

Die Metalloreduktase Sechs-Transmembran-Epithelial-Antigene der Prostata-4 (Steap4) liegt membrangebunden vor und scheint wichtig für die Reaktion auf Nährstoffe und Entzündungsstress sowie am Fettsäure- und Glukosestoffwechsel beteiligt zu sein.³⁸⁵ Hier konnten wir eine erniedrigte Expression von Steap4 in der DIO- im Vergleich zur HFD-Versuchsgruppe nachweisen. Bisher veröffentlichte Ergebnisse zu Steap4 bei Adipositas sind ambivalent, *Catalán et al.* konnten eine erhöhte Proteinexpression von Steap4 im viszeralen WAT von adipösen Patienten nachweisen.³⁸⁶ Gleichzeitig zeigten sie aber auch eine negative Korrelation zwischen der Konzentration an freiem Eisen und der Genexpression von Steap4, sodass dies möglicherweise eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse sein könnte.³⁸⁶ Im Gegensatz dazu unterstützen die Veröffentlichungen von *Chen et al.* unsere Beobachtung, da sie eine deutlich erniedrigte Expression von Steap4 im Fettgewebe fettleibiger Patienten nachweisen konnten³⁸⁷ und sogar zeigten, dass Steap4 bei menschlichen Adipozyten an der Regulation der Insulinempfindlichkeit beteiligt ist.³⁸⁸ Zu diesem Schluss kommen auch *Qin et al.*³⁸⁹. Die bei uns nachgewiesene verminderte Expression könnte also Ausdruck einer verminderten Insulinsensitivität der Adipozyten der WSD-Versuchsgruppe sein, welche letztendlich in einer Insulinresistenz mündet, einem Kardinalzeichen der Entwicklung eines DM-II.

Ebenfalls am Energiestoffwechsel beteiligt ist Retinsäure, ein aktiver Metabolit von Vitamin A,³⁹⁰ dessen Signale mithilfe des hier identifizierten Retinsäure-Rezeptor-Responder-Protein 2 (Rarres2) übertragen werden.³⁹⁰ In Zellversuchen konnte gezeigt werden, dass Rarres2 den Energieverbrauch von Adipozyten steigert.³⁹¹ Wir konnten eine erhöhte Expression von Rarres2 bei DIO- gegenüber SD-Tieren nachweisen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Adipozyten des egWAT versuchen sich durch eine verstärkte Aufnahme von Retinsäure vor der ernährungsbedingten Adipositas zu schützen, da Retinsäure die Adipogenese unterdrücken kann.³⁹² Außerdem zeigten *Helfer et al.* in einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2018, dass Rarres2 sowohl beim Menschen systemisch als auch lokal positiv mit BMI und Fettleibigkeit assoziiert ist, bei fettleibigen und diabetischen Tieren hochreguliert ist als auch mit Inflammation und Hyperplasie im Fettgewebe verbunden ist, insgesamt also adipositasfördernd wirkt.³⁹³

5.5.5.5 Proteine der Apoptose

Für den Gesamtorganismus ist der programmierte Zelltod von entweder infizierten, beschädigten oder entarteten Zellen ein sehr wichtiger Mechanismus, um Gesundheit und Überleben zu sichern. Dabei können verschiedene Möglichkeiten zum Zelltod führen, unter anderem Apoptose als sterile Form, aber auch Pyroptose als entzündlicher Zelltod. Ein Protein, das daran beteiligt ist, ist Apaf-1-interagierendes Protein (Apip), welches in der WSD- sowohl im Vergleich zur SD- als auch zur HFD-Versuchsgruppe vermehrt nachzuweisen war. Apip katalysiert dabei einen relevanten Schritt und tritt als Hemmstoff sowohl der Hypoxie-induzierten Apoptose³⁹⁴ als auch der entzündlichen Pyroptose³⁹⁵ auf. Außerdem konnten Dysregulationen von Apip bei Patienten mit systemischen Inflammationssyndromen nachgewiesen werden, ein Hinweis auf eine enge Verflechtung der Apip-Expression und Entzündungsreaktionen im menschlichen Körper.³⁹⁵ Zusätzlich übernimmt Apip beim Menschen und anderen Säugetieren die Funktion der Methylthioribulose-1-Phosphate-Dehydratase bei Bakterien und Hefen und wirkt so am Methionin-Rückgewinnungsweg mit,³⁹⁶ welcher 5-Methylthioadenosin (Mta) in Methionin umwandelt, eine essenzielle proteinogene Aminosäure.^{397,398} Die erhöhte Expression von Apip in der WSD-Versuchsgruppe sowohl im Gegensatz zur SD als auch zur HFD stimmt damit überein, dass bei einem proinflammatorischen Zustand ein erhöhter Bedarf an Methionin zur Leukozytenproliferation und Synthese von Akut-Phase-Proteinen benötigt wird.³⁹⁹

Ebenfalls eng mit der Proteinsynthese verbunden ist die zytoplasmatische ArginintRNA-Ligase (Rars1),⁴⁰⁰ ein Enzym, das in der WSD- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe vermindert nachgewiesen wurde. Rars1 bildet gemeinsam mit ARS-interagierende Multifunktionsproteine (AIMPs) einen Komplex, der zur zellulären Homöostase beiträgt.⁴⁰¹ Dieser Komplex scheint an einer Vielzahl an Aufgaben bei der Aufrechterhaltung einer normalen Zellfunktion beteiligt zu sein.^{402,403} Unter anderem scheint der Komplex für eine Induktion von Zytokinen und Chemokinen verantwortlich zu sein, wie es beispielsweise in Schaumzellen atherosklerotischer Läsionen nachgewiesen werden konnte.^{404,405} Die meisten Forschungsarbeiten fokussieren sich jedoch auf die Rars1-Veränderung im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen,⁴⁰⁶ sodass die Interpretation unserer Ergebnisse erst sinnvoll möglich ist, wenn weitergehende Forschung erfolgt ist. Nur indirekt über Aimp1 konnten wir einen potenziellen Zusammenhang finden: eine Studie aus dem Jahr 2014 weist auf eine Hemmung von PPAR γ und damit auf eine Regulation der Adipozytendifferenzierung hin.⁴⁰⁷ Diese negative Regulation könnte im Folgeschluss bedeuten, dass bei verminderter Expression von Rars1, wie hier bei WSD im Vergleich zu SD, eine vermehrte Adipogenese stattfinden könnte. Ein direkter Zusammenhang muss jedoch erst durch weitere Forschungsarbeiten nachgewiesen werden.

Zusätzlich zeigten wir ein erniedrigtes Level an Complement-C1q-Bindungs-Protein (C1qbp) sowohl in der DIO- und WSD- jeweils im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe. Bisher wurde C1qbp vor allem in Zellen mit hohem Energiestoffwechsel wie Herzmuskelzellen nachgewiesen,⁴⁰⁸ wo es vor allem in den Mitochondrien zu finden ist.⁴⁰⁹ Dabei ist es essenziell für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) zur ATP-Gewinnung in der Atmungskette.⁴¹⁰ Eine signifikant verringerte Expression von C1qbp wie hier bei DIO und WSD gegenüber SD, führte bei Kardiomyozyten zu erhöhtem oxidativem Stress.^{411,412} Außerdem scheint C1qbp für die Aufrechterhaltung einer normalen Mitochondrienstruktur durch Schutz vor Fragmentierung und Schwellung notwendig zu sein.⁴¹³ Es ist also möglich, dass es in der WSD- und DIO-Versuchsgruppe durch vermehrten oxidativen Stress zu einer erniedrigten Expression von C1qbp kommt. Dies könnte zu einer Dysfunktion der Mitochondrien mit Verlust der Struktur bei vermehrter Fragmentierung und Schwellung führen, wodurch die Apoptoserate der Adipozyten steigen würde.

Neben vielen weiteren Funktionen wie Zelldifferenzierung und Inflammation^{414,415} scheint auch Galektin-3 (Lgals3) direkt an der Regulation⁴¹⁶ von Differenzierung und Apoptose⁴¹⁷ von immunrelevanten Zellen wie T-Lymphozyten beteiligt zu sein.⁴¹⁸ Dabei ist die Funktion abhängig von der Lokalisation von Lgals3: extrazellulär induziert Lgals3 die T-Zell-Apoptose,⁴¹⁹ während es intrazellulär die Apoptose hemmt.⁴¹⁷ Wir konnten hier eine Runterregulation sowohl in der DIO- als auch in der WSD-Versuchsgruppe im Vergleich zu SD-Tieren nachweisen. Dies steht im Gegensatz zu einigen bisherigen Ergebnissen bei Übergewicht. Bei adipösen Patienten zeigte sich nicht nur ein erhöhtes Serum-Lgals3,⁴²⁰ es war auch in expandierendem Fettgewebe⁴²¹ sowie bei Inflammation⁴²² hochreguliert. Die Forschungsergebnisse von *Pejnovic et al.* an Lgals3-Knockout-Mäusen unterstützen hingegen unsere Ergebnisse, da durch Lgals3-Mangel die diätbedingte Fettleibigkeit beschleunigt wurde und es zu verstärkter Inflammation im Fettgewebe und Pankreasgewebe kam.⁴²³ Allerdings gibt es kontroverse Diskussionen um die tatsächliche Rolle von Lgals3 im Fettgewebe, da bisher sowohl schädliche als auch protektive Effekte identifiziert wurden.^{421,424} Damit ist eine abschließende Beurteilung unserer Ergebnisse zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich.

5.5.5.6 Veränderte Proteine mit Assoziationen zu Schwangerschaftskomplikationen

Zwei der identifizierten Proteine sind direkt oder indirekt mit Komplikationen während der Schwangerschaft assoziiert. Das Protein High-Mobility-Group-Protein B1 (Hmgb1) zeigte sich in der WSD- sowohl im Vergleich zur SD- als auch zur HFD-Versuchsgruppe vermindert exprimiert. Das außerdem identifizierte Protein Granulin (Grn) war ebenfalls bei den WSD-Vergleichen und zusätzlich in der DIO- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe vermindert nachgewiesen.

Beim Menschen wurde ein erhöhter Hmgb1-Spiegel mit einer erhöhten Rate von Präeklampsien in Verbindung gebracht.⁴²⁵ Außerdem zeigte sich beim Menschen eine positive Korrelation zwischen BMI und Serum-Hmgb1-Spiegel.⁴²⁶ Zusätzlich wurde eine erhöhte Freisetzung von Hmgb1 durch nekrotische Zellen nachgewiesen,⁴²⁷ welche zur Pyroptose führen soll.⁴²⁸ Unsere gegensätzlichen Ergebnisse einer reduzierten Expression im Fettgewebe der WSD-Tiere im Vergleich sowohl zur SD- als auch zur HFD-Versuchsgruppe könnten sowohl durch gewebes- als auch speziesspezifische Mechanismen begründet sein. Somit sind weitere Untersuchungen notwendig, um nachzuweisen, inwiefern die Ergebnisse der

Serumuntersuchungen beim Menschen auch auf das egWAT von tragenden Mäusen übertragbar sind.

Ähnliche Überlegungen sind zur Einordnung der Ergebnisse von Granulin (Grn) notwendig. Dabei wird jedes Grn von der Vorstufe Progranulin abgespalten.⁴²⁹ Während unter physiologischen Bedingungen vor allem die Rolle von Grn als Zellwachstumsregulator im Vordergrund zu stehen scheint,⁴³⁰ zeigen neuere Forschungen eine Rolle als proinflammatorisches Zytokin, dass eine wichtige Rolle bei der Entstehung von chronischen Inflammationsreaktionen wie bei Adipositas und DM-II haben könnte.⁴³¹ Auch konnten erhöhte Progranulin-Serumspiegel bei übergewichtigen Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch nachgewiesen werden, sodass Progranulin möglicherweise einen guten Kandidaten als Marker für Infertilität bei Adipositas beim Menschen darstellt.⁴³² Auch ein erhöhter Grn-Spiegel ist mit Adipositas und Insulinresistenz assoziiert,⁴³³ sodass eine erhöhte Expression vor allem in der WSD-Versuchsgruppe, die sowohl einen erhöhten BMI als auch deutliche Schwierigkeiten mit Infertilität im Tierversuch gezeigt hatten, logisch erscheint. Entgegen diesen Überlegungen zeigte sich eine signifikant erniedrigte Expression im WAT von WSD-Versuchstieren im Vergleich zu SD- und HFD-Tieren, ebenso wie eine erniedrigte Expression bei DIO-Verfütterung gegenüber SD-Fütterung.

5.5.5.7 Zusammenfassung

Viele der mithilfe des Schlagwortes *inflammation* nachgewiesenen Proteine sind Bestandteilen von äußerst relevanten Stoffwechselwegen, die nicht nur im Fettgewebe, sondern im gesamten Organismus eine essenzielle Rolle spielen. Dabei konnten Anzeichen für eine vermehrte Adipozytendifferenzierung sowie für die Entwicklung einer Insulinresistenz in den diätinduzierten Adipositas-Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

Auch konnte nachgewiesen werden, dass einige Proteine signifikant verändert waren, die anzeigen, dass es zum Versuch einer Gegenregulation kommt. Somit scheint durch eine gesteigerte Expression von Rarres2 und Anxa1 einerseits versucht zu werden, die Adipogenese und andererseits die Entzündungsreaktion zu hemmen. Sowohl vorherige als auch unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass diese Versuche erfolglos bleiben. Besonders spannend scheinen auch die Veränderungen der Proteine, die mit der Apoptose von Zellen verbunden scheinen. Auch hier zeigen

sich Proteine, die auf einen proinflammatorischen Zustand in der WSD- und DIO-Versuchsgruppe hinweisen, außerdem konnten Anzeichen für ein erhöhtes Risiko der Mitochondrienfehlfunktion gezeigt werden, einem Vorgang, der zur Apoptose der gesamten Zelle führen kann. Dennoch ist über die Rolle einiger Proteine wie Hmgb1 im Fettgewebe bisher wenig bekannt, sodass die genaue Einordnung dieser Ergebnisse noch weitergehende Forschung Bedarf. Wir konnten also zeigen, dass vor allem signifikante Veränderungen bei den Hochfett-/Hochzucker-Diäten nachzuweisen waren. Bei einigen Proteinen konnte sogar eine vermehrte Expression bei Hochfett-/Hochzucker-Diät im Vergleich zu HFD nachgewiesen werden. So zeigt Kng1 als proinflammatorischer Faktor eine erhöhte Expression im egWAT der WSD-Mäuse im Vergleich zu HFD. Außerdem fiel im Rahmen der Literaturrecherche auf, dass viele der identifizierten Proteine als Marker bei onkologischen Erkrankungen in Frage kommen. So zeigt sich Kng1 bei Colorektalen-Karzinomen⁴³⁴ sowie beim Hepatozellären-Karzinom⁴³⁵ verändert. Steap4 wird als Marker beim Prostata-Karzinom⁴³⁶ erforscht, Jak1 hingegen beim Mamma-Karzinom.⁴³⁷ Clec10a kommt als Marker beim Lungen-Adenokarzinom⁴³⁸ in Frage, wobei beim Schilddrüsen-Karzinom⁴³⁹ Lgals3 als Marker erforscht wird.

Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die identifizierten Proteine essenziell für die normale Funktion des Organismus sind und eine Veränderung mit drastischen Konsequenzen für den Organismus einhergehen.

5.5.6 Zusammenfassung

Die größte Herausforderung an der Proteom Untersuchung stellt die große Masse an gewonnenen Daten dar, die sowohl die Komplexität des egWAT als auch die mittlerweile erreichte Genauigkeit der Massenspektrometrie widerspiegelt. Um die 3.577 identifizierten Proteine genauer zu untersuchen war es notwendig eine Auswahl zu treffen. Mithilfe der hier angewendeten schlagwortbasierten Methode wurden möglichst objektiv Proteine ausgewählt, die potenziell für die weitere Arbeit von Bedeutung sein könnten (vgl. Tabelle 13). Auch wenn dies nicht bei allen Proteinen gleichermaßen gegeben war, konnten so dennoch eine Vielzahl an relevanten Proteinen nachgewiesen werden.

Insgesamt konnten wir mithilfe dieser Methodik zwischen HFD und SD 9 signifikant veränderte Proteine identifizieren. Diesem stehen 11 im Vergleich von DIO und SD sowie 20 im Vergleich WSD zu SD gegenüber. Außerdem konnten insgesamt bei 21

Proteinen eine signifikante Veränderung in mindestens einer der Hochfett-/Hochzucker-Diäten im Vergleich zu HFD identifiziert werden.

Sowohl in der HFD als auch in beiden Hochfett-/Hochzucker-Diäten WSD und DIO konnten wir Veränderungen am Proteom im Vergleich zur SD zeigen, die Anzeichen für eine verringerte antioxidative Kapazität, Erhöhung des oxidativen Stresslevels, eine vermehrte Adipozytendifferenzierung sowie Proteine, die mit einem erhöhten Risiko für diätinduzierte Insulinresistenz assoziiert sind.

Zusätzlich zeigten sich Veränderungen im Proteom der WSD- im Vergleich zur SD-Versuchsgruppe, die darauf hinweisen, dass die Glukosetoleranz im Fettgewebe erniedrigt ist, eine Dysregulation der Mitochondrien wahrscheinlicher wird sowie eine umfangreiche negative Beeinflussung des Fettstoffwechsels durch oxidativen Stress, Lipotoxizität und Inflammation unter WSD zu erwarten ist. Einige dieser Veränderungen sind sogar bei Hochfett-/Hochzucker-Diäten, vor allem der WSD, stärker ausgeprägt im Vergleich zur reinen Hochfettverfütterung (HFD), es zeigt sich also eine Verstärkung der negativen Effekte durch zusätzliche Zuckerverfütterung.

5.6 Veränderungen der Inflammations- und oxidativen Stressmarker des WAT

Wie in Kapitel 2.3.5 und 2.3.6 ausführlich beschrieben, gelten Inflammation und oxidativer Stress als Schlüsselmechanismen für die Entwicklung adipositasbedingter Folgeerkrankungen.^{28,83} Um den Einfluss der fünf verschiedenen Diäten auf diese Mechanismen zu beleuchten, wurde die mRNA-Expression verschiedener Entzündungs- und oxidativen Stressmarker mithilfe der RT-qPCR-Methode gemessen. Dabei zeigten sich für die durchgeführten Gruppenvergleiche unterschiedliche Ergebnisse im egWAT und scWAT.

Zunächst erfolgte eine Untersuchung in dem metabolisch deutlich aktiveren egWAT, von dem wir uns deutliche Ergebnisse versprochen. Die Expression der Entzündungs- und pro-oxidativen Stressmarker zeigte für die meisten untersuchten Marker einen Trend zur vermehrten Expression bei HFD-Fütterung gegenüber SD, während die anti-oxidativen Stressmarker eher vermindert exprimiert wurden. Dieser Trend zur verminderten Expression von anti-oxidativen Stressmarkern konnte auch im Vergleich der DIO-Tiere zur SD-Versuchsgruppe gezeigt werden, wobei Entzündungsmarker- und pro-oxidative Stressmarker ebenfalls eher vermindert exprimiert wurden. Im Gegensatz dazu zeigten die Tiere der WSD-Versuchsgruppe einen eindeutigen Trend zur vermehrten Expression von Entzündungs- und oxidativen Stressmarkern, sowohl pro- als auch anti-oxidativ. Um diese Ergebnisse etwas genauer zu betrachten, erfolgte pro Fettgewebsart der Vergleich von zwei ausgewählten Markern über alle 5 Versuchsgruppen.

Als klassischer Entzündungsmediator wurde repräsentativ IL-1 β ausgewählt, da es sich um ein bereits extensiv erforschtes, potentes Zytokin handelt.⁴⁴⁰ IL-1 β scheint die Rolle eines systemischen, hormonähnlichen Mediators einzunehmen, der von verschiedenen Zelltypen freigesetzt werden kann.^{441,442} Es wurden bereits viele verschiedene Induktoren für die IL-1 β -Genexpression gefunden, neben mikrobiellen Auslösern auch neuroaktive Substanzen, Zellmatrixbestandteile aber auch inflammatorische Marker, Lipide und andere Cytokine.^{440,441,443,444} In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine verminderte Expression von IL-1 β aller Versuchsgruppen im egWAT im Vergleich zur SD-Gruppe, für HFD und DIO sogar signifikant. Dies steht im Widerspruch zu den bisherigen Forschungsergebnissen, die nicht nur im Tiermodell, sondern auch beim Menschen eine Hochregulation von IL-1 β

im Fettgewebe bei Adipositas feststellen konnten.^{445,446} *Plubell et al.* konnten jedoch bei männlichen C57BL/6-Mäusen ebenfalls keine Anzeichen einer interleukinvermittelten WAT-Inflammation, insbesondere auch keine Veränderung der IL-1 β -Expression, unter HFD nachweisen.⁴⁴⁷

Als anti-oxidativer Stressmarker wurde SOD1 für den Vergleich aller Gruppen gegen SD ausgewählt, ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das zur ersten und wichtigsten Linie der antioxidativen Enzymabwehr gegen ROS gehört.¹⁷⁵ Auch SOD1 kann durch eine Vielzahl an mechanischen, chemischen und biologischen Stimuli beeinflusst werden.¹⁷⁵ Hier konnte eine Runterregulation der mRNA-Expression von SOD1 in allen Vergleichsgruppen gegenüber der SD-Versuchsgruppe gezeigt werden, wobei der Effekt bei HFD und DIO am stärksten und signifikant ausgeprägt war. Dies ist im Einklang mit Ergebnissen von *Touati et al.*, die bei männlichen Ratten unter HFD die Tendenz zu einer niedrigeren SOD1-Expression in der Aorta zeigten, als Tiere die Standardfutter erhielten.⁴⁴⁸ Möglicherweise beeinflusst Übergewicht bei Nagetieren also das Genexpressionsmuster der Adipozyten im egWAT, sodass es zu einer verminderten Anzahl wichtiger anti-oxidativer Marker im egWAT kommt. Dadurch können oxidative Inflammationsreaktionen, die beispielsweise durch ROS ausgelöst werden, weniger neutralisiert werden und es kann sowohl lokal als auch systemisch zu Zellschädigungen kommen.

Bei dem ebenfalls sehr relevanten pro-oxidativ wirkenden Marker IL-6 konnten wir im egWAT keine signifikante Veränderung zwischen den Vergleichen nachweisen. Während IL-6 bei HFD und DIO eine Tendenz zur Runterregulation gegenüber SD zeigt, zeigten sich erhöhte Werte für WSD gegenüber HFD. In einem vorhergehenden Projekt konnten im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen eine vermehrte Expression von IL-6 sowohl auf mRNA-als auch auf Proteinebene bei tragenden C57BL/6N Mäusen unter HFD im egWAT nachgewiesen werden.⁴⁴⁹ Mögliche Ursachen dieser Diskrepanz werden am Ende des Kapitels diskutiert.

Im metabolisch deutlich weniger aktiven scWAT erwarteten wir eine geringere Anzahl an signifikanten Veränderungen der Proteinexpression zwischen den fünf verschiedenen Versuchsgruppen. Im Gegensatz dazu zeigte sich im scWAT der Trend zu einer verminderten Expression aller untersuchten Marker in der HFD-Versuchsgruppe in Bezug auf die SD-Tiere. Zusätzlich waren fast alle Marker bei

WSD vermehrt exprimiert als in der HFD-Gruppe. Bei Untersuchung der relativen mRNA-Expression in der DIO-Gruppe im Vergleich zur WSD zeigte sich auch hier eine vermehrte Expression aller untersuchter Marker. Eine genauere Betrachtung von IL-1 β zwischen allen fünf Versuchsgruppen im Vergleich zur SD zeigte einen Trend zur vermehrten Expression bei CO und WSD bei verminderter Expression bei HFD und DIO.

Als Beispiel eines oxidativen Stressmarkers im scWAT wurde sich für Cytochrom B-245 Alpha-Kette (CYB-A) entschieden, das für die ROS-Produktion durch NOX unerlässlich ist.^{450,451} Forschungsergebnisse legen nahe, dass die Familie der NADPH-Oxidasen, zu denen auch CYB-A gehört, die größte Quelle für Superoxidanionen beispielsweise im kardiovaskulären System darstellt.⁴⁵¹ Hier zeigt sich eine Herunterregulation von CYB-A bei CO, HFD und DIO im Vergleich zu SD, nur in der WSD-Gruppe zeigte sich ein Trend zur Hochregulation im Vergleich zu SD. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Adipositasinduktion mithilfe einer Hochfett-/Hochzucker-Diät einen deutlich negativeren Einfluss auf das oxidative Stresslevel und damit auf die Inflammationsreaktion im scWAT zu haben scheint.

Der Nachweis einer Beeinflussung von Inflammations- und oxidativen Stressmarkern im Fettgewebe der Mäuse aus dieser Kohorte gelang jedoch auch in zwei anderen parallel laufenden Doktorarbeiten in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe nicht, obwohl andere Housekeeping-Gene gewählt wurden.¹ Auch eine Untersuchung der Proben mittels WesternBlot konnte keine eindeutigeren Ergebnisse liefern.

Eine Möglichkeit für die Widersprüchlichkeit der hier erhobenen Daten zu anderen Arbeiten könnte in der geringen Probenanzahl liegen. Außerdem sind jeweils eine Vielzahl an verschiedenen Einflussfaktoren auf die Expression von Inflammationsmarkern und oxidativen Stressmarkern beschrieben,^{175,440,441,451} sodass ein direkter Zusammenhang zwischen der Versuchsdiet und den widersprüchlichen Ergebnissen unwahrscheinlich erscheint. Außerdem wäre es möglich, dass die Ergebnisse nicht so ausgefallen sind wie erwartet, weil im Rahmen der Präparation das scWAT schwer zu gewinnen ist und auch eine versehentliche Entnahme von lymphatischem Gewebe nicht ausgeschlossen werden kann. Auch erfolgte die Untersuchung an einem zufälligen Gewebestück des entnommenen WAT, sodass man diskutieren muss, ob die Verteilung von Inflammations- und

oxidativen Stressmarkern im WAT heterogener ist, als bisher gedacht. Beispielsweise zeigten *Bäckdahl et al.* in einer Arbeit aus dem Jahr 2021, dass es innerhalb von WAT mindestens drei verschiedene Adipozyten-Subtypen mit unterschiedlicher Insulinsensitivität gibt, die im WAT unterschiedlich verteilt sind.⁴⁵² Auch die Autoren weisen darauf hin, dass die Heterogenität des WAT bisher nur wenig verstanden ist und Gegenstand weiterreichender Forschung sein muss, um die Komplexität von Adipositas besser zu verstehen.

Insgesamt unterstreichen die hier gezeigten Ergebnisse die Erkenntnis, dass sich egWAT und scWAT sowohl in ihrer Funktion als auch in ihren Veränderungen bei Adipositas stark voneinander unterscheiden, wobei dem egWAT eine deutlich relevantere Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Inflammationsreaktion und oxidativem Stress zukommt.^{54,174}

5.7 Fettsäureprofile der fünf verschiedenen Diäten

Dyslipidämie ist einer der Risikofaktoren, die Adipositas mit der Entwicklung von DM-II und anderen kardiovaskulären Folgeerkrankungen verbinden.¹¹⁴ Untersucht wurden hier 8 verschiedene Fettsäuren im Serum der tragenden Mäuse zwischen den 5 verschiedenen Vergleichsgruppen. Insgesamt zeigte sich beim Palmitinsäure-, Ölsäure-, Myristinsäure- und Palmitoleinsäuregehalt eine signifikante Hochregulation in der WSD-Gruppe im Vergleich zu den Tieren der CO-, HFD- und DIO-Gruppe. Schwierig zu interpretieren sind in allen Vergleichen die Daten der SD-Tiere, sodass die Interpretation zunächst ohne Beachtung der SD-Daten erfolgt, auf mögliche Gründe für diese Ergebnisse wird im Anschluss eingegangen.

In Zellkulturmodellen mit embryonalen Fibroblasten der Maus zeigte sich bei Exposition mit Palmitinsäure eine erhöhte Apoptoserate.⁴⁵³ Dabei weisen aktuelle Forschungsergebnisse daraufhin, dass Palmitinsäure die Produktion des proinflammatorischen Cytokins Interleukin-8 (IL-8) in Hepatozyten induziert.⁴⁵⁴ *Joshi-Barve et al.* konnten außerdem *in vitro* eine gesteigerte Lipideinlagerung bei Exposition von menschlichen Hepatozyten mit Palmitinsäure nachweisen,⁴⁵⁴ sodass ein Zusammenhang von erhöhten Palmitinsäurekonzentrationen im Rahmen von Adipositas und der Entwicklung einer NASH möglich erscheint.⁴⁵⁵ Das würde für die hier vorliegenden Daten bedeuten, dass möglicherweise ein erhöhtes Risiko für hepatische Folgeerkrankungen der Adipositas für Mäuse bei WSD-Verfütterung besteht.

Die Rolle von Ölsäure im Rahmen von Inflammationsprozessen ist derzeit noch umstritten. Einerseits gilt beispielsweise Olivenöl als ein besonders ölsäurehaltiges Lebensmittel der mediterranen Diät, das sowohl antioxidativ und kardiovaskulär protektiv wirkt.^{104,456} Eine *in vitro* Studie konnte eine vermehrte Ansammlung von Triglyceriden unter Ölsäureeinfluss bei Zellkulturversuchen nachweisen, wobei davon ausgegangen wurde, dass dies ein Schutzmechanismus zur Vermeidung der toxischen Effekte von freien Fettsäuren darstellt.⁴⁵³ Andererseits zeigt beispielsweise eine Arbeit von *Meng et al.* aus dem Jahr 2019 keine Veränderungen der systemischen und vaskulären Inflammationsmarker bei zweiwöchiger ölsäurereicher Ernährung postmenopausaler Frauen.⁴⁵⁷ Folgt man dem Modell von *Listenberger et al.* und interpretiert die Rolle von Ölsäure als protektiv gegen Lipotoxizität durch Triglyceridakkumulation, könnten der Ölsäuregehalt im Serum der WSD-Tiere als Reaktion auf einen vermehrten Anfall von Triglyceriden hochreguliert sein.

Auch die Effekte der essenziellen Fettsäure Linolsäure auf das metabolische Gleichgewicht und die kardiovaskuläre Gesundheit wird weiterhin diskutiert.^{458,459} So wird Linolsäure zwar zu der eher proinflammatorisch wirkenden Arachidonsäure umgewandelt, in einigen Meta-Analysen scheint allerdings ein Zusammenhang zwischen hoher Linolsäure-Zufuhr oder -Konzentration in Geweben, einer Verbesserung des kardiovaskulären Risikos, einer langfristigen Kontrolle des Blutzuckerspiegels sowie einer Kontrolle der Insulinresistenz zu bestehen.⁴⁵⁸ Allerdings scheinen sich vor allem die Studienergebnisse bei speziesübergreifenden Vergleichen zu widersprechen: es scheint, als habe Linolsäure auf Zelllinien *in vitro*, Tiere und Menschen unterschiedliche Wirkungen.¹⁰⁹ Hochwertige klinische Studien zur endgültigen Bewertung der Rolle von Linolsäure für den Metabolismus sind erforderlich, um die vorliegenden Ergebnisse besser einordnen zu können. Eine Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2021 von *Hamilton et al.* erklärt die gegensätzlichen Ergebnisse damit, dass in frühen Studien von einer geringen Konzentration von Linolsäure in der Nahrung ausgegangen wurde, die durchschnittliche Aufnahme von Linolsäure in der westlichen Welt hat jedoch seit 1960 von 2,7 g pro Tag auf bis zu 21,0 g pro Tag zugenommen.⁴⁶⁰ Ein derart hoher Verzehr von Linolsäure könnte die Entstehung von Diabetes Mellitus sogar beschleunigen, indem die Insulinsensitivität vermindert und die Insulinsekretion der β -Zellen beeinträchtigt werde.^{105,461} Nur im Blut der WSD-Tiere findet sich signifikant mehr Linolsäure als bei der HFD-Gruppe. Der in allen Gruppen ähnlich hohe Linolsäure-Spiegel im Plasma der untersuchten

Mäuse könnte darauf hinweisen, dass die Serum-Halbwertszeit von Linolsäure sowie der Zeitpunkt der letzten Futteraufnahme die Ergebnisse stark beeinflusst haben.

Stearinsäure scheint in früheren Fütterungsversuchen eine Erhöhung des Serum-Cholesterins verursacht zu haben, sodass von einer Erhöhung des kardiovaskulären Risikos ausgegangen werden kann.⁴⁶²⁻⁴⁶⁴ Hier zeigt sich die absolute Serumkonzentration von HFD und WSD vor allem im Vergleich zu CO erhöht, was man als eine Erhöhung des kardiovaskulären Risikos bei diesen Gruppen interpretieren könnte. Neuere Forschungsergebnisse zeichnen ein weniger eindeutiges Bild vom Einfluss von Stearinsäure auf den Metabolismus,^{106,465} sodass auch hier die Ergebnisse kritisch betrachtet werden müssen. Eine Studie von *Warensjö et al.* zeigte in einer humanen Kohorte aus Schweden im Jahr 2006 jedoch eine erhöhte Serumkonzentration an Stearin- und Myristinsäure bei Adipositas.¹¹⁸

In der klinischen Anwendung wurde Myristinsäure im Serum als „*Metabolit mit der höchsten diagnostischen Sensitivität und Spezifität im Metabolom von Patienten mit Bakteriämie identifiziert*“ (aus dem Englischen übersetzt nach *Zazula et al.*).¹⁰⁸ Dabei zeigten sich die höchsten Spiegel bei Patienten mit Bakteriämie und Sepsis,¹⁰⁸ sodass von einem direkten Zusammenhang mit der systemischen Inflamationsreaktion auf Pathogene ausgegangen werden kann. Die hier gezeigte, signifikante Verzehnfachung des Plasma Myristinsäuregehaltes der WSD-Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen könnte ein Indiz für eine Rolle von Myristinsäure auch bei bakteriämieunabhängiger systemischer Inflamationsreaktion sein.

Obwohl die Unterschiede bei der Palmitolsäurekonzentration ähnlich drastisch sind wie im Myristinsäurevergleich, ist eine Interpretation dieser Ergebnisse aufgrund der fehlenden Vergleichsdaten kaum möglich. Einzelne Daten deuten auf erhöhte Palmitolsäurekonzentrationen bei Adipositas hin,¹¹⁸ was im Einklang mit den hier gewonnen Erkenntnissen steht.

Im Gegensatz dazu sind viele Daten zur Bedeutung von Arachidon-^{110,111,466} und Docsohexansäure^{112,113} für den Fettstoffwechsel verfügbar, da in der vorliegenden Arbeit aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden konnte, wird davon abgesehen diese genauer zu betrachten.

Schwierig zu interpretieren sind die Ergebnisse der SD-Tiere bei allen untersuchten Fettsäuren. Im Serum der Tiere der SD-Gruppe zeigte sich bei den gleichen freien

Fettsäuren die Tendenz zu einer erhöhten Serumkonzentration wie bei den WSD-Tieren. Dies könnte an der geringen Probenanzahl in der Serumuntersuchung liegen, so dass durch große individuelle Schwankungen kein eindeutiger Trend zu erkennen ist. Außerdem sollten die gefundenen Ergebnisse erneut bei gefasteten Mäusen überprüft werden, da eine direkte Beeinflussung durch kurz zuvor aufgenommene Nahrung ebenfalls angenommen werden kann. Da die Nahrungsaufnahme von Mäusen einem zirkadianen Rhythmus unterliegt,⁴⁶⁷ ist eine Beeinflussung durch die letzte Futteraufnahme sehr wahrscheinlich. Aus diesem Grund sollte bei zukünftigen Tierversuchen neben einer definierten Zeit zur letzten Mahlzeit und eine definierte Fastenperiode auch auf eine festgelegte Uhrzeit zur Gewinnung der Blutproben geachtet werden. Nur wenn sich die gezeigten Effekte auch bei größeren Kohorten und gefasteten Mäusen sicher reproduzieren lassen, können Schlüsse für weitergehende Forschung geschlossen werden.

5.8 Limitationen und Ausblick

Ziel der Arbeit war es fünf Versuchsdiäten mit unterschiedlichem Fett- und Zuckergehalt im Hinblick auf die Adipositasinduktion und die daraus folgenden metabolischen Veränderungen im scWAT und egWAT zu vergleichen. Dafür wurden zwei Kontrolldiäten, eine Hochfettdiät und zwei am westlichen Ernährungsmuster angelehnte Hochfett-/Hochzuckerdiäten verwendet.

Mithilfe phänotypischer Daten konnte nachgewiesen werden, dass es gelungen ist bei den Versuchstieren der HFD-, DIO- und WSD-Versuchsgruppe Adipositas zu induzieren. Dafür sprechen das signifikant erhöhte Körpergewicht sowie die Zunahme des egWAT-Gewichts in HFD und DIO im Vergleich zur SD. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung wurden mithilfe einer μ CT-Untersuchung korreliert. Eigentlich stellt die Magnetresonanztomographie (MRT) den Goldstandard für Fettmessungen dar,⁴⁶⁸ wird jedoch auch beim Menschen seltener als das CT angewendet, da die Untersuchung nicht nur günstiger⁴⁶⁸ sondern durch den Einsatz von automatischen Auswertungsalgorithmen auch besser standardisiert ist.⁴⁶⁹ Aus diesen Gründen entschieden auch wir uns zur Verwendung des μ CTs, dessen Ergebnisse erheblich zur Verifizierung der zuvor bestimmten phänotypischen Gewichtsdaten beitragen konnten. Eine vergleichende Untersuchung von Fettgewebsbestimmungen im μ CT von C57BL/6N-Mäusen könnte helfen, die Verteilung des Fettgewebes besser zu verstehen, um somit die hier gefundenen Abweichungen noch besser einzuordnen.

Außerdem ist es wichtig zu wissen, dass das hier untersuchte egWAT nicht direkt dem viszeralen Fettgewebe beim Menschen entspricht,⁵⁶ es wird eher als periviszerales Fettgewebe angesehen.⁵⁶ Die Verwendung von mesenterialem Fettgewebe hätte eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen gewährleistet,⁵⁶ war in der vorliegenden Arbeit aber aufgrund der praktischen Herausforderung beim Präparieren des mesenterialen Fettgewebes nicht möglich. Dabei ist ebenfalls relevant, dass im menschlichen Körper kein direktes Äquivalent zum murinen egWAT zu finden ist, welches hier primär verwendet wurde, sondern viszerales Fettgewebe vermehrt an anderen Lokalisationen zu finden ist.⁵⁶ Dennoch ist es üblich, murines egWAT als Repräsentant für humanes viszerales WAT einzusetzen, da es ebenfalls viszeral vorliegt, eine geeignete Größe aufweist und leicht zugänglich ist.⁵⁶

Während also Adipositasinduktion gelang und die phänotypischen Daten in den Vergleichsgruppen deutliche Veränderung zeigten, konnte keine Erhöhung von inflammatorischen und oxidativen Stressmarkern mithilfe der Bestimmung von mRNA-Konzentrationen im Fettgewebe nachgewiesen werden. Dies könnte einerseits daran liegen, dass die Dauer der Verfütterung der Versuchsdäten bis zur Sectio mit Gewinnung von egWAT und scWAT maximal 16 Wochen betrug. Einige Studien weisen darauf hin, dass sich bei klassischer Hochfettdiät erst nach Verfütterung über einen noch längeren Zeitraum das gesamte Spektrum metabolischer Störungen ausbildet wie z.B. DM-II.⁴⁶ Auch das Alter bei Erstauftreten der metabolischen Auswirkungen sollte in nachfolgenden Untersuchungen weiter erforscht werden, um die Daten besser auf den Menschen übertragbar zu machen.⁴⁶ Auch könnte ein Grund für die teils in der HFD-Versuchsgruppe stärker als in DIO und WSD ausgeprägten Veränderungen sein, dass der hier ausgewählte Mausstamm C57BL/6N als anfällig für durch Hochfettdiät induzierte Veränderungen gilt, während über die Anfälligkeit gegenüber Hochfett-/Hochzucker-Diäten bisher wenig bekannt ist.^{160,470,471} Eine weitere Möglichkeit, wieso die ermittelten Werte der RT-qPCR-Methode derart stark von der bisher bekannten mRNA-Expression unter Hochfett-/Hochzucker-Diät abweichen, könnte mit unserer Gewinnungsmethode von egWAT und scWAT zusammenhängen. Im Rahmen der Präparation konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich in den gewonnen scWAT Proben auch lymphatisches Gewebe befand. Dieses könnte dann in dem per Zufall ausgewählten Gewebestück enthalten gewesen sein, welches für die mRNA-Analyse aufbereitet wurde. Insgesamt scheint das WAT heterogener zu sein als bisher angenommen, sodass vermutlich eine verlässlichere Aussage durch eine Analyse des gesamten Fettgewebes getroffen werden könnte. Die Analyse eines zufällig ausgewählten Teilstücks scheint für künftige Untersuchungen nicht geeignet zu sein.

Auch konnte vor allem im Serum von SD- und WSD-Tieren vermehrte Fettsäuren nachgewiesen werden, die auf eine Dyslipidämie hinweisen. Betrachtet man die Gesamtfutteraufnahme pro Tag über den Versuchszeitraum, zeigt sich die höchste Futteraufnahmemenge bei SD-Versuchstieren. Es ist also denkbar, dass die SD-Versuchstiere vor der Sectio einfach mehr Futter aufnahmen, wodurch die Werte für die Lipidanalyse im Serum verändert wurden. Trotzdem zeigte sich meist ein höherer Lipidspiegel bei Tieren der WSD, weshalb wir dort eher von einem verlässlichen Datensatz ausgehen. Ein weiterer Hinweis ergibt sich auch in der Zusammenschau

mit den Schwangerschaftsraten der WSD-Versuchsgruppe. Bereits mehrfach wurde eine erhöhte Rate an Unfruchtbarkeit oder verminderter Fruchtbarkeit bei Störungen des Gleichgewichts bestimmter freier Fettsäuren beschrieben, die bei der Vermittlung von Lipotoxizität wichtig sind.¹¹⁷ Zudem ist die Standardisierung der Lipidomics bisher noch nicht abgeschlossen.⁴⁷² Sollte ein einheitlicher Standard bei Lipidomics-Analysen erreicht werden, steigt die Übertragbarkeit und damit auch der klinische Nutzen.⁴⁷³ Um jedoch die Verlässlichkeit der Erkenntnis einer erhöhten Dyslipidämie-Neigung bei WSD-Versuchstieren zu prüfen, ist eine weitergehende Forschung mit genauer Dokumentation der Nahrungsaufnahme und zeitlich fest definierten Fastenperioden sowie ein fester Zeitpunkt der Probenentnahme notwendig.

Die hier gewählte Methode zur Auswertung der Proteomics ist nur eine von vielen Möglichkeiten, den Datensatz zu analysieren. Dabei ist die schlagwortbasierte Methode stark abhängig von den zuvor ausgewählten Schlagworten und wurde manuell durchgeführt, was eine mögliche subjektive Interpretation von semantisch benachbarten Worten zum eigentlichen Schlagwort möglich macht. Eine Analyse desselben Datensatzes mithilfe einer anderen Methodik wäre interessant, um die Ergebnisse anschließend miteinander zu vergleichen. Im Rahmen der Literaturrecherche zu den Ergebnissen der Proteom-Analyse aus dem egWAT fiel zudem auf, dass bisher nur wenige valide Daten zur Proteinfunktion und deren Einflüsse im Fettgewebe, besonders im egWAT, verfügbar waren. Häufig konnten überwiegend Studien zu Kock-out-Mausmodellen zur Beurteilung der Proteinveränderungen herangezogen werden, die nicht uneingeschränkt auf die Funktion und Veränderungen der entsprechenden Proteine im egWAT übertragen werden können. Auch die Ergebnisse zu Veränderungen der Proteine beim Menschen und deren Auswirkungen können nur einen Hinweis geben, welche Rolle ein Protein im murinen diätinduzierten Adipositasmodell einnimmt. Umfassende weitere Forschungen am Proteom von C57BL/6N-Mäusen sind notwendig, um die hier identifizierten Proteinveränderungen genauer zu verstehen und einzuordnen.

Natürlich lassen sich Erkenntnisse aus Tiermodellen nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen, weshalb es wichtig ist alle hier gezeigten Ergebnisse erneut anhand von Forschungsdaten beim Menschen zu verifizieren. Soweit möglich wurden bereits humane Vergleichsstudien im Rahmen der Diskussion angegeben. Dies unterstreicht nochmals die Relevanz einer Annäherung der Versuchsbedingungen an die tatsächlichen Lebensumstände von Menschen.

Bekanntermaßen zeigen sich große Geschlechtsunterschiede bei der Fettablagerung, auch bei Mäusen; wobei weibliche Mäuse mehr Fettgewebe besitzen als Männchen.⁴³ Deshalb wurden auch vergleichende Untersuchungen an Böckchen unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt, die die phänotypischen Veränderungen bestätigen konnten.⁴⁷⁴

Die hier gewonnenen Erkenntnisse sind als Grundlagenforschung wichtig. Nur durch umfassende Untersuchungen an entnommenen tierischen Fettgewebsproben können Daten gewonnen werden, die Aufschluss über Inflammation und oxidativen Stress im Fettgewebe im Rahmen von Adipositas geben können. Die deutlich herausfordernde Erforschung an menschlichem Fettgewebe, welches nur im Rahmen einer notwendigen Operation wie beispielsweise einer Sectio entnommen werden könnte, kann so der Verifizierung oder Falsifizierung bereits gewonnener Erkenntnisse vorbehalten bleiben.

6 Literaturverzeichnis

1. Schmitz K, Turnwald EM, Kretschmer T, et al. Metformin Prevents Key Mechanisms of Obesity-Related Complications in Visceral White Adipose Tissue of Obese Pregnant Mice. *Nutrients* 2022; **14**(11).
2. WHO. Fact sheet "Obesity and overweight". 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
3. Doulberis M, Papaefthymiou A, Polyzos SA, et al. Rodent models of obesity. *Minerva Endocrinol* 2020; **45**(3): 243-63.
4. Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, et al. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One* 2013; **8**(4): e60931-e.
5. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care* 2016; **22**(7 Suppl): s176-85.
6. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/obesity>.
7. Caballero B. Humans against Obesity: Who Will Win? *Adv Nutr* 2019; **10**(suppl_1): S4-s9.
8. 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.
9. Europe WHOROf. European health report 2018: more than numbers – evidence for all. World Health Organization. Regional Office for Europe; 2018.
10. Sophie Alexander BB, Marie-Hélène Bouvier-Colle, Nirupa Dattani, Marie, Delnord MG, Alison Macfarlane, Ashna Mohangoo, Karin van der Pal, Katarzyna, Szamotulska JZ, Wei Hong Zhang. Euro-Peristat project with SCPE and Eurocat. European Perinatal Health Report. The health and care of pregnant women and babies in Europe in 2010. . In: Consumers HPotECsDGfHa, editor. <https://www.europeristat.com/index.php/our-indicators/euro-peristat-perinatal-health-indicators-2010.html>; May 2013.
11. Koning SH, Hoogenberg K, Lutgers HL, van den Berg PP, Wolffenbuttel BH. Gestational Diabetes Mellitus: current knowledge and unmet needs. *J Diabetes* 2016; **8**(6): 770-81.
12. Agha-Jaffar R, Oliver N, Johnston D, Robinson S. Gestational diabetes mellitus: does an effective prevention strategy exist? *Nat Rev Endocrinol* 2016; **12**(9): 533-46.
13. Broughton DE, Moley KH. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. *Fertil Steril* 2017; **107**(4): 840-7.
14. van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, et al. Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Hum Reprod* 2008; **23**(2): 324-8.
15. Koning AM, Mutsaerts MA, Kuchenbecker WK, et al. Complications and outcome of assisted reproduction technologies in overweight and obese women. *Hum Reprod* 2012; **27**(2): 457-67.
16. Skórzyńska-Dziduszko KE, Kimber-Trojnar Ż, Patro-Małyśza 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.
17. 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.
18. Arendas K, Qiu Q, Gruslin A. Obesity in pregnancy: pre-conceptional to postpartum consequences. *J Obstet Gynaecol Can* 2008; **30**(6): 477-88.
19. Ovesen P, Rasmussen S, Kesmodel U. Effect of prepregnancy maternal overweight and obesity on pregnancy outcome. *Obstetrics and gynecology* 2011; **118**(2 Pt 1): 305-12.
20. Lim CC, Mahmood T. Obesity in pregnancy. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 2015; **29**(3): 309-19.

21. 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.
22. 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.
23. van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhausler BS. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes (Lond)* 2015; **39**(1): 85-97.
24. Saben JL, Boudoures AL, Asghar Z, et al. Maternal Metabolic Syndrome Programs Mitochondrial Dysfunction via Germline Changes across Three Generations. *Cell Rep* 2016; **16**(1): 1-8.
25. 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.
26. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 2006; **55**(6): 1537-45.
27. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell* 2014; **156**(1-2): 20-44.
28. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006; **444**(7121): 875-80.
29. Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci* 2010; **67**(8): 1277-92.
30. Divoux A, Clément K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev* 2011; **12**(5): e494-503.
31. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**(2): 85-97.
32. Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological complications of obesity. *Nat Immunol* 2012; **13**(8): 707-12.
33. 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.
34. Mraz M, Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J Endocrinol* 2014; **222**(3): R113-27.
35. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2001; **2**(4): 239-54.
36. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* 2013; **19**(10): 1338-44.
37. Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest* 1983; **72**(3): 1150-62.
38. Blüher M, Wilson-Fritch L, Leszyk J, Laustsen PG, Corvera S, Kahn CR. Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**(30): 31902-9.
39. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1801**(3): 338-49.
40. Sørensen TI, Virtue S, Vidal-Puig A. Obesity as a clinical and public health problem: is there a need for a new definition based on lipotoxicity effects? *Biochim Biophys Acta* 2010; **1801**(3): 400-4.
41. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, et al. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007; **56**(12): 2910-8.
42. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 2006; **83**(2): 461s-5s.

43. Macotela Y, Boucher J, Tran TT, Kahn CR. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes* 2009; **58**(4): 803-12.
44. Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 2010; **34 Suppl 1**(0 1): S36-42.
45. Schulz TJ, Huang P, Huang TL, et al. Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* 2013; **495**(7441): 379-83.
46. Gordon-Larsen P, French JE, Moustaid-Moussa N, et al. Synergizing Mouse and Human Studies to Understand the Heterogeneity of Obesity. *Adv Nutr* 2021; **12**(5): 2023-34.
47. Murawska-Cialowicz E. Adipose tissue - morphological and biochemical characteristic of different depots. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2017; **71**(0): 466-84.
48. Tchkonja T, Thomou T, Zhu Y, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab* 2013; **17**(5): 644-56.
49. 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.
50. Blüher M. Are there still healthy obese patients? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012; **19**(5): 341-6.
51. Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, et al. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; **299**(3): E506-15.
52. Stefan N, Kantartzis K, Machann J, et al. Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch Intern Med* 2008; **168**(15): 1609-16.
53. Chait A, den Hartigh LJ. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med* 2020; **7**: 22-.
54. Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med* 1995; **27**(4): 435-8.
55. Blüher M. Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Metab J* 2012; **36**(5): 317-27.
56. 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.
57. 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.
58. Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 2015; **36**(7): 461-70.
59. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004; **145**(5): 2273-82.
60. Moon HS, Dalamaga M, Kim SY, et al. Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals. *Endocr Rev* 2013; **34**(3): 377-412.
61. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**(6): 2548-56.
62. Leininger GM, Jo YH, Leshan RL, et al. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab* 2009; **10**(2): 89-98.
63. 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.
64. Carbone F, La Rocca C, Matarese G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* 2012; **94**(10): 2082-8.
65. Asilmaz E, Cohen P, Miyazaki M, et al. Site and mechanism of leptin action in a rodent form of congenital lipodystrophy. *J Clin Invest* 2004; **113**(3): 414-24.

66. Turer AT, Khera A, Ayers CR, et al. Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. *Diabetologia* 2011; **54**(10): 2515-24.
67. Kubota N, Yano W, Kubota T, et al. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 2007; **6**(1): 55-68.
68. Luo L, Liu M. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol* 2016; **231**(3): R77-r99.
69. Steppan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med* 2004; **255**(4): 439-47.
70. Blüher M. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; **27**(2): 163-77.
71. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001; **50**(5): 1126-33.
72. 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.
73. Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res* 2007; **2007**: 95974-.
74. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; **259**(5091): 87-91.
75. Zhang L, Sugiyama T, Murabayashi N, et al. The inflammatory changes of adipose tissue in late pregnant mice. *Journal of molecular endocrinology* 2011; **47**(2): 157-65.
76. Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Wallace AM, Greer IA, Sattar N. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2002; **87**(9): 4231-7.
77. Romeo GR, Lee J, Shoelson SE. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; **32**(8): 1771-6.
78. Schilling JD, Mann DL. Diabetic cardiomyopathy: bench to bedside. *Heart Fail Clin* 2012; **8**(4): 619-31.
79. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; **112**(12): 1796-808.
80. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007; **56**(1): 16-23.
81. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007; **117**(1): 175-84.
82. Eguchi J, Kong X, Tenta M, Wang X, Kang S, Rosen ED. Interferon regulatory factor 4 regulates obesity-induced inflammation through regulation of adipose tissue macrophage polarization. *Diabetes* 2013; **62**(10): 3394-403.
83. 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.
84. 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.
85. Barton JR, Snook AE, Waldman SA. From leptin to lasers: the past and present of mouse models of obesity. *Expert Opin Drug Discov* 2021; **16**(7): 777-90.
86. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011; **12**(5): 3117-32.
87. Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol* 2004; **24**(6): 565-70.

88. Cotechini T, Graham CH. Aberrant maternal inflammation as a cause of pregnancy complications: A potential therapeutic target? *Placenta* 2015; **36**(8): 960-6.
89. 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.
90. 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.
91. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; **82**(2): 291-5.
92. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 2006; **30**(3): 400-18.
93. 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.
94. Lopez-Bascon MA, Calderon-Santiago M, Sanchez-Ceinos J, et al. Influence of sample preparation on lipidomics analysis of polar lipids in adipose tissue. *Talanta* 2018; **177**: 86-93.
95. Broughton DE, Jungheim ES. A Focused Look at Obesity and the Preimplantation Trophoblast. *Semin Reprod Med* 2016; **34**(1): 5-10.
96. Gałęcka E, Jacewicz R, Mrowicka M, Florkowski A, Gałęcki P. [Antioxidative enzymes--structure, properties, functions]. *Pol Merkur Lekarski* 2008; **25**(147): 266-8.
97. Chiarello DI, Abad C, Rojas D, et al. Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2020; **1866**(2): 165354.
98. Aouache R, Biquard L, Vaiman D, Miralles F. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *Int J Mol Sci* 2018; **19**(5).
99. 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.
100. Chen Z, Liang Q, Wu Y, et al. Comprehensive lipidomic profiling in serum and multiple tissues from a mouse model of diabetes. *Metabolomics* 2020; **16**(11): 115.
101. Julius U. Influence of plasma free fatty acids on lipoprotein synthesis and diabetic dyslipidemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; **111**(5): 246-50.
102. Kuhfahl E. [Metabolism of free fatty acids in fatty tissue]. *Z Gesamte Inn Med* 1987; **42**(22): 629-33.
103. Kuhfahl E. [Metabolism of free fatty acids in the intravascular space]. *Z Gesamte Inn Med* 1986; **41**(15): 409-13.
104. Sales-Campos H, Souza PR, Peghini BC, da Silva JS, Cardoso CR. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev Med Chem* 2013; **13**(2): 201-10.
105. Whelan J, Fritsche K. Linoleic acid. *Adv Nutr* 2013; **4**(3): 311-2.
106. Kris-Etherton PM, Griel AE, Psota TL, Gebauer SK, Zhang J, Etherton TD. Dietary stearic acid and risk of cardiovascular disease: intake, sources, digestion, and absorption. *Lipids* 2005; **40**(12): 1193-200.
107. Burdock GA, Carabin IG. Safety assessment of myristic acid as a food ingredient. *Food Chem Toxicol* 2007; **45**(4): 517-29.
108. Zazula R, Moravec M, Pehal F, Nejtek T, Protuš M, Müller M. Myristic Acid Serum Levels and Their Significance for Diagnosis of Systemic Inflammatory Response, Sepsis, and Bacteraemia. *J Pers Med* 2021; **11**(4).
109. Bermúdez MA, Pereira L, Fraile C, Valerio L, Balboa MA, Balsinde J. Roles of Palmitoleic Acid and Its Positional Isomers, Hypogeic and Sapienic Acids, in Inflammation, Metabolic Diseases and Cancer. *Cells* 2022; **11**(14).
110. Sonnweber T, Pizzini A, Nairz M, Weiss G, Tancevski I. Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci* 2018; **19**(11).

111. Tortosa-Caparrós E, Navas-Carrillo D, Marín F, Orenes-Piñero E. Anti-inflammatory effects of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease and metabolic syndrome. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; **57**(16): 3421-9.
112. Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res* 1999; **40**(3): 211-25.
113. Kawano A, Ariyoshi W, Yoshioka Y, Hikiji H, Nishihara T, Okinaga T. Docosahexaenoic acid enhances M2 macrophage polarization via the p38 signaling pathway and autophagy. *J Cell Biochem* 2019; **120**(8): 12604-17.
114. Vekic J, Zeljkovic A, Stefanovic A, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V. Obesity and dyslipidemia. *Metabolism* 2019; **92**: 71-81.
115. Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2002; **32 Suppl 3**: 14-23.
116. Koene RJ, Prizment AE, Blaes A, Konety SH. Shared Risk Factors in Cardiovascular Disease and Cancer. *Circulation* 2016; **133**(11): 1104-14.
117. 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.
118. 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.
119. Carroll L, Voisey J, van Daal A. Mouse models of obesity. *Clin Dermatol* 2004; **22**(4): 345-9.
120. Islam MS, Loots du T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2009; **31**(4): 249-61.
121. Nakamura A, Terauchi Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *Int J Mol Sci* 2013; **14**(11): 21240-57.
122. Jovicic N, Jetic I, Jovanovic I, et al. Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. *PLoS One* 2015; **10**(7): e0134089-e.
123. Canello R, Clément K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *Bjog* 2006; **113**(10): 1141-7.
124. Heydemann A. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* 2016; **2016**: 2902351.
125. Stanley WC, Dabkowski ER, Ribeiro RF, Jr., O'Connell KA. Dietary fat and heart failure: moving from lipotoxicity to lipoprotection. *Circ Res* 2012; **110**(5): 764-76.
126. Hariri N, Gougeon R, Thibault L. A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutr Res* 2010; **30**(9): 632-43.
127. Maioli TU, Goncalves JL, Miranda MC, et al. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. *Inflamm Res* 2016; **65**(2): 169-78.
128. Varlamov O. Western-style diet, sex steroids and metabolism. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease* 2017; **1863**(5): 1147-55.
129. Mozaffarian D, Hao T, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med* 2011; **364**(25): 2392-404.
130. Austin GL, Ogden LG, Hill JO. Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normal-weight, overweight, and obese individuals: 1971-2006. *Am J Clin Nutr* 2011; **93**(4): 836-43.

131. Musial B, Vaughan OR, Fernandez-Twinn DS, et al. A Western-style obesogenic diet alters maternal metabolic physiology with consequences for fetal nutrient acquisition in mice. *J Physiol* 2017; **595**(14): 4875-92.
132. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 2004; **431**(7005): 200-5.
133. Zhang L, Song H, Ge Y, Ji G, Yao Z. Temporal relationship between diet-induced steatosis and onset of insulin/leptin resistance in male Wistar rats. *PLoS One* 2015; **10**(2): e0117008.
134. Ruigrok SR, Abbink MR, Geertsema J, et al. Effects of Early-Life Stress, Postnatal Diet Modulation and Long-Term Western-Style Diet on Peripheral and Central Inflammatory Markers. *Nutrients* 2021; **13**(2).
135. Woodie L, Blythe S. The differential effects of high-fat and high-fructose diets on physiology and behavior in male rats. *Nutr Neurosci* 2018; **21**(5): 328-36.
136. Hegen M, Gaestel M, Nickerson-Nutter CL, Lin LL, Telliez JB. MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2006; **177**(3): 1913-7.
137. 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.
138. 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. *Sci Rep* 2017; **7**(1): 3612.
139. Gong H, Sun L, Chen B, et al. Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR studies in three metabolism related tissues of mice after caloric restriction. *Sci Rep* 2016; **6**: 38513.
140. 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.
141. Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017; **7**(1): 16878.
142. 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.
143. 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.
144. 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.
145. von Mering C, Huynen M, Jaeggi D, Schmidt S, Bork P, Snel B. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**(1): 258-61.
146. Mi H, Muruganujan A, Ebert D, Huang X, Thomas PD. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res* 2019; **47**(D1): D419-d26.
147. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2017; **45**(D1): D158-d69.
148. R Development Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. Wien, Österreich: R Foundation for Statistical Computing; 2008.
149. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, Massachusetts, USA: RStudio, Inc.; 2015.
150. 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.
151. Shields KJ, Wu C. Differential Adipose Tissue Proteomics. *Methods Mol Biol* 2018; **1788**: 243-50.
152. CECAD.

153. Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 2014; **27**(2): 371-418.
154. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006; **1**(3): 1559-82.
155. 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.
156. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; **37**(8): 911-7.
157. Cole KD, DeRose P, He HJ, et al. NIST Spectroscopic Measurement Standards. *Biopharm Int* 2018; **31**(4): 22-34.
158. Moore JB, Fielding BA. Sugar and metabolic health: is there still a debate? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2016; **19**(4): 303-9.
159. Yan R, Choi VWW, Hartono T, et al. Effect of lifelong sucrose consumption at human-relevant levels on food intake and body composition of C57BL/6N mice. *Front Nutr* 2022; **9**: 1076073.
160. 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-E511.
161. 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. *Sci Rep* 2019; **9**(1): 19556.
162. Heyne A, Kiesselbach C, Sahún I, et al. An animal model of compulsive food-taking behaviour. *Addict Biol* 2009; **14**(4): 373-83.
163. Sclafani A, Lucas F, Ackroff K. The importance of taste and palatability in carbohydrate-induced overeating in rats. *Am J Physiol* 1996; **270**(6 Pt 2): R1197-202.
164. Lindqvist A, de la Cour CD, Stegmark A, Håkanson R, Erlanson-Albertsson C. Overeating of palatable food is associated with blunted leptin and ghrelin responses. *Regul Pept* 2005; **130**(3): 123-32.
165. Shafat A, Murray B, Rumsey D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite* 2009; **52**(1): 34-8.
166. Boutari C, Pappas PD, Mintziori G, et al. The effect of underweight on female and male reproduction. *Metabolism* 2020; **107**: 154229.
167. Brook CG, Lloyd JK. Adipose cell size and glucose tolerance in obese children and effects of diet. *Arch Dis Child* 1973; **48**(4): 301-4.
168. Franck N, Stenkula KG, Öst A, Lindström T, Strålfors P, Nystrom FH. Insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane is blunted in large compared with small primary fat cells isolated from the same individual. *Diabetologia* 2007; **50**(8): 1716-22.
169. Haller H, Leonhardt W, Hanefeld M, Julius U. Relationship between adipocyte hypertrophy and metabolic disturbances. *Endokrinologie* 1979; **74**(1): 63-72.
170. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 2003; **278**(46): 45777-84.
171. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 2000; **43**(12): 1498-506.
172. Laforest S, Labrecque J, Michaud A, Cianflone K, Tchernof A. Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015; **52**(6): 301-13.
173. Le Lay S, Dugail I. Connecting lipid droplet biology and the metabolic syndrome. *Prog Lipid Res* 2009; **48**(3-4): 191-5.

174. 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.
175. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; **33**(3): 337-49.
176. Nguyen NH, Tran GB, Nguyen CT. Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. *J Mol Med (Berl)* 2020; **98**(1): 59-69.
177. Nakao C, Ookawara T, Sato Y, et al. Extracellular superoxide dismutase in tissues from obese (ob/ob) mice. *Free Radic Res* 2000; **33**(3): 229-41.
178. Ookawara T, Imazeki N, Matsubara O, et al. Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *Am J Physiol* 1998; **275**(3): C840-7.
179. Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta* 1982; **126**(1): 41-51.
180. Fukui T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002; **55**(2): 239-49.
181. Soedamah-Muthu SS, Fuller JH, Mulnier HE, Raleigh VS, Lawrenson RA, Colhoun HM. All-cause mortality rates in patients with type 1 diabetes mellitus compared with a non-diabetic population from the UK general practice research database, 1992-1999. *Diabetologia* 2006; **49**(4): 660-6.
182. Sudhakar V, Urao N, Oshikawa J, et al. Copper transporter ATP7A protects against endothelial dysfunction in type 1 diabetic mice by regulating extracellular superoxide dismutase. *Diabetes* 2013; **62**(11): 3839-50.
183. Kobylecki CJ, Afzal S, Nordestgaard BG. Genetically Low Antioxidant Protection and Risk of Cardiovascular Disease and Heart Failure in Diabetic Subjects. *EBioMedicine* 2015; **2**(12): 2010-5.
184. Kimura F, Hasegawa G, Obayashi H, et al. Serum extracellular superoxide dismutase in patients with type 2 diabetes: relationship to the development of micro- and macrovascular complications. *Diabetes Care* 2003; **26**(4): 1246-50.
185. Marklund SL. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J Biol Chem* 1992; **267**(10): 6696-701.
186. Mruk D, Cheng CH, Cheng YH, et al. Rat testicular extracellular superoxide dismutase: its purification, cellular distribution, and regulation. *Biol Reprod* 1998; **59**(2): 298-308.
187. Brady TC, Chang LY, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation. *Am J Physiol* 1997; **273**(5): L1002-6.
188. Kirsch J, Schneider H, Pagel JJ, et al. Endothelial Dysfunction, and A Prothrombotic, Proinflammatory Phenotype Is Caused by Loss of Mitochondrial Thioredoxin Reductase in Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; **36**(9): 1891-9.
189. Arnér ES. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**(6): 495-526.
190. 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.
191. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**(1): 44-84.
192. Dai S, He Y, Zhang H, et al. Endothelial-specific expression of mitochondrial thioredoxin promotes ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**(4): 495-502.

193. Widder JD, Fraccarollo D, Galuppo P, et al. Attenuation of angiotensin II-induced vascular dysfunction and hypertension by overexpression of Thioredoxin 2. *Hypertension* 2009; **54**(2): 338-44.
194. Sun LH, Pi DA, Zhao L, et al. Response of Selenium and Selenogenome in Immune Tissues to LPS-Induced Inflammatory Reactions in Pigs. *Biol Trace Elem Res* 2017; **177**(1): 90-6.
195. Mou D, Ding D, Yan H, et al. Maternal supplementation of organic selenium during gestation improves sows and offspring antioxidant capacity and inflammatory status and promotes embryo survival. *Food Funct* 2020; **11**(9): 7748-61.
196. Peleli M, Bibli SI, Li Z, et al. Cardiovascular phenotype of mice lacking 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Biochem Pharmacol* 2020; **176**: 113833.
197. Tsai CY, Peh MT, Feng W, Dymock BW, Moore PK. Hydrogen sulfide promotes adipogenesis in 3T3L1 cells. *PLoS One* 2015; **10**(3): e0119511.
198. Comas F, Latorre J, Ortega F, et al. Morbidly obese subjects show increased serum sulfide in proportion to fat mass. *Int J Obes (Lond)* 2021; **45**(2): 415-26.
199. Katsouda A, Szabo C, Papapetropoulos A. Reduced adipose tissue H(2)S in obesity. *Pharmacol Res* 2018; **128**: 190-9.
200. Rhee SG. Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells* 2016; **39**(1): 1-5.
201. Nelson KJ, Knutson ST, Soito L, Klomsiri C, Poole LB, Fetrow JS. Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. *Proteins* 2011; **79**(3): 947-64.
202. Fisher AB. Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *Antioxid Redox Signal* 2011; **15**(3): 831-44.
203. Knoops B, Goemaere J, Van der Eecken V, Declercq JP. Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin. *Antioxid Redox Signal* 2011; **15**(3): 817-29.
204. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem* 2012; **287**(7): 4403-10.
205. Moon EY, Noh YW, Han YH, et al. T lymphocytes and dendritic cells are activated by the deletion of peroxiredoxin II (Prx II) gene. *Immunol Lett* 2006; **102**(2): 184-90.
206. Moon EY, Han YH, Lee DS, Han YM, Yu DY. Reactive oxygen species induced by the deletion of peroxiredoxin II (PrxII) increases the number of thymocytes resulting in the enlargement of PrxII-null thymus. *Eur J Immunol* 2004; **34**(8): 2119-28.
207. Kim JH, Park SJ, Chae U, et al. Peroxiredoxin 2 mediates insulin sensitivity of skeletal muscles through regulation of protein tyrosine phosphatase oxidation. *Int J Biochem Cell Biol* 2018; **99**: 80-90.
208. Kim JH, Cha HN, Kim YW, Park SY. Peroxiredoxin 2 deficiency does not affect insulin resistance and oxidative stress in high-fat diet-fed obese mice. *Arch Physiol Biochem* 2022; **128**(4): 859-68.
209. Lee YJ. Knockout Mouse Models for Peroxiredoxins. *Antioxidants (Basel)* 2020; **9**(2).
210. Huh JY, Kim Y, Jeong J, et al. Peroxiredoxin 3 is a key molecule regulating adipocyte oxidative stress, mitochondrial biogenesis, and adipokine expression. *Antioxid Redox Signal* 2012; **16**(3): 229-43.
211. Stegert MR, Hergovich A, Tamaskovic R, Bichsel SJ, Hemmings BA. Regulation of NDR protein kinase by hydrophobic motif phosphorylation mediated by the mammalian Ste20-like kinase MST3. *Mol Cell Biol* 2005; **25**(24): 11019-29.
212. Ultanir SK, Yadav S, Hertz NT, et al. MST3 kinase phosphorylates TAO1/2 to enable Myosin Va function in promoting spine synapse development. *Neuron* 2014; **84**(5): 968-82.
213. Thompson BJ, Sahai E. MST kinases in development and disease. *J Cell Biol* 2015; **210**(6): 871-82.

214. Jiang Y, Tian M, Lin W, Wang X, Wang X. Protein Kinase Serine/Threonine Kinase 24 Positively Regulates Interleukin 17-Induced Inflammation by Promoting IKK Complex Activation. *Front Immunol* 2018; **9**: 921.
215. Managò A, Audrito V, Mazzola F, et al. Extracellular nicotinate phosphoribosyltransferase binds Toll like receptor 4 and mediates inflammation. *Nat Commun* 2019; **10**(1): 4116.
216. 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.
217. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2008; **7**(6): 489-503.
218. Furuhashi M, Fuseya T, Murata M, et al. Local Production of Fatty Acid-Binding Protein 4 in Epicardial/Perivascular Fat and Macrophages Is Linked to Coronary Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; **36**(5): 825-34.
219. Furuhashi M, Ishimura S, Ota H, Miura T. Lipid chaperones and metabolic inflammation. *Int J Inflamm* 2011; **2011**: 642612.
220. Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin Med Insights Cardiol* 2014; **8**(Suppl 3): 23-33.
221. Hotamisligil GS, Bernlohr DA. Metabolic functions of FABPs--mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol* 2015; **11**(10): 592-605.
222. Amri EZ, Bertrand B, Ailhaud G, Grimaldi P. Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. *J Lipid Res* 1991; **32**(9): 1449-56.
223. Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, Garvey WT. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2002; **165**(2): 259-69.
224. Distel RJ, Robinson GS, Spiegelman BM. Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 1992; **267**(9): 5937-41.
225. Melki SA, Abumrad NA. Expression of the adipocyte fatty acid-binding protein in streptozotocin-diabetes: effects of insulin deficiency and supplementation. *J Lipid Res* 1993; **34**(9): 1527-34.
226. Mita T, Furuhashi M, Hiramitsu S, et al. FABP4 is secreted from adipocytes by adenylyl cyclase-PKA- and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms. *Obesity (Silver Spring)* 2015; **23**(2): 359-67.
227. Kralisch S, Ebert T, Lossner U, Jessnitzer B, Stumvoll M, Fasshauer M. Adipocyte fatty acid-binding protein is released from adipocytes by a non-conventional mechanism. *Int J Obes (Lond)* 2014; **38**(9): 1251-4.
228. Cao H, Sekiya M, Ertunc ME, et al. Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab* 2013; **17**(5): 768-78.
229. Furuhashi M, Fucho R, Görgün CZ, Tuncman G, Cao H, Hotamisligil GS. Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest* 2008; **118**(7): 2640-50.
230. Ishimura S, Furuhashi M, Watanabe Y, et al. Circulating levels of fatty acid-binding protein family and metabolic phenotype in the general population. *PLoS One* 2013; **8**(11): e81318.
231. Xu A, Wang Y, Xu JY, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 2006; **52**(3): 405-13.

232. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 1996; **274**(5291): 1377-9.
233. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* 2000; **141**(9): 3388-96.
234. Xu A, Tso AW, Cheung BM, et al. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation* 2007; **115**(12): 1537-43.
235. Nakamura R, Okura T, Fujioka Y, et al. Serum fatty acid-binding protein 4 (FABP4) concentration is associated with insulin resistance in peripheral tissues, A clinical study. *PLoS One* 2017; **12**(6): e0179737.
236. Tso AW, Xu A, Sham PC, et al. Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care* 2007; **30**(10): 2667-72.
237. Ota H, Furuhashi M, Ishimura S, et al. Elevation of fatty acid-binding protein 4 is predisposed by family history of hypertension and contributes to blood pressure elevation. *Am J Hypertens* 2012; **25**(10): 1124-30.
238. Cabré A, Lázaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res* 2008; **49**(8): 1746-51.
239. Yeung DC, Xu A, Cheung CW, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**(8): 1796-802.
240. Rodríguez-Calvo R, Girona J, Alegret JM, Bosquet A, Ibarretxe D, Masana L. Role of the fatty acid-binding protein 4 in heart failure and cardiovascular disease. *J Endocrinol* 2017; **233**(3): R173-r84.
241. Sulsky R, Magnin DR, Huang Y, et al. Potent and selective biphenyl azole inhibitors of adipocyte fatty acid binding protein (aFABP). *Bioorg Med Chem Lett* 2007; **17**(12): 3511-5.
242. Burak MF, Inouye KE, White A, et al. Development of a therapeutic monoclonal antibody that targets secreted fatty acid-binding protein aP2 to treat type 2 diabetes. *Sci Transl Med* 2015; **7**(319): 319ra205.
243. Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, et al. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999-2004). *Arch Intern Med* 2008; **168**(15): 1617-24.
244. Tchkonina T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 2010; **9**(5): 667-84.
245. Jansa P, Burek C, Sander EE, Grummt I. The transcript release factor PTRF augments ribosomal gene transcription by facilitating reinitiation of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**(2): 423-9.
246. Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, et al. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 2008; **132**(1): 113-24.
247. Parton RG, del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**(2): 98-112.
248. Aboulaich N, Ortegren U, Vener AV, Strålfors P. Association and insulin regulated translocation of hormone-sensitive lipase with PTRF. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **350**(3): 657-61.
249. Low JY, Nicholson HD. Emerging role of polymerase-1 and transcript release factor (PTRF/ Cavin-1) in health and disease. *Cell Tissue Res* 2014; **357**(3): 505-13.

250. Ortegren U, Yin L, Ost A, Karlsson H, Nystrom FH, Strålfors P. Separation and characterization of caveolae subclasses in the plasma membrane of primary adipocytes; segregation of specific proteins and functions. *Febs j* 2006; **273**(14): 3381-92.
251. Kim CW, Addy C, Kusunoki J, et al. Acetyl CoA Carboxylase Inhibition Reduces Hepatic Steatosis but Elevates Plasma Triglycerides in Mice and Humans: A Bedside to Bench Investigation. *Cell Metab* 2017; **26**(2): 394-406.e6.
252. Harriman G, Greenwood J, Bhat S, et al. Acetyl-CoA carboxylase inhibition by ND-630 reduces hepatic steatosis, improves insulin sensitivity, and modulates dyslipidemia in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**(13): E1796-805.
253. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**(4): 1444-9.
254. Goedeke L, Bates J, Vatner DF, et al. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents. *Hepatology* 2018; **68**(6): 2197-211.
255. Marín-García J, Goldenthal MJ. Fatty acid metabolism in cardiac failure: biochemical, genetic and cellular analysis. *Cardiovasc Res* 2002; **54**(3): 516-27.
256. Liu T, Gou L, Yan S, Huang T. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase by PP-7a exerts beneficial effects on metabolic dysregulation in a mouse model of diet-induced obesity. *Exp Ther Med* 2020; **20**(1): 521-9.
257. Harwood HJ, Jr. Acetyl-CoA carboxylase inhibition for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Opin Investig Drugs* 2004; **5**(3): 283-9.
258. Chen L, Duan Y, Wei H, et al. Acetyl-CoA carboxylase (ACC) as a therapeutic target for metabolic syndrome and recent developments in ACC1/2 inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 2019; **28**(10): 917-30.
259. Hoehn KL, Turner N, Cooney GJ, James DE. Phenotypic discrepancies in acetyl-CoA carboxylase 2-deficient mice. *J Biol Chem* 2012; **287**(19): 15801; author reply 2.
260. Abu-Elheiga L, Wu H, Gu Z, Bressler R, Wakil SJ. Acetyl-CoA carboxylase 2-/- mutant mice are protected against fatty liver under high-fat, high-carbohydrate dietary and de novo lipogenic conditions. *J Biol Chem* 2012; **287**(15): 12578-88.
261. Abu-Elheiga L, Oh W, Kordari P, Wakil SJ. Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**(18): 10207-12.
262. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 2001; **291**(5513): 2613-6.
263. Perez-Diaz S, Johnson LA, DeKroon RM, et al. Polymerase I and transcript release factor (PTRF) regulates adipocyte differentiation and determines adipose tissue expandability. *Faseb j* 2014; **28**(8): 3769-79.
264. Volonte D, Galbiati F. Polymerase I and transcript release factor (PTRF)/cavin-1 is a novel regulator of stress-induced premature senescence. *J Biol Chem* 2011; **286**(33): 28657-61.
265. Huang K, Fang C, Yi K, et al. The role of PTRF/Cavin1 as a biomarker in both glioma and serum exosomes. *Theranostics* 2018; **8**(6): 1540-57.
266. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1817**(10): 1833-8.
267. Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; **15**(10): 634-46.
268. Hales KG. The machinery of mitochondrial fusion, division, and distribution, and emerging connections to apoptosis. *Mitochondrion* 2004; **4**(4): 285-308.

269. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003; **160**(2): 189-200.
270. Bach D, Pich S, Soriano FX, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 2003; **278**(19): 17190-7.
271. Pich S, Bach D, Briones P, et al. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 2005; **14**(11): 1405-15.
272. Bach D, Naon D, Pich S, et al. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 2005; **54**(9): 2685-93.
273. Cheng Z, Almeida FA. Mitochondrial alteration in type 2 diabetes and obesity: an epigenetic link. *Cell Cycle* 2014; **13**(6): 890-7.
274. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; **51**(10): 2944-50.
275. Mancini G, Pirruccio K, Yang X, Blüher M, Rodeheffer M, Horvath TL. Mitofusin 2 in Mature Adipocytes Controls Adiposity and Body Weight. *Cell Rep* 2019; **26**(11): 2849-58.e4.
276. Horn F. Biochemie des Menschen das Lehrbuch für das Medizinstudium: Georg Thieme Verlag; 2009.
277. Chypre M, Zaidi N, Smans K. ATP-citrate lyase: a mini-review. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **422**(1): 1-4.
278. Jeoung NH, Rahimi Y, Wu P, Lee WN, Harris RA. Fasting induces ketoacidosis and hypothermia in PDHK2/PDHK4-double-knockout mice. *Biochem J* 2012; **443**(3): 829-39.
279. Bao H, Kasten SA, Yan X, Roche TE. Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 2 activity limited and further inhibited by slowing down the rate of dissociation of ADP. *Biochemistry* 2004; **43**(42): 13432-41.
280. Sugden MC, Holness MJ. Therapeutic potential of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases in the prevention of hyperglycaemia. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2002; **2**(2): 151-65.
281. Jeoung NH, Wu P, Joshi MA, et al. Role of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) in glucose homeostasis during starvation. *Biochem J* 2006; **397**(3): 417-25.
282. Hwang B, Jeoung NH, Harris RA. Pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) deficiency attenuates the long-term negative effects of a high-saturated fat diet. *Biochem J* 2009; **423**(2): 243-52.
283. Jeoung NH, Harris RA. Pyruvate dehydrogenase kinase-4 deficiency lowers blood glucose and improves glucose tolerance in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; **295**(1): E46-54.
284. Laurent G, German NJ, Saha AK, et al. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol Cell* 2013; **50**(5): 686-98.
285. Dyck JR, Hopkins TA, Bonnet S, et al. Absence of malonyl coenzyme A decarboxylase in mice increases cardiac glucose oxidation and protects the heart from ischemic injury. *Circulation* 2006; **114**(16): 1721-8.
286. Bowman CE, Wolfgang MJ. Role of the malonyl-CoA synthetase ACSF3 in mitochondrial metabolism. *Adv Biol Regul* 2019; **71**: 34-40.
287. Lopaschuk GD, Stanley WC. Malonyl-CoA decarboxylase inhibition as a novel approach to treat ischemic heart disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006; **20**(6): 433-9.

288. Folmes CD, Lopaschuk GD. Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity. *Cardiovasc Res* 2007; **73**(2): 278-87.
289. Ruderman NB, Saha AK, Kraegen EW. Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology* 2003; **144**(12): 5166-71.
290. Fujino T, Kondo J, Ishikawa M, Morikawa K, Yamamoto TT. Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J Biol Chem* 2001; **276**(14): 11420-6.
291. Ling R, Chen G, Tang X, Liu N, Zhou Y, Chen D. Acetyl-CoA synthetase 2(ACSS2): a review with a focus on metabolism and tumor development. *Discov Oncol* 2022; **13**(1): 58.
292. Huang Z, Zhang M, Plec AA, et al. ACSS2 promotes systemic fat storage and utilization through selective regulation of genes involved in lipid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; **115**(40): E9499-e506.
293. Shaik AA, Qiu B, Wee S, Choi H, Gunaratne J, Tergaonkar V. Phosphoprotein network analysis of white adipose tissues unveils deregulated pathways in response to high-fat diet. *Sci Rep* 2016; **6**: 25844.
294. Granchi C. ATP citrate lyase (ACLY) inhibitors: An anti-cancer strategy at the crossroads of glucose and lipid metabolism. *Eur J Med Chem* 2018; **157**: 1276-91.
295. Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; **9**(4): 358-65.
296. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; **123**(3191): 309-14.
297. Biswas S, Lunec J, Bartlett K. Non-glucose metabolism in cancer cells--is it all in the fat? *Cancer Metastasis Rev* 2012; **31**(3-4): 689-98.
298. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 2005; **8**(4): 311-21.
299. Hanai JI, Doro N, Seth P, Sukhatme VP. ATP citrate lyase knockdown impacts cancer stem cells in vitro. *Cell Death Dis* 2013; **4**(6): e696.
300. Shi L, Tu BP. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Curr Opin Cell Biol* 2015; **33**: 125-31.
301. Lemus HN, Mendivil CO. Adenosine triphosphate citrate lyase: Emerging target in the treatment of dyslipidemia. *J Clin Lipidol* 2015; **9**(3): 384-9.
302. Leandro JG, Espindola-Netto JM, Vianna MC, et al. Exogenous citrate impairs glucose tolerance and promotes visceral adipose tissue inflammation in mice. *Br J Nutr* 2016; **115**(6): 967-73.
303. Miyazaki M, Kim HJ, Man WC, Ntambi JM. Oleoyl-CoA is the major de novo product of stearoyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. *J Biol Chem* 2001; **276**(42): 39455-61.
304. Miyazaki M, Man WC, Ntambi JM. Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *J Nutr* 2001; **131**(9): 2260-8.
305. Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J Lipid Res* 2001; **42**(7): 1018-24.
306. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, et al. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**(17): 11482-6.
307. 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.
308. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984; **25**(12): 1277-94.

309. Williams SC, Bruckheimer SM, Lusis AJ, LeBoeuf RC, Kinniburgh AJ. Mouse apolipoprotein A-IV gene: nucleotide sequence and induction by a high-lipid diet. *Mol Cell Biol* 1986; **6**(11): 3807-14.
310. Liu XH, Zhang Y, Chang L, et al. Apolipoprotein A-IV reduced metabolic inflammation in white adipose tissue by inhibiting IKK and JNK signaling in adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2023; **559**: 111813.
311. Hoffer MJ, van Eck MM, Havekes LM, Hofker MH, Frants RR. Structure and expression of the mouse apolipoprotein C2 gene. *Genomics* 1993; **17**(1): 45-51.
312. Sakurai T, Sakurai A, Vaisman BL, et al. Creation of Apolipoprotein C-II (ApoC-II) Mutant Mice and Correction of Their Hypertriglyceridemia with an ApoC-II Mimetic Peptide. *J Pharmacol Exp Ther* 2016; **356**(2): 341-53.
313. Maïga SF, Kalopissis AD, Chabert M. Apolipoprotein A-II is a key regulatory factor of HDL metabolism as appears from studies with transgenic animals and clinical outcomes. *Biochimie* 2014; **96**: 56-66.
314. Cheung MC, Albers JJ. Distribution of high density lipoprotein particles with different apoprotein composition: particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II. *J Lipid Res* 1982; **23**(5): 747-53.
315. Li WH, Tanimura M, Luo CC, Datta S, Chan L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res* 1988; **29**(3): 245-71.
316. Ikewaki K, Zech LA, Brewer HB, Jr., Rader DJ. ApoA-II kinetics in humans using endogenous labeling with stable isotopes: slower turnover of apoA-II compared with the exogenous radiotracer method. *J Lipid Res* 1996; **37**(2): 399-407.
317. Chan DC, Ng TW, Watts GF. Apolipoprotein A-II: evaluating its significance in dyslipidaemia, insulin resistance, and atherosclerosis. *Ann Med* 2012; **44**(4): 313-24.
318. Lagocki PA, Scanu AM. In vitro modulation of the apolipoprotein composition of high density lipoprotein. Displacement of apolipoprotein A-I from high density lipoprotein by apolipoprotein A-II. *J Biol Chem* 1980; **255**(8): 3701-6.
319. de Beer MC, Castellani LW, Cai L, Stromberg AJ, de Beer FC, van der Westhuyzen DR. ApoA-II modulates the association of HDL with class B scavenger receptors SR-BI and CD36. *J Lipid Res* 2004; **45**(4): 706-15.
320. Julve J, Escolà-Gil JC, Ribas V, et al. Mechanisms of HDL deficiency in mice overexpressing human apoA-II. *J Lipid Res* 2002; **43**(10): 1734-42.
321. Koike T, Kitajima S, Yu Y, et al. Expression of human apoAII in transgenic rabbits leads to dyslipidemia: a new model for combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **29**(12): 2047-53.
322. Weng W, Breslow JL. Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**(25): 14788-94.
323. Kuemmerle NB, Kinlaw WB. THRSP (thyroid hormone responsive). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2011; **15**(6): 480-2.
324. Kinlaw WB, Tron P, Witters LA. Thyroid hormone and dietary carbohydrate induce different hepatic zonation of both "spot 14" and acetyl-coenzyme-A carboxylase: a novel mechanism of coregulation. *Endocrinology* 1993; **133**(2): 645-50.
325. Harvatine KJ, Bauman DE. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *J Nutr* 2006; **136**(10): 2468-74.
326. Kinlaw WB, Church JL, Harmon J, Mariash CN. Direct evidence for a role of the "spot 14" protein in the regulation of lipid synthesis. *J Biol Chem* 1995; **270**(28): 16615-8.

327. Yang YA, Han WF, Morin PJ, Chrest FJ, Pizer ES. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Exp Cell Res* 2002; **279**(1): 80-90.
328. Dickson C, Fantl V, Gillett C, et al. Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett* 1995; **90**(1): 43-50.
329. Kinlaw WB, Quinn JL, Wells WA, Roser-Jones C, Moncur JT. Spot 14: A marker of aggressive breast cancer and a potential therapeutic target. *Endocrinology* 2006; **147**(9): 4048-55.
330. Ahonen MA, Höring M, Nguyen VD, et al. Insulin-inducible THRSP maintains mitochondrial function and regulates sphingolipid metabolism in human adipocytes. *Mol Med* 2022; **28**(1): 68.
331. Kirschner LS, Mariash CN. Adipose S14 mRNA is abnormally regulated in obese subjects. *Thyroid* 1999; **9**(2): 143-8.
332. Lee K, Kruper L, Dieli-Conwright CM, Mortimer JE. The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Curr Oncol Rep* 2019; **21**(5): 41.
333. Islam D, Islam MS, Jesmin. Association of hypertension, hyperlipidemia, obesity, and demographic risk factors with breast cancer in Bangladeshi women. *Medicine (Baltimore)* 2022; **101**(46): e31698.
334. Meyer D, Pastor-Villaescusa B, Michel S, Hauner H, Hauner D. Associations between circulating obesity-related biomarkers and prognosis in female breast cancer survivors: a systematic review of observational data in women enrolled in lifestyle intervention trials. *BMC Cancer* 2022; **22**(1): 1187.
335. Batarseh A, Papadopoulos V. Regulation of translocator protein 18 kDa (TSPO) expression in health and disease states. *Mol Cell Endocrinol* 2010; **327**(1-2): 1-12.
336. Venneti S, Lopresti BJ, Wiley CA. The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging. *Prog Neurobiol* 2006; **80**(6): 308-22.
337. van der Laken CJ, Elzinga EH, Kropholler MA, et al. Noninvasive imaging of macrophages in rheumatoid synovitis using 11C-(R)-PK11195 and positron emission tomography. *Arthritis Rheum* 2008; **58**(11): 3350-5.
338. Owen DR, Matthews PM. Imaging brain microglial activation using positron emission tomography and translocator protein-specific radioligands. *Int Rev Neurobiol* 2011; **101**: 19-39.
339. Hirsch JD. Pharmacological and physiological properties of benzodiazepine binding sites in rodent brown adipose tissue. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol* 1984; **77**(2): 339-43.
340. Campioli E, Carnevale G, Avallone R, Guerra D, Baraldi M. Morphological and receptorial changes in the epididymal adipose tissue of rats subjected to a stressful stimulus. *Obesity (Silver Spring)* 2011; **19**(4): 703-8.
341. Thompson MM, Manning HC, Ellacott KL. Translocator protein 18 kDa (TSPO) is regulated in white and brown adipose tissue by obesity. *PLoS One* 2013; **8**(11): e79980.
342. Baulies A, Montero J, Matías N, et al. The 2-oxoglutarate carrier promotes liver cancer by sustaining mitochondrial GSH despite cholesterol loading. *Redox Biol* 2018; **14**: 164-77.
343. Lash LH. Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem Biol Interact* 2006; **163**(1-2): 54-67.
344. Sreekumar PG, Wang M, Spee C, Sadda SR, Kannan R. Transporter-Mediated Mitochondrial GSH Depletion Leading to Mitochondrial Dysfunction and Rescue with α B Crystallin Peptide in RPE Cells. *Antioxidants (Basel)* 2020; **9**(5).
345. Li S, Raza SHA, Zhao C, Cheng G, Zan L. Overexpression of PLIN1 Promotes Lipid Metabolism in Bovine Adipocytes. *Animals (Basel)* 2020; **10**(11).

346. Patel KA, Burman S, Laver TW, Hattersley AT, Frayling TM, Weedon MN. PLIN1 Haploinsufficiency Causes a Favorable Metabolic Profile. *J Clin Endocrinol Metab* 2022; **107**(6): e2318-e23.
347. Holzbach LC, Silveira AGZ, Franco LP, Horst MA, Cominetti C. Polymorphism PLIN1 11482 G>A interacts with dietary intake to modulate anthropometric measures and lipid profile in adults with normal-weight obesity syndrome. *Br J Nutr* 2022; **128**(6): 1004-12.
348. Zabielska MA, Borkowski T, Slominska EM, Smolenski RT. Inhibition of AMP deaminase as therapeutic target in cardiovascular pathology. *Pharmacol Rep* 2015; **67**(4): 682-8.
349. Gross M. Molecular biology of AMP deaminase deficiency. *Pharm World Sci* 1994; **16**(2): 55-61.
350. Yang Q, Ma Q, Xu J, et al. Prkaa1 Metabolically Regulates Monocyte/Macrophage Recruitment and Viability in Diet-Induced Murine Metabolic Disorders. *Front Cell Dev Biol* 2020; **8**: 611354.
351. Ni Y, Xu Z, Li C, et al. Therapeutic inhibition of miR-802 protects against obesity through AMPK-mediated regulation of hepatic lipid metabolism. *Theranostics* 2021; **11**(3): 1079-99.
352. Yang Q, Ma Q, Xu J, et al. Endothelial AMPK α 1/PRKAA1 exacerbates inflammation in HFD-fed mice. *Br J Pharmacol* 2022; **179**(8): 1661-78.
353. Tomkinson B, Lindås AC. Tripeptidyl-peptidase II: a multi-purpose peptidase. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**(10): 1933-7.
354. Rockel B, Kopec KO, Lupas AN, Baumeister W. Structure and function of tripeptidyl peptidase II, a giant cytosolic protease. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1824**(1): 237-45.
355. McKay RM, McKay JP, Suh JM, Avery L, Graff JM. Tripeptidyl peptidase II promotes fat formation in a conserved fashion. *EMBO Rep* 2007; **8**(12): 1183-9.
356. Tian W, Zhou J, Chen M, et al. Bioinformatics analysis of the role of aldolase A in tumor prognosis and immunity. *Sci Rep* 2022; **12**(1): 11632.
357. Bai D, Du J, Bu X, et al. ALDOA maintains NLRP3 inflammasome activation by controlling AMPK activation. *Autophagy* 2022; **18**(7): 1673-93.
358. Liu J, Desai K, Wang R, Wu L. Up-regulation of aldolase A and methylglyoxal production in adipocytes. *Br J Pharmacol* 2013; **168**(7): 1639-46.
359. Hooper JK. ASGR1 and Its Enigmatic Relative, CLEC10A. *Int J Mol Sci* 2020; **21**(14).
360. van Kooyk Y, Ilarregui JM, van Vliet SJ. Novel insights into the immunomodulatory role of the dendritic cell and macrophage-expressed C-type lectin MGL. *Immunobiology* 2015; **220**(2): 185-92.
361. Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015; **2015**: 816460.
362. van Vliet SJ, Aarnoudse CA, Broks-van den Berg VC, Boks M, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. MGL-mediated internalization and antigen presentation by dendritic cells: a role for tyrosine-5. *Eur J Immunol* 2007; **37**(8): 2075-81.
363. Napoletano C, Zizzari IG, Rughetti A, et al. Targeting of macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) induces DC signaling and activation. *Eur J Immunol* 2012; **42**(4): 936-45.
364. Cheng X, Liu D, Song H, Tian X, Yan C, Han Y. Overexpression of Kininogen-1 aggravates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in DOX-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2021; **550**: 142-50.
365. Breitfeld J, Stumvoll M, Kovacs P. Genetics of adiponectin. *Biochimie* 2012; **94**(10): 2157-63.
366. Köhler J, Maletzki C, Koczan D, et al. Kininogen supports inflammation and bacterial spreading during Streptococcus Pyogenes Sepsis. *EBioMedicine* 2020; **58**: 102908.

367. Ruiz-Sanmartín A, Ribas V, Suñol D, et al. Characterization of a proteomic profile associated with organ dysfunction and mortality of sepsis and septic shock. *PLoS One* 2022; **17**(12): e0278708.
368. Spinelli FR, Colbert RA, Gadina M. JAK1: Number one in the family; number one in inflammation? *Rheumatology (Oxford)* 2021; **60**(Suppl 2): ii3-ii10.
369. Zhu Y, Tchkonja T, Stout MB, et al. Inflammation and the depot-specific secretome of human preadipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 2015; **23**(5): 989-99.
370. Kelly L, McGrath S, Rodgers L, et al. Annexin-A1: The culprit or the solution? *Immunology* 2022; **166**(1): 2-16.
371. Kosicka A, Cunliffe AD, Mackenzie R, et al. Attenuation of plasma annexin A1 in human obesity. *Faseb j* 2013; **27**(1): 368-78.
372. Pietrani NT, Ferreira CN, Rodrigues KF, et al. Proresolving protein Annexin A1: The role in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Biomed Pharmacother* 2018; **103**: 482-9.
373. Grewal T, Enrich C, Rentero C, Buechler C. Annexins in Adipose Tissue: Novel Players in Obesity. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(14).
374. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019; **20**(4): 242-58.
375. Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; **12**(11): 722-34.
376. Liang Y, Jansen M, Aronow B, Geiger H, Van Zant G. The quantitative trait gene latexin influences the size of the hematopoietic stem cell population in mice. *Nat Genet* 2007; **39**(2): 178-88.
377. Liu T, Gao Y, Sakamoto K, et al. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines. *J Cell Physiol* 2007; **211**(3): 728-35.
378. Kan S, Li R, Tan Y, et al. Latexin deficiency attenuates adipocyte differentiation and protects mice against obesity and metabolic disorders induced by high-fat diet. *Cell Death Dis* 2022; **13**(2): 175.
379. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 1994; **135**(2): 798-800.
380. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 2008; **77**: 289-312.
381. Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S. PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett* 2010; **584**(15): 3242-9.
382. Garin-Shkolnik T, Rudich A, Hotamisligil GS, Rubinstein M. FABP4 attenuates PPARγ and adipogenesis and is inversely correlated with PPARγ in adipose tissues. *Diabetes* 2014; **63**(3): 900-11.
383. Kitamura A, Maekawa Y, Uehara H, et al. A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J Clin Invest* 2011; **121**(10): 4150-60.
384. Arimochi H, Sasaki Y, Kitamura A, Yasutomo K. Differentiation of preadipocytes and mature adipocytes requires PSMB8. *Sci Rep* 2016; **6**: 26791.
385. Grunewald TG, Bach H, Cossarizza A, Matsumoto I. The STEAP protein family: versatile oxidoreductases and targets for cancer immunotherapy with overlapping and distinct cellular functions. *Biol Cell* 2012; **104**(11): 641-57.
386. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, et al. Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 4 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin expression in visceral adipose tissue is related to iron status and inflammation in human obesity. *Eur J Nutr* 2013; **52**(6): 1587-95.
387. Chen X, Huang Z, Zhou B, et al. STEAP4 and insulin resistance. *Endocrine* 2014; **47**(2): 372-9.

388. Chen X, Zhu C, Ji C, et al. STEAP4, a gene associated with insulin sensitivity, is regulated by several adipokines in human adipocytes. *Int J Mol Med* 2010; **25**(3): 361-7.
389. Qin DN, Kou CZ, Ni YH, et al. Monoclonal antibody to the six-transmembrane epithelial antigen of prostate 4 promotes apoptosis and inhibits proliferation and glucose uptake in human adipocytes. *Int J Mol Med* 2010; **26**(6): 803-11.
390. Zhang R, Wang Y, Li R, Chen G. Transcriptional Factors Mediating Retinoic Acid Signals in the Control of Energy Metabolism. *Int J Mol Sci* 2015; **16**(6): 14210-44.
391. Berry DC, Noy N. All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/delta and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol* 2009; **29**(12): 3286-96.
392. Berry DC, DeSantis D, Soltanian H, Croniger CM, Noy N. Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity. *Diabetes* 2012; **61**(5): 1112-21.
393. Helfer G, Wu QF. Chemerin: a multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. *J Endocrinol* 2018; **238**(2): R79-r94.
394. Cho DH, Hong YM, Lee HJ, et al. Induced inhibition of ischemic/hypoxic injury by APIP, a novel Apaf-1-interacting protein. *J Biol Chem* 2004; **279**(38): 39942-50.
395. Ko DC, Gamazon ER, Shukla KP, et al. Functional genetic screen of human diversity reveals that a methionine salvage enzyme regulates inflammatory cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**(35): E2343-52.
396. Mary C, Duek P, Salleron L, et al. Functional identification of APIP as human mtnB, a key enzyme in the methionine salvage pathway. *PLoS One* 2012; **7**(12): e52877.
397. Pirkov I, Norbeck J, Gustafsson L, Albers E. A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *Febs j* 2008; **275**(16): 4111-20.
398. Albers E. Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. *IUBMB Life* 2009; **61**(12): 1132-42.
399. Grimble RF, Grimble GK. Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. *Nutrition* 1998; **14**(7-8): 605-10.
400. Hyeon DY, Kim JH, Ahn TJ, Cho Y, Hwang D, Kim S. Evolution of the multi-tRNA synthetase complex and its role in cancer. *J Biol Chem* 2019; **294**(14): 5340-51.
401. Kwon NH, Fox PL, Kim S. Aminoacyl-tRNA synthetases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2019; **18**(8): 629-50.
402. Ahn SS, Kim JO, Yoon T, et al. Serum Aminoacyl-tRNA Synthetase-Interacting Multifunctional Protein-1 Can Predict Severe Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis: A Pilot Monocentric Study. *Biomed Res Int* 2019; **2019**: 7508240.
403. Burastero SE, Fabbri M. Aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein-1 (AIMP1): the member of a molecular hub with unexpected functions, including CD4 T cell homeostasis. *Clin Immunol* 2012; **143**(3): 207-9.
404. Ko YG, Park H, Kim T, et al. A cofactor of tRNA synthetase, p43, is secreted to up-regulate proinflammatory genes. *J Biol Chem* 2001; **276**(25): 23028-33.
405. Kwon HS, Park MC, Kim DG, et al. Identification of CD23 as a functional receptor for the proinflammatory cytokine AIMP1/p43. *J Cell Sci* 2012; **125**(Pt 19): 4620-9.
406. Zhou Z, Sun B, Huang S, Yu D, Zhang X. Roles of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multi-functional proteins in physiology and cancer. *Cell Death Dis* 2020; **11**(7): 579.
407. Kim JH, Lee JH, Park MC, et al. AIMP1 negatively regulates adipogenesis by inhibiting PPAR γ . *J Cell Sci* 2014; **127**(Pt 20): 4483-93.
408. Ghebrehiwet B, Geisbrecht BV, Xu X, Savitt AG, Peerschke EIB. The C1q Receptors: Focus on gC1qR/p33 (C1qBP, p32, HABP-1)(1). *Semin Immunol* 2019; **45**: 101338.

409. Dedio J, Jahnen-Dechent W, Bachmann M, Müller-Esterl W. The multiligand-binding protein gC1qR, putative C1q receptor, is a mitochondrial protein. *J Immunol* 1998; **160**(7): 3534-42.
410. Chen R, Xiao M, Gao H, et al. Identification of a novel mitochondrial interacting protein of C1QBP using subcellular fractionation coupled with CoIP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2016; **408**(6): 1557-64.
411. Saito T, Uchiumi T, Yagi M, et al. Cardiomyocyte-specific loss of mitochondrial p32/C1qbp causes cardiomyopathy and activates stress responses. *Cardiovasc Res* 2017; **113**(10): 1173-85.
412. Wang J, Huang CL, Zhang Y. Complement C1q Binding Protein (C1QBP): Physiological Functions, Mutation-Associated Mitochondrial Cardiomyopathy and Current Disease Models. *Front Cardiovasc Med* 2022; **9**: 843853.
413. Noh S, Phorl S, Naskar R, et al. p32/C1QBP regulates OMA1-dependent proteolytic processing of OPA1 to maintain mitochondrial connectivity related to mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Sci Rep* 2020; **10**(1): 10618.
414. Newlaczyk AU, Yu LG. Galectin-3--a jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Lett* 2011; **313**(2): 123-8.
415. Chen SC, Kuo PL. The Role of Galectin-3 in the Kidneys. *Int J Mol Sci* 2016; **17**(4): 565.
416. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev* 2009; **230**(1): 160-71.
417. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**(13): 6737-42.
418. Dong R, Zhang M, Hu Q, et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med* 2018; **41**(2): 599-614.
419. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res* 2003; **63**(23): 8302-11.
420. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, et al. Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **95**(3): 1404-11.
421. Baek JH, Kim SJ, Kang HG, et al. Galectin-3 activates PPAR γ and supports white adipose tissue formation and high-fat diet-induced obesity. *Endocrinology* 2015; **156**(1): 147-56.
422. Flotte TJ, Springer TA, Thorbecke GJ. Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. *Am J Pathol* 1983; **111**(1): 112-24.
423. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, et al. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes* 2013; **62**(6): 1932-44.
424. Pang J, Rhodes DH, Pini M, et al. Increased adiposity, dysregulated glucose metabolism and systemic inflammation in Galectin-3 KO mice. *PLoS One* 2013; **8**(2): e57915.
425. Li J, Huang L, Wang S, Zhang Z. Increased serum levels of high mobility group protein B1 and calprotectin in pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2018; **142**(1): 37-41.
426. Giacobbe A, Grasso R, Imbesi G, et al. High mobility group protein B1: a new biomarker of obesity in pregnant women? *Gynecol Endocrinol* 2015; **31**(2): 113-5.
427. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 2006; **20**(1): 1-15.
428. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1833**(12): 3448-59.
429. Eriksen JL, Mackenzie IR. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. *J Neurochem* 2008; **104**(2): 287-97.

430. Bateman A, Bennett HP. Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. *J Endocrinol* 1998; **158**(2): 145-51.
431. Youn BS, Bang SI, Klötting N, et al. Serum progranulin concentrations may be associated with macrophage infiltration into omental adipose tissue. *Diabetes* 2009; **58**(3): 627-36.
432. Gorkem U, Inal ZO, Inal HA, Bostanci MO. Serum progranulin levels are elevated in infertile women with obesity. *Endokrynol Pol* 2018; **69**(6): 661-6.
433. Kan O, Gorkem U. The effects of serum granulin levels on anthropometric measures and glucose metabolism in infertile women with different ovarian reserve status. *Endokrynol Pol* 2019; **70**(3): 255-9.
434. Quesada-Calvo F, Massot C, Bertrand V, et al. OLFM4, KNG1 and Sec24C identified by proteomics and immunohistochemistry as potential markers of early colorectal cancer stages. *Clin Proteomics* 2017; **14**: 9.
435. Niu Y, Chen L, Wu M, et al. Partial abrogation of FXR-KNG1 signaling by carboxyl-terminal truncated HBx-C30 in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Virus Res* 2021; **293**: 198264.
436. Li W, Yin X, Yan Y, Liu C, Li G. STEAP4 knockdown inhibits the proliferation of prostate cancer cells by activating the cGMP-PKG pathway under lipopolysaccharide-induced inflammatory microenvironment. *Int Immunopharmacol* 2021; **101**(Pt B): 108311.
437. Chen B, Lai J, Dai D, Chen R, Li X, Liao N. JAK1 as a prognostic marker and its correlation with immune infiltrates in breast cancer. *Aging (Albany NY)* 2019; **11**(23): 11124-35.
438. He M, Han Y, Cai C, et al. CLEC10A is a prognostic biomarker and correlated with clinical pathologic features and immune infiltrates in lung adenocarcinoma. *J Cell Mol Med* 2021; **25**(7): 3391-9.
439. Tang W, Huang C, Tang C, Xu J, Wang H. Galectin-3 may serve as a potential marker for diagnosis and prognosis in papillary thyroid carcinoma: a meta-analysis. *Oncotargets Ther* 2016; **9**: 455-60.
440. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; **22**(4): 189-95.
441. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; **87**(6): 2095-147.
442. Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 1986; **233**(4764): 652-4.
443. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010; **6**(4): 232-41.
444. Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; **8**(4): 253-65.
445. Ghanbari M, Momen Maragheh S, Aghazadeh A, et al. Interleukin-1 in obesity-related low-grade inflammation: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Int Immunopharmacol* 2021; **96**: 107765.
446. Juge-Aubry CE, Somm E, Chicheportiche R, et al. Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon-beta, and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**(6): 2652-8.
447. 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.
448. Touati S, Montezano AC, Meziri F, Riva C, Touyz RM, Laurant P. Exercise training protects against atherosclerotic risk factors through vascular NADPH oxidase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase downregulation in obese rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015; **42**(2): 179-85.

449. 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).
450. Huizing MJ, Cavallaro G, Moonen RM, et al. Is the C242T Polymorphism of the CYBA Gene Linked with Oxidative Stress-Associated Complications of Prematurity? *Antioxid Redox Signal* 2017; **27**(17): 1432-8.
451. San José G, Fortuño A, Beloqui O, Díez J, Zalba G. NADPH oxidase CYBA polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)* 2008; **114**(3): 173-82.
452. Bäckdahl J, Franzén L, Massier L, et al. Spatial mapping reveals human adipocyte subpopulations with distinct sensitivities to insulin. *Cell Metab* 2021; **33**(9): 1869-82.e6.
453. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**(6): 3077-82.
454. Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, et al. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* 2007; **46**(3): 823-30.
455. Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 2005; **330**(6): 326-35.
456. Marcelino G, Hiane PA, Freitas KC, et al. Effects of Olive Oil and Its Minor Components on Cardiovascular Diseases, Inflammation, and Gut Microbiota. *Nutrients* 2019; **11**(8).
457. Meng H, Matthan NR, Wu D, et al. Comparison of diets enriched in stearic, oleic, and palmitic acids on inflammation, immune response, cardiometabolic risk factors, and fecal bile acid concentrations in mildly hypercholesterolemic postmenopausal women-randomized crossover trial. *Am J Clin Nutr* 2019; **110**(2): 305-15.
458. Marangoni F, Agostoni C, Borghi C, et al. Dietary linoleic acid and human health: Focus on cardiovascular and cardiometabolic effects. *Atherosclerosis* 2020; **292**: 90-8.
459. Naughton SS, Mathai ML, Hryciw DH, McAinch AJ. Linoleic acid and the pathogenesis of obesity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2016; **125**: 90-9.
460. Blasbalg TL, Hibbeln JR, Ramsden CE, Majchrzak SF, Rawlings RR. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr* 2011; **93**(5): 950-62.
461. Hamilton JS, Klett EL. Linoleic acid and the regulation of glucose homeostasis: A review of the evidence. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2021; **175**: 102366.
462. Keys A, Anderson JT, Grande F. Prediction of serum-cholesterol responses of man to changes in fats in the diet. *Lancet* 1957; **273**(7003): 959-66.
463. Keys A, Anderson JT, Grande F. Serum cholesterol response to changes in the diet: IV. Particular saturated fatty acids in the diet. *Metabolism* 1965; **14**(7): 776-87.
464. Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr* 1965; **17**(5): 281-95.
465. Zazula R, Průcha M, Pehal F, et al. Kinetics of Myristic Acid Following Accidentally Induced Septic Response. *Prague Med Rep* 2019; **120**(2-3): 103-6.
466. Phinney SD. Arachidonic acid maldistribution in obesity. *Lipids* 1996; **31 Suppl**: S271-4.
467. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* 2012; **15**(6): 848-60.
468. Schlett CL, Hoffmann U. [Identification and quantification of fat compartments with CT and MRI and their importance]. *Radiologe* 2011; **51**(5): 372-8.
469. Dey D, Ramesh A, Slomka PJ, et al. Automated algorithm for atlas-based segmentation of the heart and pericardium from non-contrast CT. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 2010; **7623**: 762337.

470. Dogan A, Lasch P, Neuschl C, et al. ATR-FTIR spectroscopy reveals genomic loci regulating the tissue response in high fat diet fed BXD recombinant inbred mouse strains. *BMC Genomics* 2013; **14**: 386-.
471. Kahle M, Horsch M, Fridrich B, et al. Phenotypic comparison of common mouse strains developing high-fat diet-induced hepatosteatosis. *Mol Metab* 2013; **2**(4): 435-46.
472. Liebisch G, Ekroos K, Hermansson M, Ejsing CS. Reporting of lipidomics data should be standardized. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2017; **1862**(8): 747-51.
473. Lipidomics needs more standardization. *Nat Metab* 2019; **1**(8): 745-7.
474. Janoschek R, Handwerk M, Hucklenbruch-Rother E, et al. Heterogeneous effects of individual high-fat diet compositions on phenotype, metabolic outcome, and hepatic proteome signature in BL/6 male mice. *Nutr Metab (Lond)* 2023; **20**(1): 8.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

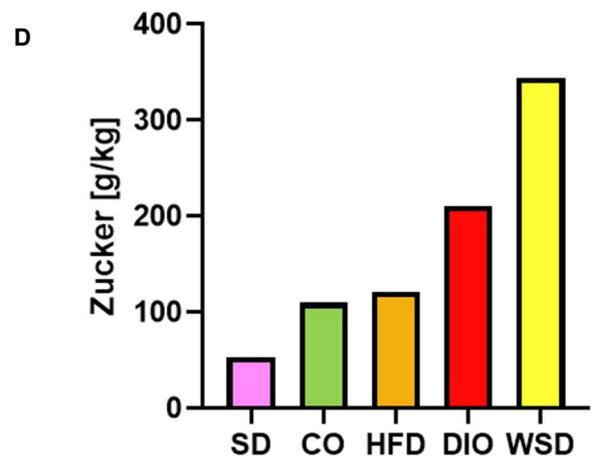
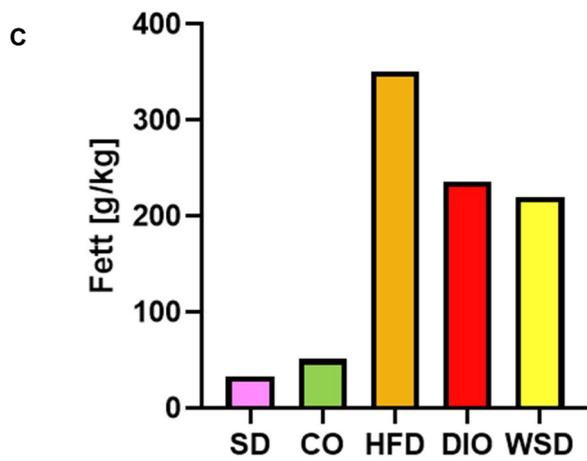
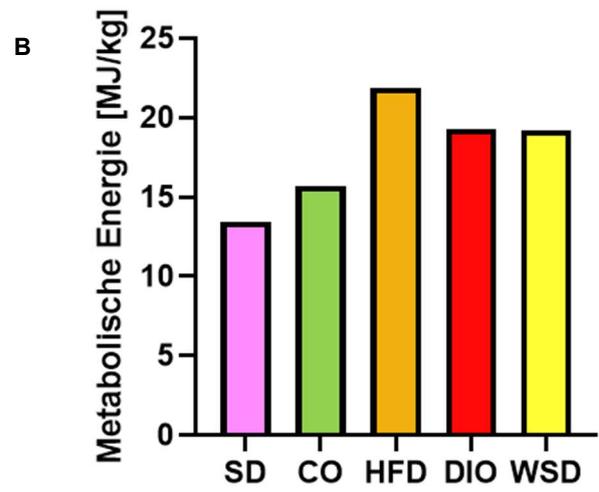
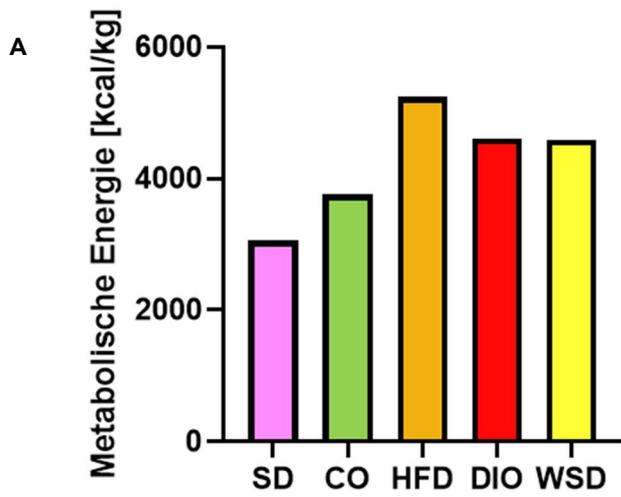
Abbildung 1: Morphologie des Futters	48
Abbildung 2: Präparationssitus einer tragenden Maus.....	51
Abbildung 3: Aufbau des Tierversuchs.....	52
Abbildung 4: Verarbeitung eines histologischen Bildes des egWAT eines WSD-Versuchstiers mittels QuPath.....	56
Abbildung 5: Eigene, schematische Darstellung der Grundlage der fluoreszenzgestützte Sonden im Taqman-Verfahren. Angelehnt an ¹⁵³ . R= Reporter, Q=Quencher	66
Abbildung 6: Körpergewicht und Gewicht des egWAT	77
Abbildung 7: Wasseraufnahme der weiblichen Mäuse während der Trächtigkeit	78
Abbildung 8: Gesamtfutteraufnahme der fünf Versuchsgruppen	79
Abbildung 9: Futteraufnahme der Versuchstiere über den Gestationszeitraum	80
Abbildung 10: μ CT der nicht-tragenden Mäuse.....	85
Abbildung 11: Ergebnisse der μ CT-Auswertung nicht tragender Mäuse	86
Abbildung 12: Auswertung der Fettzellen des egWATs eines Tieres der WSD-Versuchsgruppe mittels <i>Adiposoft</i> von <i>Image-J</i>	87
Abbildung 13: Auswertung der histologischen Untersuchungen der Fettzellen.....	89
Abbildung 14: Principal Component Analysis (PCA) aller detektierten Proteine des egWATs an G15,5	91
Abbildung 15: Volcano Plots der im egWAT detektierten Proteine an G15,5	94
Abbildung 16: Venn Diagramme ausschließlich mit den signifikant veränderten Proteinen des egWAT an G15,5	97
Abbildung 17: STRING-Mapping signifikant veränderter Proteine des SD vs. WSD-Vergleichs des egWAT an G15,5.....	99
Abbildung 18: ausgewählte Housekeeping-Gene für die RT-qPCR-Auswertung.....	104
Abbildung 19: relative mRNA-Expression von Entzündungs- und oxidativen Stressmarkern im egWAT an G15,5	106
Abbildung 20: relative mRNA-Expression von IL-1 β und SOD1 im egWAT der Versuchsgruppen CO, HFD und WSD im Vergleich zur SD-Gruppe.....	107
Abbildung 21: relative mRNA-Expression von Entzündungs- und oxidativen Stressmarkern im scWAT an G15,5.....	109

Abbildung 22: relative mRNA-Expression von IL-1 β und CYPA im scWAT der Versuchsgruppen CO, HFD, DIO und WSD im Vergleich zur SD-Gruppe.....	110
Abbildung 23: Ergebnisse des Fettsäureprofils im maternalen Serum	113
Abbildung 24: Zusammensetzung der fünf Futterarten	187
Abbildung 25: Länge bei Sectio in cm.....	187
Abbildung 26: μ CT der nicht-tragenden Maus S210 aus der CO-Gruppe mit Maßstab.....	188

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Enzyme in Reihenfolge nach Vorkommen im Text	38
Tabelle 2: Stammlösungen und Puffer	40
Tabelle 3: (Oligo-)Nukleotide für die cDNA-Synthese	41
Tabelle 4: Oligonukleotide für die RT-qPCR	41
Tabelle 5: Geräte	42
Tabelle 6: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien	44
Tabelle 7: Software & Datenbanken	44
Tabelle 8: Übersicht der Futterzusammensetzung der verwendeten Versuchsdiäten	49
Tabelle 9: Trächtigkeits- und Überlebensrate der Nachkommen von C57BL/6N Wildtyp-Mäusen der fünf verschiedenen Diätgruppen bei spontanem Wurf, sowie an Tag 2 und bis Tag 21 in Prozent.....	81
Tabelle 10: Anzahl der betrachteten Proteine nach dem Proteomic-Screen	90
Tabelle 11: Übersicht aller Überschneidungen der fünf verschiedenen Vergleiche	95
Tabelle 12: Anzahl an signifikanten Proteinen, mit 5/5, 0/5 oder 5/0 valid values sowie den definierten Schlagworten in der Kurzbeschreibung in der <i>STRING</i> -Datenbank.....	98
Tabelle 13: Auflistung der durch die Schlagwortbasierte Methode identifizierten Gene des Proteomic-Screens.....	100

7.3 Weitere Abbildungen



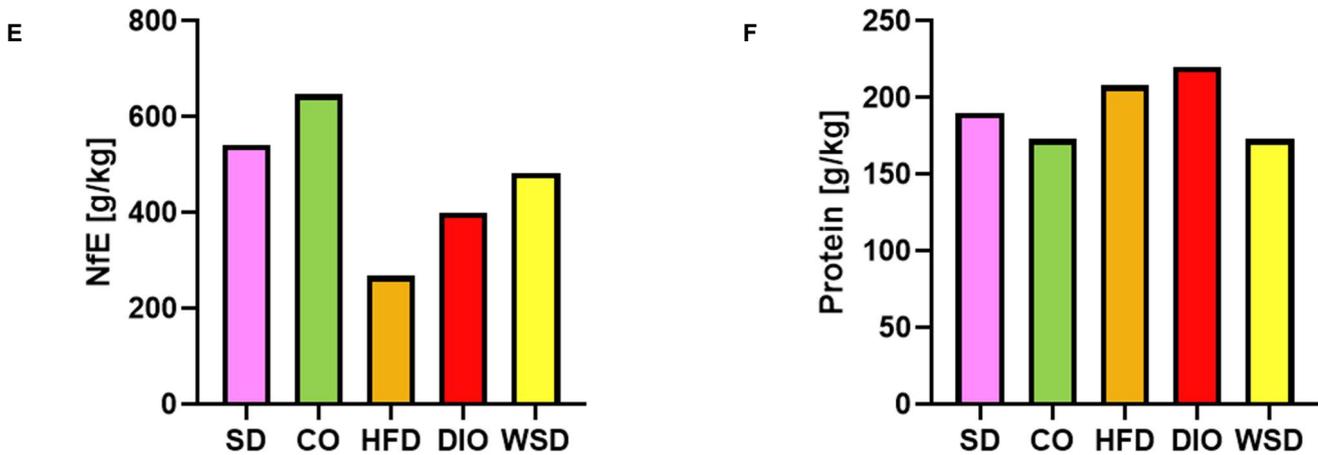


Abbildung 24: Zusammensetzung der fünf Futterarten

Im Alter von 3 Wochen wurden die Weibliche C57BL/6N Wildtyp-Mäuse in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt, die jeweils eine der folgenden Diäten erhielten: Standard-Diät (SD), Kontroll-Diät (CO), Hochfettdiät (HFD), Übergewichtsinduzierende-Diät (DIO) oder westliche Diät (WSD). Diese unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung, was dieser Abbildung dargestellt wird. Eine statistische Auswertung ist nicht möglich.

- A Gesamtkaloriengehalt in kcal/kg
- B Gesamtkaloriengehalt in MJ/kg
- C Fettgehalt in g/kg
- D Zuckergehalt in g/kg
- E NfE-Gehalt in g/kg
- F Proteingehalt in g/kg

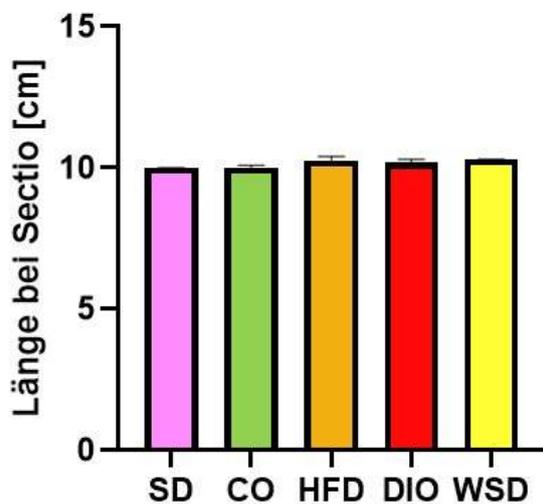


Abbildung 25: Länge bei Sectio in cm

Zu sehen ist die Körperlänge der weiblichen Mäuse in cm am Tag der Sectio (G15,5). Es zeigen sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den Gruppen.

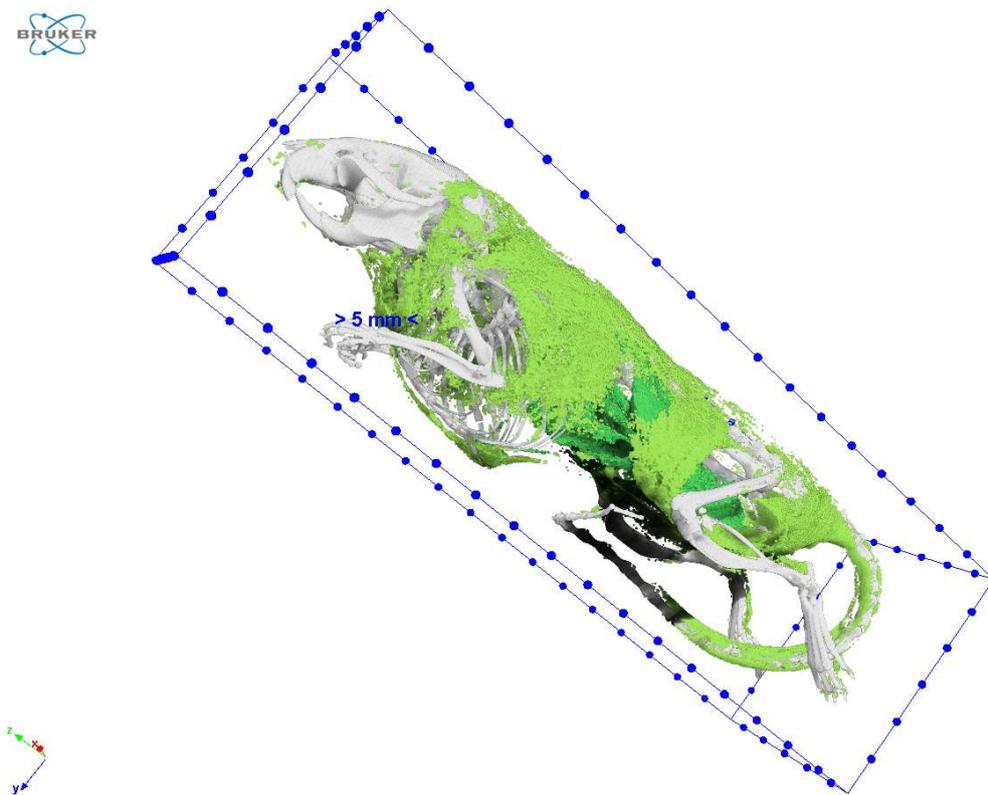


Abbildung 26: μ CT der nicht-tragenden Maus S210 aus der CO-Gruppe mit Maßstab

Weibliche Wildtyp-Mäuse wurden im Alter von 3 Wochen bis Versuchsende eine der fünf folgenden Diäten verfüttert: SD, CO, HFD, DIO oder WSD. Wurden die Weibchen nach bis zu 3 Verpaarungsversuchen über Nacht im Alter von 12-16 Wochen nicht tragend, wurden einige Tiere durch zervikale Dislokation getötet und mittels eines μ CTs eingescannt. Anschließend erfolgt eine computergestützte Bildauswertung durch die Phenotyping Core Facility des Max Plank Insituts für Biologie des Alterns. Hier dargestellt ist ein Tier aus der CO-Gruppe mit 3D Maßstab

8 Vorabveröffentlichung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung der SD- und HFD-Versuchsgruppe wurden bereits in dem Paper *Metformin Prevents Key Mechanisms of Obesity-Related Complications in Visceral White Adipose Tissue of Obese Pregnant Mice* im Jahr 2022 in *Nutrients* von Katrin Schmitz mit mir als Mitautorin veröffentlicht.¹

Siehe: Schmitz K, Turnwald EM, Kretschmer T, et al. Metformin Prevents Key Mechanisms of Obesity-Related Complications in Visceral White Adipose Tissue of Obese Pregnant Mice. *Nutrients* 2022; **14**(11)