

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

Maternale Adipositas und Metformintherapie während  
der Schwangerschaft: Die Auswirkungen auf den  
Hippocampus weiblicher Mausföten an Gestationstag  
18,5

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

vorgelegt von  
Isra Zayed  
aus Detmold

promoviert am 03.07.2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch  
2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. N. Kononenko

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:

Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Dötsch  
Dr. rer. nat. Sarah Appel  
Dr. med. Eva-Maria Turnwald  
Dr. nat. med. Tobias Kretschmer  
Maria Wohlfarth  
Marion Handwerk  
Dr. rer. nat. Ruth Janoschek  
Dr. med. Lisa Schmitz  
Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother

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

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

Die Haltung und Versorgung der Versuchstiere wurde durch die Tierpfleger\*innen des dezentralen Tierhaltungsnetzwerks der Uniklinik Köln, Marion Handwerk, Dr. Ruth Janoschek, Dr. Eva-Maria Turnwald, Dr. Tobias Kretschmer und Dr. Sarah Appel sichergestellt. Dr. Sarah Appel, Dr. Eva-Maria Turnwald, Dr. Tobias Kretschmer und Marion Handwerk waren

verantwortlich für die Planung des Versuchsablaufs sowie für das Verpaaren der Mäuse. Darüber hinaus haben sie gemeinsam mit Maria Wohlfarth die Präparation, Probenentnahme und Probenaufbewahrung durchgeführt sowie die Geschlechtsbestimmung der Föten.

Folgende Schritte der Proteinextraktion für den Proteomic Screen wurden von mir durchgeführt: Hinzugabe von Dithiothreitol und anschließendes Vortexen und Inkubation bei 55 °C sowie Hinzugabe von Chloracetamid und erneut anschließendes Vortexen und Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Alle anderen Schritte der Proteinextraktion wurden von der Proteomics Core Facility des CECAD durchgeführt. Die Mitarbeiter\*innen der Proteomics Core Facility führten zudem die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung für den Proteomic Screen durch, verarbeiteten die Daten mithilfe der Software *MaxQuant* und führten die weitere Analyse mit dem Programm *Perseus* durch.

Alle weiteren Arbeiten führte ich durch. Dabei wurde ich durch Dr. rer. nat. Sarah Appel, Dr. med. Eva-Maria Turnwald, Maria Wohlfarth und Dr. rer. nat. Ruth Janoschek angeleitet. Diese Arbeiten umfassten das Schneiden und Färben der Köpfe (Immunfluoreszenz, Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Toluidinblau-Färbung), das Mikroskopieren der Schnitte, das Lasern am Mikroskop, die statistische Auswertung der gewonnenen Daten und die Interpretation ebendieser als auch die Anfertigung der in dieser Arbeit aufgeführten Abbildungen, Tabellen und Diagramme.

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 18.02.2025

Unterschrift: .....

## Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Dötsch, für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung dieser experimentellen Arbeit, die mein Interesse an der Forschung geweckt hat.

Mein größter Dank gilt Dr. rer. nat. Sarah Appel und Dr. med. Eva-Maria Turnwald für ihre exzellente Betreuung, die wertvolle Unterstützung und den unermüdlichen Einsatz. Mit eurem Engagement, eurer Zuversicht und eurer Verlässlichkeit habt ihr ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank dafür!

Ein herzliches Dankeschön an das gesamte Team des Forschungspavillons, besonders an Maria Wohlfarth und Dr. rer. nat. Ruth Janoschek, die bei allen Fragen stets hilfsbereit zur Seite standen. Vielen Dank auch allen Promovierenden im Forschungspavillon für das kollegiale Miteinander und das angenehme Arbeitsklima.

Mein Dank richtet sich auch an das liebe Team des Studiendekanats, das mich wiederholt freundlich daran „erinnert“ hat, dass ich doch noch die Doktorarbeit schreiben wollte. Ein besonderer Dank gilt dabei Dr. rer. nat. Sören Moritz und Dr. rer. medic. Yassin Karay. Ein großes Dankeschön außerdem an Prof. Dr. med. Jan Matthes für das Gegenlesen, das konstruktive Feedback und den guten (!?) Willen. ;o)

Meinen Freundinnen und Freunden sowie all den Menschen, die mich auf diesem Weg begleitet haben, danke ich von Herzen für ihre Ermutigung. Besonders möchte ich Saskia Rodenberger für die vielen schönen und witzigen Momente im Labor danken, aus denen eine ganz wunderbare Freundschaft entstanden ist.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern gilt mein tiefster Dank für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung.

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>  | <b>9</b>  |
| <b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>14</b> |
| <b>2 EINLEITUNG</b>   | <b>16</b> |
| 2.1 Übergewicht und Adipositas: Prävalenz, Risiken und Auswirkungen auf Schwangere und deren Nachwuchs                              | 16        |
| 2.2 Hippocampus   | 17        |
| 2.2.1 Aufbau und Funktion   | 17        |
| 2.2.2 Auswirkungen von maternalem Übergewicht/maternaler Adipositas während der Schwangerschaft auf den Hippocampus des Nachwuchses | 18        |
| 2.3 Metformin   | 20        |
| 2.3.1 Wirkmechanismus   | 21        |
| 2.3.2 Effekte auf den Hippocampus   | 21        |
| 2.3.3 Einsatz von Metformin in der Schwangerschaft  | 22        |
| 2.3.4 Auswirkungen einer maternalen Metformintherapie während der Schwangerschaft auf den Nachwuchs                                 | 22        |
| 2.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit   | 24        |
| <b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>25</b> |
| 3.1 Chemikalien und Enzyme  | 25        |
| 3.2 Stammlösungen und Puffer  | 27        |
| 3.3 Primer  | 28        |
| 3.4 Antikörper  | 28        |
| 3.5 Geräte  | 29        |
| 3.6 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien  | 30        |
| 3.7 Software und Datenbanken  | 31        |
| 3.8 Mausmodell  | 31        |
| 3.8.1 Tierhaltung und Versuchsdieten  | 32        |

|        |   |           |
|--------|---|-----------|
| 3.8.2  | Verpaarung und Metforminintervention  | 32        |
| 3.8.3  | Tötung und Probenvorbereitung   | 33        |
| 3.9    | Bestimmung des Geschlechts der Föten mittels PCR  | 34        |
| 3.9.1  | DNA-Isolation   | 34        |
| 3.9.2  | PCR   | 34        |
| 3.9.3  | Agarose-Gelelektrophorese   | 35        |
| 3.10   | Immunhistologie   | 36        |
| 3.10.1 | Schneiden   | 36        |
| 3.10.2 | HE-Färbung  | 36        |
| 3.10.3 | Immunfluoreszenzfärbung   | 36        |
| 3.11   | Proteomic Screen  | 37        |
| 3.11.1 | Toluidinblau-Färbung  | 37        |
| 3.11.2 | Lasermikrodissektion  | 38        |
| 3.11.3 | Proteinextraktion   | 38        |
| 3.11.4 | Massenspektrometrie   | 39        |
| 3.11.5 | Analyse und Auswertung der massenspektrometrischen Daten  | 40        |
| 4      | <b>ERGEBNISSE</b>   | <b>42</b> |
| 4.1    | Immunfluoreszenz: Einschränkungen und exemplarische Befunde   | 42        |
| 4.2    | Proteomic Screen  | 45        |
| 4.2.1  | Hauptkomponentenanalyse   | 45        |
| 4.2.2  | Volcano Plots   | 45        |
| 4.2.3  | Übersichtstabellen aller signifikant und relevant veränderten Proteine  | 47        |
| 4.2.4  | Venn-Diagramm   | 67        |
| 4.2.5  | STRING-Analyse  | 73        |
| 5      | <b>DISKUSSION</b>   | <b>81</b> |
| 5.1    | Gefrierartefakte bei Immunfluoreszenz-Färbungen: Ursachen und Lösungsansätze  | 81        |
| 5.2    | Effekte von maternaler Nahrungs- und Metforminintervention während der Schwangerschaft auf das hippocampale Proteom weiblicher Nachkommen         | 82        |
| 5.2.1  | Effekte von maternaler Adipositas während der Schwangerschaft auf das hippocampale Proteom weiblicher Nachkommen                                  | 82        |
| 5.2.2  | Effekte von maternaler Metformintherapie während der Schwangerschaft auf das hippocampale Proteom weiblicher Nachkommen bei adipösen Muttertieren | 88        |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 5.2.3 | Effekte von maternaler Metformintherapie während der Schwangerschaft auf das hippocampale Proteom weiblicher Nachkommen unabhängig vom Körpergewicht der Muttertiere | 94  |
| 5.3   | Zusammenfassung, Limitation und Ausblick   | 96  |
| 6     | LITERATURVERZEICHNIS   | 99  |
| 7     | ANHANG   | 108 |
| 7.1   | Abbildungsverzeichnis  | 108 |
| 7.2   | Tabellenverzeichnis  | 108 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |   |
|-----------------|---|
| °C              | Grad Celsius  |
| µl              | Mikroliter  |
| µm              | Mikrometer  |
| µM              | Mikromolar  |
| Abb.            | Abbildung   |
| Actr1b          | Beta-Centractin   |
| Adk             | Adenosinkinase  |
| Aff4            | AF4/FMR2 Familienmitglied 4                                       |
| AGC             | automatische Verstärkungsregelung                                 |
| Akt3            | RAC-gamma Serin/Threonin-Proteinkinase                            |
| ApoB/ApoB-100   | Apolipoprotein B-100  |
| Arnt2           | Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Kerntranslokator 2                      |
| ATP             | Adenosintriphosphat   |
| Atp5b           | ATP-Synthase F1 Beta-Untereinheit, mitochondrial                  |
| Atp5d           | ATP-Synthase F1 Delta-Untereinheit, mitochondrial                 |
| Bai1            | Hirnspezifischer Angiogenese-Inhibitor 1                          |
| BDNF            | Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor                         |
| Becn1           | Beclin-1  |
| Body-Mass-Index | BMI   |
| bp              | Basenpaare  |
| CA              | Cornu ammonis   |
| ca.             | circa   |
| CA3             | Cornu ammonis 3   |
| Camk2d          | Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II Delta-Untereinheit  |
| Camkk2          | Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II                     |
| Ccnt1           | Cyclin-T1   |
| Cdk12           | Cyclin-abhängige Kinase 12  |
| CECAD           | Cologne Excellence Cluster on Aging and Aging-Associated Diseases |
| Chga            | Chromogranin-A  |
| Cnp             | 2',3'-Cyclonukleotid-3'-Phosphodiesterase                         |
| Cplx2           | Complexin-2   |
| CREB            | cAMP-response-Element-Bindungsprotein                             |
| Cy3             | Cyanin 3  |
| DAPI            | 4',6-Diamidin-2-phenylindol                                       |

|           |  |
|-----------|--|
| Dck       | Deoxycytidinkinase   |
| DCX       | Doublecortin   |
| Dlgap1    | Guanylatkinase-assoziiertes Protein                                |
| Dmd       | Dystrophin   |
| DNA       | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP      | Desoxynukleosidtriphosphate  |
| DTT       | Dithiothreitol   |
| EDTA      | Ethylendiamintetraessigsäure                                       |
| Eed       | Polycomb-Protein EED   |
| Epha5     | Ephrin-Typ-A-Rezeptor 5  |
| for       | forward (vorwärts)   |
| Foxg1     | Forkhead-Box-Protein G1  |
| G         | Gestationstag  |
| g         | Gramm  |
| g         | G-Zahl   |
| Gabra2    | Gamma-Aminobuttersäure-Rezeptor-Untereinheit Alpha-2               |
| GFAP      | saures Gliafaserprotein  |
| GLP-1     | Glucagon-like Peptide 1  |
| Glul      | Glutamin-Synthetase  |
| GluR1     | Glutamaterezeptor-1  |
| Gopc      | Golgi-assoziiertes PDZ- und Coiled-Coil-Motiv enthaltendes Protein |
| Gpx1      | Glutathionperoxidase 1   |
| Grk6      | G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase 6                             |
| Gsta4     | Glutathion-S-Transferase A4  |
| HCD       | kollisionsinduzierte Dissoziation                                  |
| HE        | Hämatoxylin-Eosin  |
| HFD       | Hochfettdiät ohne Metformin  |
| HFD+MF    | Hochfettdiät mit Metformin   |
| Hint1     | Histidin-Triaden-Nukleotid-bindendes Protein 1                     |
| Hist2h2ac | Histon H2A Typ 2-C   |
| Hmbg1     | High-Mobility-Group-Protein B1                                     |
| Htt       | Huntingtin   |
| Ict1      | Peptidyl-tRNA-Hydrolase ICT1, mitochondrial                        |
| ID        | Identifikation   |
| IF        | Immunfluoreszenz   |
| Jmjd1c    | Jumonji-Domänen enthaltendes Protein 1C                            |

|                   |  |
|-------------------|--|
| kcal              | Kilokalorien   |
| Keap1             | Kelch-ähnliche ECH-assoziierte Protein 1   |
| kg                | Kilogramm  |
| kg/m <sup>2</sup> | Kilogramm pro Quadratmeter   |
| Kif3c             | Kinesin-ähnliche Protein KIF3C   |
| Krt76             | Keratin, Typ II, zytoskelettal 2 oral  |
| LC/MS             | Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung                                |
| LCM               | Laser Capture Microdissection  |
| LFQ               | Markierungsfreie Quantifizierung (label-free quantification)                           |
| Lingo1            | Leucin-reiche Wiederholungs- und Immunoglobulin-ähnliche Domänen enthaltende Protein 1 |
| Lrrc7             | Leucin-reiches Repeat-Protein 7  |
| m/v               | Gewicht pro Volumen  |
| m/z               | Masse-zu-Ladung-Verhältnis   |
| ME                | metabolische Energie   |
| Men1              | Menin  |
| mg                | Milligramm   |
| min               | Minute   |
| ml                | Milliliter   |
| mM                | Millimolar   |
| Mrps6             | 28S Ribosomales Protein S6, mitochondrial  |
| Myo1c             | Myosin IC  |
| Myo6              | Myosin VI  |
| n                 | Größe der Stichprobe   |
| NaCl              | Natriumchlorid   |
| NCoR1/Ncor1       | Nuklearrezeptor-Co-Repressor 1   |
| NCoR2/Ncor2       | Nuklearrezeptor-Co-Repressor 2   |
| Ndufa2            | NADH-Dehydrogenase [Ubichinon] 1 Alpha-Untereinheit 2                                  |
| Ndufab1           | Acyl-Carrier-Protein, mitochondrial  |
| Ndufs1            | NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase 75 kDa-Untereinheit, mitochondrial                       |
| Ndufv1            | NADH-Dehydrogenase [Ubichinon] Flavoprotein 1, mitochondrial                           |
| Ndufv2            | NADH-Dehydrogenase [Ubichinon] Flavoprotein 2, mitochondrial                           |
| nl                | Nanoliter  |
| Nrf2              | Nuklearer Faktor Erythrozyten 2-ähnlicher Faktor 2                                     |
| NRW               | Nordrhein-Westfalen  |
| Nudt21            | Spaltungs- und Polyadenylierungsspezifitätsfaktor                                      |

|          |  |
|----------|--|
|          | Untereinheit 5   |
| Nup50    | Nucleoporin 50   |
| Nxn      | Nucleoredoxin  |
| p. a.    | pro analysi  |
| PBS      | Phosphatgepufferte Salzlösung  |
| PCR      | Polymerase-Kettenreaktion  |
| Pdhb     | Pyruvatdehydrogenase E1-Komponente Untereinheit beta,<br>mitochondrial         |
| Pdpn     | Podoplanin   |
| Pecam1   | Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül                                   |
| Pfdn5    | Prefoldin-Untereinheit 5   |
| Pick1    | PRKCA-bindendes Protein  |
| Ppp1ca   | Katalytische Untereinheit der Serin/Threonin-<br>Proteinphosphatase-PP1-alpha  |
| Ppp2cb   | Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2A katalytische Untereinheit<br>Beta-Isoform |
| Prkcd    | Proteinkinase C Delta-Typ  |
| Prpf40b  | Prä-mRNA-Prozessierungsfaktor 40 Homolog B                                     |
| Psd3     | PH- und SEC7-Domänen-beinhaltenes Protein 3                                    |
| Psph     | Phosphoserinphosphatase  |
| Rab31    | Ras-verwandtes Protein Rab-31  |
| Rack1    | Rezeptor für die aktivierte C-Kinase 1   |
| Reep2    | Rezeptorexpressionsverstärkendes Protein 2                                     |
| rev      | reverse (rückwärts)  |
| Rims1    | Regulierendes Exozytoseprotein 1 der synaptischen Membran                      |
| s.       | siehe  |
| SD       | Standarddiät ohne Metformin  |
| SD+MF    | Standarddiät mit Metformin   |
| SDS      | Natriumdodecylsulfat   |
| Setd2    | Histone-Lysin N-Methyltransferase SETD2  |
| Sf3b4    | Spleißfaktor 3B Untereinheit 4   |
| SGLT2    | Sodium-Glukose-Transporter 2   |
| Shank3   | SH3 und multiple Ankyrin-Wiederholungsdomänen 3                                |
| Slain1   | SLAIN Motiv-enthaltendes Protein 1   |
| Slc25a46 | SLC-Transporter Familie 25 Mitglied 46   |
| Sox21    | Transkriptionsfaktor SOX-21  |
| Sphk2    | Sphingosinkinase 2   |

|            |   |
|------------|---|
| Spindoc    | Spindlin-interagierendes und Chromatinbindung-hemmendes Protein |
| Stx18      | Syntaxin 18   |
| Sumo2      | Kleines Ubiquitin-ähnliches Modifikator-Protein 2               |
| TAE-Puffer | Tris-Acetat-EDTA-Puffer   |
| Tex2       | Testis-exprimiertes Protein 2                                   |
| Th         | Thomson   |
| Tmod2      | Tropomodulin 2  |
| Tns3       | Tensin 3  |
| Tor1a      | Torsin-1A   |
| TRIS       | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                                  |
| Tubb2b     | Tubulin beta-2B-Kette   |
| U          | Units   |
| UK         | Vereinigtes Königreich  |
| Uqcrb      | Untereinheit 7 des Cytochrom b-c1-Komplexes                     |
| Uqcrc1     | Untereinheit 1 des Cytochrom-b-c1-Komplexes                     |
| Uqcrc2     | Untereinheit 2 des Cytochrom-b-c1-Komplexes, mitochondrial      |
| USA        | Vereinigten Staaten von Amerika                                 |
| Use1       | Vesikeltransportprotein USE1                                    |
| V          | Volt  |
| v/v        | Volumen pro Volumen   |
| VE-Wasser  | vollentsalztes Wasser   |
| VGLUT2     | Vesikulärer Glutamatttransporter 2                              |
| vs.        | versus  |
| Vti1a      | Vesikeltransport durch Interaktion mit t-SNAREs-Homolog 1A      |

# 1 Zusammenfassung

Die globale Zunahme von Adipositas stellt ein wachsendes Gesundheitsrisiko dar, unter anderem während der Schwangerschaft. Maternale Adipositas während der Schwangerschaft stellt eine Gefahr für Mutter und Kind dar, einschließlich einer höheren Wahrscheinlichkeit für Gestationsdiabetes, Präeklampsie und fetale Fehlbildungen. Studien legen nahe, dass maternale Adipositas während der Schwangerschaft die Entwicklung des Hippocampus, einer Hirnregion, die für Lernen, Gedächtnis und Emotionsregulation zentral ist, negativ beeinflussen kann, was sich in kognitiven Defiziten der Nachkommen äußern könnte. Als mögliche Pathomechanismen werden erhöhter oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion und veränderte Neuroplastizität bei den Nachkommen diskutiert. Metformin, ein seit Jahrzehnten etabliertes Medikament zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2, zeigt in mehreren Studien positive Effekte auf Neuroplastizität, Gedächtnis, oxidativen Stress und mitochondriale Funktion. Diese Eigenschaften könnten potenziell die negativen Auswirkungen maternaler Adipositas auf den Hippocampus der Nachkommen abmildern.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss maternaler Adipositas und einer Metformintherapie während der Schwangerschaft auf das Proteom des fetalen Hippocampus weiblicher Nachkommen zu untersuchen. Hierzu wurden weibliche C57BL/6N-Mäuse ab der 3. Lebenswoche entweder mit Standarddiät (SD) oder fettreicher Diät (HFD) ernährt, um normalgewichtige und übergewichtige Mäuse für die Verpaarungen zu generieren. Ab dem Zeitpunkt der Verpaarung im Alter von 12 bis 16 Wochen erhielt ein Teil der schwangeren normalgewichtigen und übergewichtigen Weibchen randomisiert über die gesamte Schwangerschaft Metformin über das Trinkwasser (SD+MF, HFD+MF), während die anderen Tiere keine Metformin-Intervention bekamen (SD, HFD). Die Föten wurden schließlich am Gestationstag 18,5 entnommen und einer umfassenden Analyse des hippocampalen Proteoms unterzogen, wobei der Fokus auf Neuroplastizität, Gedächtnis, oxidativem Stress und mitochondrialer Funktion lag. Zudem wurden Immunfluoreszenzfärbungen des Hippocampus durchgeführt, um die Expression und Lokalisation zentraler Proteine zu untersuchen, die mit der Regulation der Genexpression, der neuronalen Plastizität, der synaptischen Funktion sowie der Astrozyten-Aktivierung assoziiert sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl maternale Adipositas als auch eine Metformintherapie während der Schwangerschaft signifikante Auswirkungen auf das hippocampale Proteom weiblicher Nachkommen haben. Metformin scheint das Proteom der Nachkommen besonders dann zu verändern, wenn die Muttertiere eine HFD erhielten. In der HFD-Gruppe zeigten sich signifikante und relevante Veränderungen in den Proteinleveln, die sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf Neuroplastizität und Gedächtnisfunktion haben könnten. Proteine der mitochondrialen Atmungskette waren in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert, was auf eine mitochondriale Dysfunktion in dieser

Gruppe hindeutet. Gleichzeitig fanden sich in dieser Gruppe Hinweise auf eine reduzierte antioxidative Abwehr, während andere signifikant und relevant veränderte Proteinlevel in der HFD-Gruppe möglicherweise einen Schutz vor oxidativem Stress bieten könnten. Die Metformintherapie führte bei adipösen Muttertieren zu signifikanten Veränderungen des Proteoms im Hippocampus der Nachkommen im Vergleich zur HFD-Gruppe, die sowohl positive als auch negative Effekte auf Neuroplastizität und Gedächtnis haben könnten. Obwohl Metformin teilweise die negativen Auswirkungen der maternalen Adipositas auf Neuroplastizität und Gedächtnis mildern könnte, zeigen die Ergebnisse auch, dass Metformin Proteinlevel beeinflusst, deren Veränderungen potenziell schädliche Effekte haben könnten. Zudem könnte Metformin einer mitochondrialen Dysfunktion und erhöhtem oxidativen Stress entgegenwirken, obwohl auch hier Anzeichen für eine mögliche Verschlechterung dieser Zustände vorhanden sind. In beiden Gruppen, SD+MF und HFD+MF, weist Metformin potenzielle antioxidative Eigenschaften auf, die mit der bestehenden Literatur übereinstimmen. Diese Arbeit liefert Hinweise darauf, wie maternale Adipositas und eine Metformintherapie während der Schwangerschaft das Proteom des Hippocampus weiblicher Nachkommen verändert und zeigt potenzielle Auswirkungen auf Neuroplastizität, Gedächtnisfunktion, oxidativen Stress und mitochondriale Funktion. Für zukünftige Arbeiten wäre es sinnvoll, männliche Nachkommen einzubeziehen, längerfristige Untersuchungen durchzuführen und ergänzende experimentelle Methoden anzuwenden, um die Effekte einer maternalen Metformintherapie während der Schwangerschaft bei Adipositas auf die hippocampale Funktion der Nachkommen umfassender bewerten zu können.

## 2 Einleitung

### 2.1 Übergewicht und Adipositas: Prävalenz, Risiken und Auswirkungen auf Schwangere und deren Nachwuchs

Die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas nimmt weltweit seit Jahren stetig zu. Die globale Prävalenz von Adipositas bei Erwachsenen hat sich zwischen 1990 und 2022 mehr als verdoppelt<sup>1</sup>. Im Jahr 2022 wurden 2,5 Milliarden Menschen weltweit als übergewichtig klassifiziert, davon waren 890 Millionen adipös<sup>1</sup>. Die Weltgesundheitsorganisation definiert Übergewicht als einen Body-Mass-Index (BMI) von 25 kg/m<sup>2</sup> oder höher und Adipositas als einen BMI von 30 kg/m<sup>2</sup> oder höher<sup>1</sup>. Übergewicht und Adipositas gelten als Risikofaktoren für zahlreiche Erkrankungen, darunter Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2, verschiedene Krebserkrankungen, Osteoarthritis, Asthma bronchiale und Depressionen<sup>2-4</sup>. Diese gesundheitlichen Folgen von Übergewicht und Adipositas gehen mit hohen wirtschaftlichen Kosten für die Gesellschaft einher<sup>5</sup>. Auch die immateriellen Kosten von Übergewicht und Adipositas, wie der Verlust an subjektivem Wohlbefinden bei den Betroffenen<sup>6</sup>, sollten nicht unerwähnt bleiben.

Bei Schwangeren ist die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas ebenfalls angestiegen. Laut der Bundesauswertung Geburtshilfe des Instituts für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen (IQTIG) waren 2022 15,70 % der Schwangeren adipös<sup>7</sup>, während dieser Anteil 2015 bei 9,31 % und 2014 bei 8,11 % lag<sup>8</sup>. Die Wahrscheinlichkeit, in einem Zyklus schwanger zu werden, ist bei übergewichtigen und adipösen Frauen geringer als bei Frauen mit einem optimalen BMI (18,5 - 24,9 kg/m<sup>2</sup>)<sup>9</sup>. Zudem besteht bei adipösen Frauen ein erhöhtes Risiko für Fehlgeburten<sup>10</sup>. Bei einer eingetretenen Schwangerschaft bergen Übergewicht und Adipositas der Mutter erhebliche Risiken sowohl für sie selbst als auch für das ungeborene Kind. Das Risiko, einen Gestationsdiabetes zu entwickeln, ist bei Schwangeren mit Übergewicht und Adipositas erhöht<sup>11</sup>, auch die Gefahr einer Präeklampsie steigt bei übergewichtigen und adipösen Schwangeren an<sup>12</sup>. Zusätzlich besteht bei adipösen Schwangeren ein erhöhtes Risiko für venöse Thromboembolien<sup>13,14</sup>. Darüber hinaus ist eine Weheninduktion mittels Oxytocin bei adipösen Schwangeren häufiger als bei Normalgewichtigen erforderlich<sup>15</sup>. Frauen mit einem BMI von  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> haben auch ein erhöhtes Risiko für Not-Kaiserschnitte, postpartale Blutungen, Genitaltrakt-, Harnwegs- und Wundinfektionen<sup>16</sup>.

Beim Nachwuchs übergewichtiger und adipöser Frauen besteht ein erhöhtes Risiko für angeborene Fehlbildungen wie Spina bifida, Omphalozele, Herzfehler, anorektale Atresie und andere Anomalien<sup>17-19</sup>. Auch die Zahl der Neugeborenen mit Makrosomie ist bei adipösen Schwangeren erhöht<sup>20</sup>. Des Weiteren haben Neugeborene adipöser Frauen ein erhöhtes Risiko für Frühgeburtlichkeit, eine Aufnahme auf die Intensivstation, Hypoglykämie und Neugeborenenikterus<sup>21</sup>. Ferner ist bekannt, dass maternales Übergewicht und maternale

Adipositas während der Schwangerschaft auch langfristige Folgen für die Gesundheit der Nachkommen haben. So steigt das Risiko für den Nachwuchs, selbst im Kindes- und Erwachsenenalter übergewichtig oder adipös zu werden<sup>22-24</sup>. Ein höherer mütterlicher BMI während der Schwangerschaft scheint außerdem mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2 bei dem Nachwuchs assoziiert zu sein<sup>25-27</sup>. Zusätzlich besteht eine Assoziation zwischen mütterlichem Übergewicht und Adipositas während der Schwangerschaft und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Asthma bronchiale bei den Nachkommen<sup>28,29</sup>. Außerdem wird auch ein gehäuftes Auftreten neurokognitiver Beeinträchtigungen und psychiatrischer Erkrankungen bei Nachkommen von Müttern mit Übergewicht oder Adipositas beschrieben. Dazu zählen unter anderem ein niedrigerer Intelligenzquotient, Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung und Autismus-Spektrum-Störung<sup>30-32</sup>.

## **2.2 Hippocampus**

### **2.2.1 Aufbau und Funktion**

Der Hippocampus ist ein Teil des Gehirns, der zum limbischen System gehört und tief im medialen Teil des Temporallappens liegt<sup>33</sup>. Er besteht aus zwei eng miteinander verbundenen Strukturen aus grauer Substanz: dem Gyrus dentatus und dem Cornu ammonis (CA)<sup>34</sup>. Das CA wird aufgrund seiner zellulären Architektur in vier Regionen unterteilt: CA1, CA2, CA3 und CA4<sup>34</sup>. Inferomedial geht das CA in das Subiculum über, das als weiterer Teil des hippocampalen Komplexes direkt an den Gyrus parahippocampalis anschließt<sup>35</sup>. In der axialen und sagittalen Darstellung lässt sich der Hippocampus in drei Segmente unterteilen: das anteriore Segment oder „Kopf“, das intermediäre Segment oder „Körper“ und das posteriore Segment oder „Schwanz“<sup>34</sup>. Die weißen Fasern des Hippocampus bündeln sich an seiner Oberfläche zu einer Schicht, dem Alveus<sup>34</sup>. Diese Fasern konzentrieren sich medial und bilden die Fimbria hippocampi, die in den Fornix cerebri übergeht<sup>34</sup>.

Die Funktionen des Hippocampus umfassen unter anderem Lernen, Gedächtnis und Emotionsregulation<sup>36</sup>. Der Hippocampus ist am Kurzzeitgedächtnis und am deklarativen Langzeitgedächtnis beteiligt, das das semantische Gedächtnis (Fakten und Konzepte) sowie das episodische Gedächtnis (persönliche Erlebnisse) umfasst<sup>36</sup>. Zudem spielt der Hippocampus eine Rolle beim räumlichen Gedächtnis<sup>36</sup>. Es wird auch angenommen, dass der Hippocampus an der Regulation bestimmter emotionaler Verhaltensweisen beteiligt ist, insbesondere im Kontext der Schmerzverarbeitung<sup>36</sup>. Für die Ausführung seiner Funktionen weist der Hippocampus eine Vielzahl direkter Verbindungen zu kortikalen Arealen auf, einschließlich der Area entorhinalis und des perirhinalen Kortex<sup>37</sup>. Zusätzlich ist der

Hippocampus durch Projektionen zum paraventriculären Kern des Hypothalamus an der Regulation des adrenocorticotropen Hormons beteiligt<sup>36</sup>.

Eine Besonderheit des Hippocampus ist seine Fähigkeit zur lebenslangen Neurogenese und Plastizität<sup>38,39</sup>. Unter Neuroplastizität versteht man die Fähigkeit des Gehirns, sich durch Entwicklung und Umstrukturierung zu verändern<sup>39</sup>. Dabei wird zwischen struktureller und funktioneller Plastizität unterschieden<sup>39</sup>. Beide Formen der Plastizität - strukturelle und synaptische Plastizität - arbeiten zusammen, um die Struktur und Funktion des Gehirns zu erhalten und anzupassen<sup>39</sup>. Strukturelle Plastizität umfasst unter anderem Veränderungen in der Größe und Form von Dendriten, die durch das neuronale Zytoskelett und verschiedene Signalmoleküle reguliert werden<sup>39</sup>. Funktionelle Plastizität, auch synaptische Plastizität genannt, betrifft die Effizienz und Stärke der synaptischen Übertragung, die durch verschiedene Prozesse wie die Bildung neuer Verbindungen, die Modifikation von Synapsen und die Änderung ihrer Erregbarkeit beeinflusst wird<sup>39</sup>. Zu den Formen der synaptischen Plastizität zählen Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression<sup>39</sup>. Langzeitpotenzierung bezeichnet eine Verstärkung der synaptischen Übertragung, die durch gleichzeitige Aktivität auf der prä- und postsynaptischen Seite hervorgerufen wird und zu einer langanhaltenden Veränderung der synaptischen Stärke führt<sup>40</sup>. Im Gegensatz dazu beschreibt die Langzeitdepression eine langanhaltende Abschwächung der synaptischen Reaktionen, die durch wiederholte Stimulation mit niedriger Frequenz ausgelöst wird<sup>41</sup>. Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression werden als mögliche Phänomene betrachtet, die die zellulären Mechanismen widerspiegeln, welche den Prozessen des Lernens und des Gedächtnisses zugrunde liegen<sup>40,42</sup>.

## **2.2.2 Auswirkungen von maternalem Übergewicht/maternaler Adipositas während der Schwangerschaft auf den Hippocampus des Nachwuchses**

Mehrere Studien haben ergeben, dass maternales Übergewicht/maternale Adipositas während der Schwangerschaft relevante Auswirkungen auf den Hippocampus des Nachwuchses haben. Versuche an Mäusen haben gezeigt, dass der Nachwuchs von Muttertieren, die während der Schwangerschaft übergewichtig/adipös waren, ein signifikant kleineres Volumen des Hippocampus, eine reduzierte kortikale Dicke sowie eine beeinträchtigte Myelinisierung aufwies<sup>43</sup>. Interessanterweise wurden bei mehreren neurokognitiven und psychiatrischen Auffälligkeiten, wie Depressionen, kognitiven Beeinträchtigungen und Alzheimer-Demenz, kleinere Hippocampus-Volumina beim Menschen beschrieben<sup>44</sup>. Studien mit Nagetieren zeigten zudem, dass der Nachwuchs von Muttertieren, die während der Schwangerschaft übergewichtig/adipös waren, bei hippocampusabhängigen Verhaltensaufgaben, die räumliches Lernen und räumliches Gedächtnis betreffen, schlechter abschneidet<sup>45</sup>.

Mehrere zelluläre und molekulare Auffälligkeiten wurden bei Nachwuchs von Muttertieren beschrieben, die während der Schwangerschaft übergewichtig/adipös waren. Dazu gehören eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  sowie eine erhöhte Aktivität von Mikroglia im Hippocampus dieser Nachkommen<sup>46</sup>. Mikroglia gelten als primäre Produzenten von Zytokinen im Gehirn<sup>46</sup>. Sie reagieren auf Störungen im Gleichgewicht des Gehirns, die beispielsweise durch Stress oder Verletzungen ausgelöst werden, mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und verursachen dadurch eine Neuroinflammation<sup>47</sup>. Neuroinflammation und oxidativer Stress bedingen sich gegenseitig: Entzündungszellen produzieren reaktive Sauerstoffspezies, während diese reaktiven Sauerstoffspezies wiederum intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren können, die zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Gene führen<sup>47</sup>. Unter oxidativem Stress versteht man ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien, bei dem die Oxidantien überwiegen und möglicherweise Schäden verursachen können<sup>48</sup>. Oxidantien entstehen normalerweise als Nebenprodukt des aeroben Stoffwechsels, können jedoch unter pathophysiologischen Bedingungen in erhöhten Mengen produziert werden<sup>48</sup>. Chronische inflammatorische Prozesse und oxidativer Stress spielen eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer-Demenz<sup>49</sup>. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass mütterliches Übergewicht/mütterliche Adipositas während der Schwangerschaft durch erhöhten oxidativen Stress und gesteigerte Neuroinflammation das hippocampale Lernen der Nachkommen beeinträchtigen könnte<sup>50</sup>. In Zusammenhang mit oxidativem Stress werden zudem die freien Fettsäuren erwähnt, die bei übergewichtigen/adipösen Schwangeren in erhöhter Menge im Blut nachweisbar sind und die Plazenta passieren<sup>51,52</sup>. Freie Fettsäuren fördern die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase, was ebenfalls zum oxidativen Stress beiträgt<sup>53</sup>.

Eine übermäßige Produktion reaktiver Sauerstoffspezies oder unzureichende antioxidative Schutzmechanismen können potenziell alle Zellkomponenten schädigen<sup>54</sup>. Mitochondrien sind ein zentrales zelluläres Ziel für oxidativen Stress und sind sowohl an der Energieproduktion als auch an der Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt<sup>55</sup>. Sie gelten als der Ort innerhalb der Zelle, an dem der größte Anteil reaktiver Sauerstoffspezies gebildet wird<sup>56</sup>. Diese reaktiven Sauerstoffspezies und der damit einhergehende oxidative Stress begünstigen Defekte im mitochondrialen Stoffwechsel<sup>56,57</sup>. Eine mitochondriale Dysfunktion wurde bereits mehrfach in Zusammenhang mit Übergewicht/Adipositas beschrieben, wie de Mello et al. in ihrer Übersichtsarbeit zeigten<sup>58</sup>. Bei übergewichtigen/adipösen Ratten konnte zudem eine solche Dysfunktion im Hirngewebe nachgewiesen werden<sup>59</sup>. Eine mitochondriale Dysfunktion im Hippocampus wird in Zusammenhang mit erhöhter Neurodegeneration und reduzierter Gedächtnisleistung in Verbindung gebracht<sup>60,61</sup>.

Auch eine hippocampale Insulinresistenz wird bei Nachwuchs von Muttertieren, die während der Schwangerschaft übergewichtig/adipös waren, beschrieben. So konnten Schmitz et al., in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Appel, feststellen, dass selbst bei erwachsenem Nachwuchs eine hippocampale Insulinresistenz nachweisbar ist, welche mit veränderter hippocampaler Neurogenese und synaptischer Plastizität einhergeht<sup>62</sup>. Grillo et al. konnten zeigen, dass eine hippocampale Insulinresistenz zu einer defizitären synaptischen Plastizität und Beeinträchtigungen im räumlichen Lernen führt, was auf Störungen der hippocampalen Funktion hinweist<sup>63</sup>. Zudem wurde gezeigt, dass mütterliches Übergewicht/mütterliche Adipositas während der Schwangerschaft die hippocampale Neurogenese postnatal bei den Nachkommen beeinträchtigt<sup>64</sup>. Ein weiterer mutmaßlich für die synaptische Plastizität und die Gedächtnisbildung im Hippocampus bedeutender Faktor ist das Hormon Leptin. Eine maternale HFD während der Schwangerschaft führt zu einer verminderten Expression von Leptinrezeptoren im Hippocampus des Nachwuchses<sup>65</sup>. Leptin scheint die Langzeitpotenzierung im Hippocampus zu fördern; ein Mangel an Leptinrezeptoren im Hippocampus scheint hingegen zu Defiziten im räumlichen Gedächtnis zu führen<sup>66,67</sup>.

Im Hippocampus von Nachkommen von Muttertieren, die während der Schwangerschaft übergewichtig/adipös waren, wurde postnatal am 21. Lebenstag eine signifikant erhöhte Lipidperoxidation und eine signifikant verringerte Menge des Wachstumsfaktors BDNF nachgewiesen<sup>68</sup>. Diese Unterschiede konnten jedoch bei Embryonen am 18. Tag und bei Tieren am 70. Lebenstag im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden<sup>68</sup>. Eine beeinträchtigte BDNF-Produktion im Hippocampus ging mit Defiziten im räumlichen Lernen und räumlichen Gedächtnis bei jungen Nachkommen einher<sup>68</sup>. BDNF spielt eine Rolle beim Überleben, der Erhaltung und Differenzierung mehrerer Neuronenarten und ist im Hippocampus für gewöhnlich in hoher Konzentration vorhanden<sup>68</sup>. Zudem ist BDNF an der Förderung der synaptischen Plastizität beteiligt und unterstützt das Langzeitgedächtnis<sup>69,70</sup>. Eine weitere Mausstudie ergab, dass die Entwicklung des Hippocampus beim Nachwuchs von übergewichtigen/adipösen Muttertieren am 17. Tag der embryonalen Entwicklung beeinträchtigt war<sup>71</sup>. Konkret zeigten sich unter anderem eine reduzierte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen sowie eine verringerte neuronale Differenzierung im Gyrus dentatus<sup>71</sup>.

### **2.3 Metformin**

Metformin vereint mehrere Eigenschaften, die möglicherweise den negativen Auswirkungen mütterlicher Adipositas während der Schwangerschaft auf die Funktion und Entwicklung des Hippocampus des Nachwuchses entgegenwirken könnten. Bei Metformin handelt es sich um ein Biguanid, welches seit bereits über 60 Jahren als Antidiabetikum bei der Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 im klinischen Einsatz ist<sup>72</sup>. Trotz vieler neuer Antidiabetika auf dem

Markt wird das Medikament in vielen Leitlinien weiterhin als Erstlinientherapie bei Diabetes mellitus Typ 2 empfohlen<sup>73</sup>. Nicht zuletzt dürfte das daran liegen, dass die Therapie mit diesem Antidiabetikum mehrere Vorteile mit sich bringt. Dazu gehören, dass durch den langen klinischen Einsatz bereits Langzeitdaten zur Sicherheit und Wirksamkeit vorliegen, ein geringes Risiko für Hypoglykämien, kardiovaskuläre Vorteile, eine Senkung der Mortalität, geringe Kosten und eine breite Verfügbarkeit des Medikaments<sup>73</sup>. Zudem führt die Einnahme von Metformin zu einem Gewichtsverlust, auch wenn dieser im Vergleich zu anderen, teureren Antidiabetika wie SGLT2-Hemmern und GLP-1-Rezeptor-Agonisten eher gering ausfällt<sup>72</sup>.

### **2.3.1 Wirkmechanismus**

Auch wenn Metformin seit 1957 als Antidiabetikum eingesetzt wird, ist der Wirkmechanismus weiterhin nicht eindeutig geklärt<sup>73</sup>. Traditionell wird Metformin als Wirkstoff betrachtet, der durch seine Wirkung in der Leber den Blutzuckerspiegel senkt<sup>74</sup>. Metformin reduziert dabei die hepatische Glukoneogenese und verbessert die Insulinsensitivität<sup>74</sup>. Eine mögliche Erklärung für die Reduktion der hepatischen Glukoneogenese durch Metformin ist, dass der Wirkstoff sich in den Mitochondrien anreichert und durch die Hemmung von Atmungskettenkomplexen die ATP-Produktion verringert, was wiederum zu einer Hemmung des energieverbrauchenden Prozesses der Glukoneogenese führt<sup>74</sup>. Zudem werden durch Metformin weitere Stoffwechselvorgänge in der Leber angestoßen, die die Fettsynthese hemmen und die Fettoxidation fördern, wodurch die hepatischen Lipidspeicher reduziert und die Insulinsensitivität der Leber gesteigert werden<sup>74</sup>. Auch der Darm könnte eine Rolle bei der Senkung des Blutzuckerspiegels durch Metformin spielen<sup>75</sup>. Mögliche Mechanismen sind, dass Metformin die Glukoseaufnahme und Glukoseverwertung im Darm erhöht und die Sekretion des Darmhormons GLP-1 steigert<sup>75</sup>.

### **2.3.2 Effekte auf den Hippocampus**

Neben seiner blutzuckersenkenden Wirkung ist Metformin für eine Reihe weiterer biologischer Effekte bekannt, auch im Hippocampus. Mehrere Tierversuche zeigten, dass Metformin in der Lage ist, oxidativen Stress, welcher je nach Studie aus unterschiedlichen Gründen verursacht wurde, im Hippocampus zu reduzieren, was jeweils mit einer Verbesserung der Gedächtnisleistung einherging<sup>76-78</sup>. In einem Experiment mit Ratten, die einer fettreichen Diät ausgesetzt waren, konnte zudem gezeigt werden, dass Metformin die durch die Diät verursachte mitochondriale Dysfunktion im Gehirn erfolgreich wiederherstellte<sup>79</sup>. Dies war ebenfalls mit einer Verbesserung der hippocampusabhängigen Lern- und Gedächtnisleistungen vergesellschaftet<sup>79</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass Metformin signifikant die Neuroinflammation reduzieren und den Verlust von Neuronen im Hippocampus

diabetischer Mäuse verringern kann, was wiederum zu Verbesserungen des räumlichen Gedächtnisses führte<sup>80</sup>. In einem Versuch mit Ratten konnte außerdem gezeigt werden, dass Metformin die kognitiven Fähigkeiten bei Ratten mit metabolischem Syndrom verbesserte, indem es die dendritische Struktur und wichtige Plastizitätsmarker wie BDNF im Hippocampus erhöhte<sup>81</sup>. Daraus schlossen die Autoren, dass Metformin die neuronale Plastizität fördert<sup>81</sup>.

### **2.3.3 Einsatz von Metformin in der Schwangerschaft**

Auch in der Schwangerschaft kann die Einnahme von Metformin erforderlich sein. Unter Umständen werden Schwangere mit bereits vor der Schwangerschaft bestehendem Diabetes mellitus Typ 2 mit Metformin behandelt, aber auch beim Polyzystischen Ovarialsyndrom und bei Gestationsdiabetes kommt Metformin in der Schwangerschaft zum Einsatz<sup>82</sup>. Das Polyzystische Ovarialsyndrom wird mit einer systemischen Insulinresistenz in Verbindung gebracht, die als eine der Ursachen für Unfruchtbarkeit oder eine erschwerte Empfängnis bei den Betroffenen angesehen wird<sup>82</sup>. Daher wird Metformin, aufgrund seiner Fähigkeit, die Insulinsensitivität zu erhöhen, eingesetzt, um den Eisprung zu fördern und den Verlauf der Schwangerschaft zu unterstützen<sup>82</sup>. Die Einnahme von Metformin erfolgt daher bereits vor der Schwangerschaft und kann unter Umständen bis zur Geburt fortgesetzt werden<sup>82</sup>. Der Einsatz von Metformin bei Gestationsdiabetes erfolgt in Deutschland im Vergleich zu anderen Ländern eher restriktiv. Während Metformin in Großbritannien durch das National Institute for Health and Care Excellence (NICE) als Erstlinientherapie bei Gestationsdiabetes empfohlen wird, wenn Lebensstilinterventionen nicht den gewünschten Erfolg erzielen, wird Metformin in Deutschland von der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) und der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) in der S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus nur bei Verdacht auf eine starke Insulinresistenz und bei hohem Insulinbedarf als Therapie in Erwägung gezogen<sup>83,84</sup>.

### **2.3.4 Auswirkungen einer maternalen Metformintherapie während der Schwangerschaft auf den Nachwuchs**

Der restriktive Einsatz von Metformin in Deutschland bei Gestationsdiabetes dürfte nicht zuletzt daran liegen, dass bekannt ist, dass Metformin die Plazenta ungehindert passiert und der fetale Serumspiegel von Metformin mit den mütterlichen Serumspiegel vergleichbar ist, sodass die Föten einer therapeutischen Medikamentenkonzentration ausgesetzt sind<sup>85</sup>. Eine Metastudie, die den Einsatz von Metformin im Vergleich zu Insulin bei Gestationsdiabetes oder Diabetes mellitus Typ 2 während der Schwangerschaft untersuchte, ergab, dass Metformin signifikant das Risiko für neonatale Hypoglykämien, Neugeborene mit einem Gewicht über der 90. Perzentile, Schwangerschaftshypertonie und eine Gewichtszunahme der Mutter während

der Schwangerschaft verringerte<sup>86</sup>. Negative Auswirkungen für das Neugeborene durch eine Metformintherapie, wie ein erhöhtes Risiko einer Frühgeburtlichkeit oder eine erhöhte perinatale Mortalität, konnten in dieser Metastudie nicht festgestellt werden<sup>86</sup>.

In einer Studie von Rowan et al., die sich mit den langfristigen Folgen einer maternalen Metformintherapie bei Gestationsdiabetes befasste, wurde festgestellt, dass Kinder, die während der Schwangerschaft der Metformintherapie ihrer Mütter ausgesetzt waren, im Alter von 2 Jahren einen erhöhten subkutanen Fettanteil aufwiesen<sup>87</sup>. Im Vergleich zu Kindern von Müttern, die mit Insulin behandelt wurden, zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtkörperfettmasse und dem Körperfettanteil<sup>87</sup>. In einer nachfolgenden Studie berichteten Rowan et al. anschließend, dass Kinder im Alter von 9 Jahren, die während der Schwangerschaft Metformin ausgesetzt waren, höhere Werte für Gewicht, BMI und Taillenumfang aufwiesen<sup>88</sup>. Auch im Alter von 18 Monaten konnte bei Kleinkindern, deren Mütter während der Schwangerschaft wegen Gestationsdiabetes mit Metformin behandelt worden waren, ein höheres Körpergewicht im Vergleich zu den Kindern festgestellt werden, deren Mütter mit Insulin behandelt wurden<sup>89</sup>. In Bezug auf die motorische, soziale und sprachliche Entwicklung zeigten sich mit 18 Monaten keine Unterschiede<sup>89</sup>. Auch mit 2 Jahren wiesen Kinder, deren Mütter mit Metformin behandelt wurden, keine Auffälligkeiten in der neurologischen Entwicklung im Vergleich zu Kindern, deren Mütter mit Insulin behandelt wurden, auf<sup>90</sup>. Es gibt bereits Studien, die die Einnahme von Metformin bei übergewichtigen und adipösen Schwangeren untersuchen, die nicht aufgrund anderer Gründe einer Metformintherapie bedurften. Eine der größten Doppelblindstudien auf diesem Bereich ist die von Dodd et al. Sie untersuchten den Einfluss von Metformin im Vergleich zu Placebo zusätzlich zu Ernährungs- und Lebensstilberatung bei übergewichtigen und adipösen Schwangeren und fanden dabei keine signifikante Verbesserung der Schwangerschafts- und Geburtsverläufe, einschließlich der Diagnose eines Gestationsdiabetes, der Gesamtgewichtszunahme während der Schwangerschaft oder dem Geburtsgewicht<sup>91</sup>. In einem Follow-up zu dieser Studie wurden die langfristigen Effekte auf die Gesundheit der Kinder bewertet. Diese Untersuchung zeigte, dass bei den Kindern, deren Mütter in der Schwangerschaft Metformin einnahmen, kein Einfluss auf den BMI oder andere Gesundheitsparameter der Kinder im Alter von bis zu fünf Jahren festgestellt werden konnten<sup>92</sup>.

Insgesamt bedarf es jedoch weiterer Langzeitstudien, um mögliche Risiken und Vorteile einer maternalen Metformintherapie während der Schwangerschaft für den Nachwuchs zu beurteilen. Insbesondere gibt es zum jetzigen Zeitpunkt nur wenige Studien, die den Einfluss einer maternalen Metformintherapie bei Übergewicht und Adipositas auf den Nachwuchs untersuchen, sodass weitere Studien erforderlich sind.

## 2.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Mit der weltweit steigenden Prävalenz von Adipositas stellt sich zunehmend die Frage, welche Maßnahmen zur Eindämmung oder Vermeidung der negativen gesundheitlichen Folgen dieser Erkrankung ergriffen werden können. Während maternale Adipositas in der Schwangerschaft negative Auswirkungen auf die hippocampale Funktion und Entwicklung des Nachwuchses haben kann, scheint Metformin Eigenschaften aufzuweisen, die dem entgegenwirken könnten. Derzeit gibt es jedoch nur wenig Forschung, die sich damit beschäftigt, wie sich maternale Adipositas und eine maternale Metformintherapie während der Schwangerschaft auf den Hippocampus des Nachwuchses auswirken. Insbesondere gibt es nur wenige Studien, die sich mit dem fötalen Hippocampus beschäftigen. Um das Wissen auf diesem Gebiet zu erweitern, sollen in dieser Arbeit mittels Mausmodell folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Auswirkungen hat maternale Adipositas während der Schwangerschaft auf das globale hippocampale Proteom weiblicher Föten? Sind insbesondere Proteine, die mit Neuroplastizität, Gedächtnisleistung, oxidativem Stress und mitochondrialer Funktion assoziiert sind, betroffen?
2. Welche Auswirkungen hat eine maternale Metformintherapie während der Schwangerschaft bei adipösen Muttertieren auf das globale hippocampale Proteom weiblicher Föten? Sind insbesondere Proteine, die mit Neuroplastizität, Gedächtnisleistung, oxidativem Stress und mitochondrialer Funktion assoziiert sind, betroffen?
3. Welche Auswirkungen hat eine maternale Metformintherapie während der Schwangerschaft auf das globale hippocampale Proteom weiblicher Föten, unabhängig vom maternalen Gewicht? Sind insbesondere Proteine, die mit Neuroplastizität, Gedächtnisleistung, oxidativem Stress und mitochondrialer Funktion assoziiert sind, betroffen?

Die Untersuchungen beschränken sich ausschließlich auf den weiblichen Nachwuchs, um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede zu vermeiden. Ziel dieser Arbeit ist es, die Erkenntnisse über die Auswirkungen maternaler Adipositas während der Schwangerschaft auf den Hippocampus des Nachwuchses zu erweitern und gleichzeitig den potenziellen Nutzen einer maternalen Metformintherapie in der Schwangerschaft für die hippocampale Funktion und Entwicklung des Nachwuchses zu bewerten.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Enzyme

| Chemikalie / Enzym   | Hersteller   |
|--|--|
| 1,1-Dimethylbiguanid Hydrochlorid (Metformin)                                  | Alfa Aesar, Kandel, Deutschland                        |
| 2-Chloracetamid  | Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA                 |
| 2-Propanol (Isopropanol) $\geq 99,95\%$  | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| 5X Green GoTaq® Flexi Reaction Buffer  | Promega, Madison/Wisconsin, USA                        |
| Acetonitril, 80 %, 20 % Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, Optima LC/MS (Puffer B) | Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA   |
| Agarose  | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                  |
| Ameisensäure $\geq 98\%$ , p. a.   | Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA                 |
| Antibody Diluent   | Dako North America Inc., Carpinteria/Kalifornien, USA  |
| Buprenoret 0,3 mg/ml Injektionslösung (Buprenorphin in 0,9 % Natriumchlorid)   | Bayer, Leverkusen, Deutschland                         |
| cOmplete® Proteaseinhibitor-Tablette   | Roche, Basel, Schweiz                                  |
| D(+)-Saccharose (Sucrose)  | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)   | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| di-Kaliumhydrogenphosphat $\geq 99\%$ , p. a.                                  | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| di-Natriumhydrogenphosphat $\geq 99\%$ , p. a.                                 | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| dNTP-Gemisch (jeweils 10 mM)   | Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA   |
| DTT BioChemica (Dithiothreitol)  | PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland |

|   |  |
|---|--|
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)                                 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                  |
| Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig  | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| Essigsäure 100 %, p. a. (Eisessig)                                  | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| Ethanol vergällt ≥ 99,8 %   | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| Fisch-Serum-Blockierpuffer  | Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA   |
| Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium                                | Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA                 |
| Flüssigstickstoff   | Linde AG, Köln, Deutschland                            |
| GeneRuler 100 bp Plus DNA-Leiter                                    | Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA   |
| GoTaq® Flexi DNA Polymerase   | Promega, Madison/Wisconsin, USA                        |
| GoTaq® qPCR Master Mix  | Promega, Mannheim, Deutschland                         |
| Hämalaunlösung sauer nach Mayer                                     | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| Isopropanol ≥ 99,8 %, p. a.   | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| Liquid Blocker Super Pap Pen  | Daido Sangyo Co., Ltd. Tokio, Japan                    |
| Magnesiumchlorid (25 mM)  | Promega, Madison/Wisconsin, USA                        |
| Midori Green Advance  | Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland        |
| Natriumchlorid (NaCl)   | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland         |
| Neo-Clear®  | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                     |
| Neo-Mount®  | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                     |
| PBS-Puffer (1X Dulbecco's) – Pulver (Phosphatgepufferte Salzlösung) | PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland |

|  |  |
|--|--|
| Proteinase K, > 600 U/ml   | Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham/Massachusetts, USA            |
| Roti ® Histofix phosphatgepuffert (pH 7),<br>(Formaldehydlösung 4 %) | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe,<br>Deutschland                  |
| SDS (Natriumdodecylsulfat)   | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe,<br>Deutschland                  |
| Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound   | Sakura Finetek Europe B.V., AV Alphen<br>aan den Rijn, Niederlande |
| Toluidinblau O   | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe,<br>Deutschland                  |
| TRIS-Hydrochlorid ≥ 99 %, p. a.<br>(Tris(hydroxymethyl)aminomethane) | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe,<br>Deutschland                  |
| Triton™ X-100  | Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA                             |
| Trypsin (1 µg/µl)  | Serva, Heidelberg, Deutschland                                     |

**Tabelle 1: Chemikalien und Enzyme**

### 3.2 Stammlösungen und Puffer

Die Herstellung erfolgte mittels Zusatzes von VE-Wasser, wenn nicht anders angegeben.

| <b>Stammlösung / Puffer</b>  | <b>Zusammensetzung</b>  |
|------------------------------|---|
| Mausschwanz-Lysepuffer       | 100 mM TRIS<br>5 mM EDTA<br>200 mM NaCl<br>0,2 % (v/v) SDS                            |
| PBS<br>pH 7,2                | 8,06 mM di-Natriumhydrogenphosphat<br>1,5 mM di-Kaliumhydrogenphosphat<br>138 mM NaCl |
| PBS-Triton™ X-100 0,3 %      | 0,3 % (v/v) Triton™ X-100 in 1x PBS   |
| SP3-Lysepuffer               | 5 % (m/v) SDS in 1x PBS   |
| Sucroslösung 20 %            | 20 % (m/v) Sucrose in Milli-Q®-Wasser   |
| TAE-Puffer (50x)<br>pH 8,0   | 2 M TRIS<br>0,05 M EDTA<br>Essigsäure (variabel, pH-abhängig)                         |
| Toluidinblau-Färbelösung 1 % | 1 % (w/v) Toluidinblau in Milli-Q®-Wasser   |

**Tabelle 2: Stammlösungen und Puffer**

### 3.3 Primer

|                           | Primer     | Sequenz (5'-3')       | Hersteller   |
|---------------------------|------------|-----------------------|--|
| X-Chromosom <sup>93</sup> | ZFX-L      | AACATCCTGAACACCTTGCC  | Eurofins<br>Genomics,<br>Ebersberg,<br>Deutschland |
|                           | ZFX-R      | TAGCTTGTGGCTCTCCAGGT  |  |
| Y-Chromosom <sup>93</sup> | YMT/2b_for | CTGGAGCTCTACAGTGATGA  | Eurofins<br>Genomics,<br>Ebersberg,<br>Deutschland |
|                           | YMT/2b_rev | CAGTTACCAATCAACACATCA |  |

Tabelle 3: Primer

### 3.4 Antikörper

Die Verdünnung der Antikörper (Primär- und Sekundärantikörper) erfolgte mittels Antibody Diluent.

| Primärantikörper                             | Spezies   | Bezugsquelle   | Verdünnung für IF |
|--|-----------|--|-------------------|
| Anti-CREB<br>(Artikelnummer: 9198T)          | Kaninchen | Cell Signaling,<br>Danvers/Massachusetts,<br>USA           | 1:1200            |
| Anti-DCX<br>(Artikelnummer: 4604)            | Kaninchen | Cell Signaling<br>Danvers/Massachusetts,<br>USA            | 1:300             |
| Anti-GFAP<br>(Artikelnummer: SMI-22R)        | Kaninchen | Covance, Princeton/New<br>Jersey, USA                      | 1:200             |
| Anti-GluR1<br>(Artikelnummer: PA1-<br>46151) | Kaninchen | Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham/Massachusetts,<br>USA | 1:200             |
| Anti-NCoR1<br>(Artikelnummer: PA1-844A)      | Kaninchen | Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham/Massachusetts,<br>USA | 1:200             |
| Anti-NCoR2<br>(Artikelnummer: PA1-843)       | Kaninchen | Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham/Massachusetts,<br>USA | 1:100             |
| Anti-VGLUT2<br>(Artikelnummer: 135 403)      | Kaninchen | Synaptic Systems GmbH,<br>Göttingen, Deutschland           | 1:300             |

Tabelle 4: Primärantikörper

| <b>Sekundärantikörper</b>  | <b>Spezies</b> | <b>Bezugsquelle</b>                   | <b>Verdünnung für IF</b> |
|--|----------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Cy <sup>TM</sup> 3 AffiniPure <sup>TM</sup> Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), (Anti-Kaninchen IgG, Cyanin 3), (Artikelnummer: 111-165-003) | Ziege          | Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK | 1:500                    |

**Tabelle 5: Sekundärantikörper**

### 3.5 Geräte

| <b>Gerät</b>                            | <b>Hersteller</b>                                     |
|---|---|
| 5424R (Zentrifuge)                      | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                       |
| Analysewaage Precisa ES 320A            | Precisa, Dietikon, Schweiz                            |
| BioDocAnalyse UV-Transilluminator       | Biometra, Jena, Deutschland                           |
| Biometra TOne Thermocycler              | Biometra, Jena, Deutschland                           |
| Bioruptor®                              | Diagenode, Ougrée, Belgien                            |
| BX43-Mikroskop mit der DP80-Kamera      | Olympus, Hamburg, Deutschland                         |
| EASY nLC 1000 Flüssigkeitschromatograph | Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA  |
| Elektrophorese-Kammer MIDI PLUS         | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland        |
| Gefrierschrank MDF-U55V                 | Panasonic Marketing Europe GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Heizblock Thermostat                    | HLC - Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland       |
| Kryostat Leica CM3050 S                 | Leica, Wetzlar, Deutschland                           |
| LCM-Mikroskop LMD7000                   | Leica, Wetzlar, Deutschland                           |
| peqPOWER 300 Spannungsquelle            | VWR International, Darmstadt, Deutschland             |
| Pipettierhelfer accu-jet® pro           | BRAND GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland             |

|   |   |
|---|---|
| Q Exactive™ Plus Orbitrap<br>Massenspektrometer | Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham/Massachusetts, USA |
| Trockenschrank UM 100                           | Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach,<br>Deutschland        |
| U-HGLGPS Fluoreszenzlichtquelle                 | Olympus, Hamburg, Deutschland                           |
| Vortex-Mixer V-1 Plus                           | Kisker Biotech, Steinfurt,<br>Deutschland               |

**Tabelle 6: Geräte**

### 3.6 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

| <b>Material</b>  | <b>Hersteller</b>                                       |
|--|---|
| Adhäsionsobjektträger Superfrost® Plus                               | Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham/Massachusetts, USA |
| Deckglas (24 x 40 mm / 24 x 50 mm / 24 x 60 mm)                      | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe,<br>Deutschland       |
| Ersatzschnittstrecker (Glaseinsatz) 70 mm                            | Leica, Wetzlar, Deutschland                             |
| Faltenfilter ROTILABO® Typ 113P                                      | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe,<br>Deutschland       |
| Färbekasten nach Hellendahl mit Erweiterung                          | Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe,<br>Deutschland       |
| InfinityLab Poroshell 120 EC-C18<br>(Flüssigchromatographiesäule)    | Agilent, Santa Clara, Kalifornien,<br>USA               |
| Mikrotomklinge C35   | FEATHER Safety Razor Co., Osaka,<br>Japan               |
| Pastette® (Pasteurpipette)   | Alpha Laboratories Ltd., Eastleigh, UK                  |
| PEN-Membran-Objektträger (4 µm;<br>Artikelnummer: 11600288)          | Leica, Wetzlar, Deutschland                             |
| Pipetten (3er Set: 0,5 bis 10 µl, 10 bis 100 µl,<br>100 bis 1000 µl) | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                         |
| Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl; nicht<br>gestopft)          | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht,<br>Deutschland         |
| Reaktionsgefäß (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)                        | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                         |

|            |                             |
|------------|-----------------------------|
| Trockeneis | Linde AG, Köln, Deutschland |
|------------|-----------------------------|

**Tabelle 7: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien**

### 3.7 Software und Datenbanken

| Software / Datenbank              | Hersteller  |
|-----------------------------------|---|
| BioDocAnalyze                     | Biometra, Jena, Deutschland   |
| cellSens Dimension Version 1.8    | Olympus, Hamburg, Deutschland   |
| FunRich Version 3.1.3             | <a href="http://funrich.org">http://funrich.org</a> <sup>94</sup> (zuletzt abgerufen am 19.02.2024)           |
| MaxQuant Version 1.5.3.8          | Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland   |
| Microsoft Excel Microsoft         | Microsoft, München, Deutschland   |
| Perseus Version 1.6.1.1           | Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland   |
| RStudio Version 1.3.1093          | RStudio, Boston/Massachusetts, USA  |
| STRING Database Version 12.0      | <a href="https://string-db.org">https://string-db.org</a> <sup>95</sup> (zuletzt abgerufen am 19.02.2024)     |
| UniProt Knowledgebase (UniProtKB) | <a href="https://www.uniprot.org">https://www.uniprot.org</a> <sup>96</sup> (zuletzt abgerufen am 19.02.2024) |

**Tabelle 8: Software und Datenbanken**

### 3.8 Mausmodell

Die durchgeführten Versuche entsprachen alle den Vorschriften des Tierhaltungsnetzwerks der Universität zu Köln und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW genehmigt (Tierversuchsantrag 84-02.04.2016.A046). Der Versuchsaufbau wurde bereits durch die Arbeitsgruppe Appel in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Nüsken 2019 veröffentlicht<sup>93</sup>, sodass im Folgenden immer wieder auf diese Publikation verwiesen wird.

### 3.8.1 Tierhaltung und Versuchsdiäten

In den Tierhaltungsräumen des Zentrums für Pharmakologie an der Universität zu Köln wurden die bei Ankunft 3 Wochen alten weiblichen Versuchsmäuse (C57BL/6N; Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) gehalten. Dabei erfolgte die Unterbringung der Versuchstiere zu je 3 - 5 Tieren in einzeln belüfteten Tierkäfigen (IVCs Blue Line, Tecniplast Italien). Die Käfigtemperatur betrug durchgehend  $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , die relative Luftfeuchtigkeit betrug konstant 50 - 60 %. Die Tiere wurden täglich bei 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit gehalten. Die 3 Wochen alten weiblichen Mäuse wurden entweder mit einer Standarddiät (SD; R/M-H ssniff®, Soest, Deutschland) oder einer Hochfettdiät (HFD; C1057 modified, Altromin, Lage, Deutschland) gefüttert. Die Entscheidung darüber, welches Tier welches Futter erhielt, erfolgte zufällig. Eine vergleichende Übersicht der beiden Diäten und ihrer metabolischen Energie und Makronährstoffe ist in Tabelle 9 dargestellt. Das jeweilige Futter stand den Tieren dabei ab der 3. Lebenswoche allzeit zur Verfügung.

|  | <b>SD</b>                      | <b>HFD</b>                     |
|--|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>Hersteller</b>                          | ssniff®, Soest,<br>Deutschland | Altromin, Lage,<br>Deutschland |
| <b>Bestellnummer</b>                       | R/M-H                          | C1057 modified                 |
| <b>Metabolische Energie (ME) [kcal/kg]</b> | 3225                           | 5237                           |
| <b>Fett [% der ME]</b>                     | 9                              | 60                             |
| <b>Protein [% der ME]</b>                  | 33                             | 16                             |
| <b>Kohlenhydrate [% der ME]</b>            | 58                             | 24                             |

Tabelle 9: Vergleichende Darstellung der Zusammensetzung der SD und HFD<sup>97</sup>

### 3.8.2 Verpaarung und Metforminintervention

Um eine Schwangerschaft der Weibchen zu erzielen, wurden diese im Alter von 12 - 16 Wochen für ca. 16 Stunden mit männlichen Mäusen verpaart. Die männlichen Mäuse wurden ausschließlich mit der SD ernährt, mit Ausnahme der Verpaarungsnacht, in der sie abhängig von der im Käfig des Weibchens vorhandenen Nahrung gegebenenfalls die HFD erhielten. Voraussetzung für die Verpaarung war, dass die weiblichen HFD-Tiere mindestens 23,5 g wogen, die weiblichen SD-Tiere mussten leichter als 23,5 g sein.

Am Tag nach der Verpaarung, Gestationstag (G) 0,5, wurde anschließend zufällig ausgewählt, welche Weibchen während der gesamten Schwangerschaft Metformin (380 mg/kg Körpergewicht/Tag) über das Trinkwasser erhielten (SD+MF bzw. HFD+MF) und welche nicht (SD bzw. HFD). Die zuvor bereits in der 3. Lebenswoche begonnene Art der Ernährung (SD bzw. HFD) wurde während der Schwangerschaft nicht geändert.

### 3.8.3 Tötung und Probenvorbereitung

Am G18,5 wurden die Muttertiere und Föten getötet, nachdem den Muttertieren 30 Minuten zuvor eine subkutane Injektion von Buprenorphin (0,1 mg/kg Körpergewicht) zur Sedierung verabreicht worden war, gefolgt von der Tötung mittels Kohlenstoffdioxid-Inhalation. Die Föten wurden per Kaiserschnitt dem Muttertier entnommen, durch Dekapitation getötet und anschließend gewogen. In dieser Arbeit wurden nur Würfe mit mindestens 5 lebensfähigen Nachkommen in die Analysen einbezogen. Die Hälfte der Fötenköpfe wurde in Tissue-Tek®O.C.T.™ Compound gelegt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C kryokonserviert, um anschließend für den Proteomic Screen genutzt zu werden. Die restlichen Köpfe, die für die Immunfluoreszenz genutzt wurden, wurden zunächst für 24 Stunden bei 4 °C in 4%iger Formaldehydlösung fixiert und anschließend für weitere 24 Stunden in 20%iger Sucroselösung entwässert. Nach der Entwässerung wurden die Köpfe in Tissue-Tek®O.C.T.™ Compound auf Trockeneis eingefroren und ebenfalls bei -80 °C gelagert. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus ist in der Abbildung 1 (Abb. 1) dargestellt. Da in dieser Studie ausschließlich weibliche Föten einbezogen werden sollten, erfolgte eine Bestimmung des Geschlechtes der einzelnen Föten (s. Kapitel 3.9).

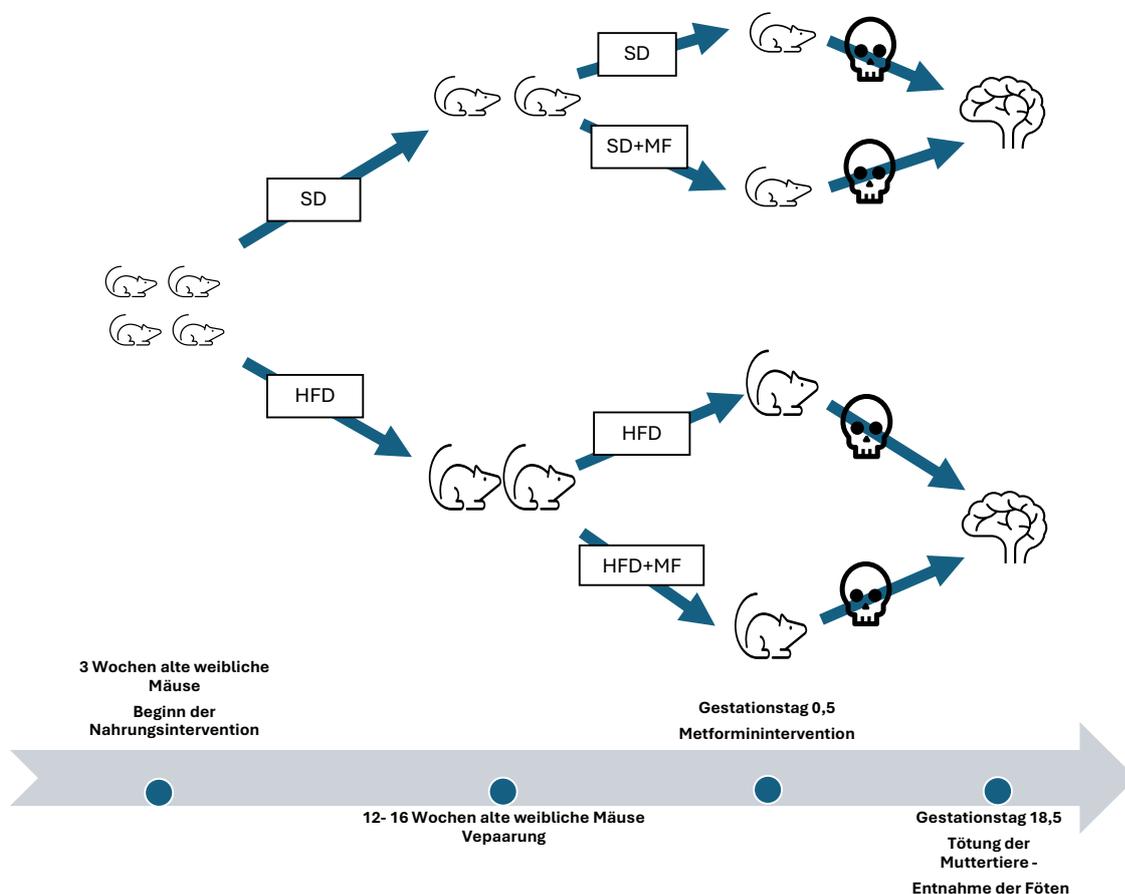


Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Die 3 Wochen alten weiblichen Mäuse wurden mit einer HFD oder einer SD ernährt, in der Woche 12 - 16 erfolgte die Verpaarung. Anschließend erhielt ein Teil der Mäuse aus beiden Gruppen (HFD bzw. SD) randomisiert ab Gestationstag (G)0,5 Metformin während der gesamten Schwangerschaft (HFD+MF bzw. SD+MF). Die in der 3. Woche begonnene Diät wurde in der Schwangerschaft beibehalten. Am G18,5 erfolgte schließlich die Tötung der Mäuse und die Entnahme der Föten. Nach der Geschlechtsbestimmung der Föten wurden die Gehirne der weiblichen Föten für alle weiteren Experimente genutzt.

### **3.9 Bestimmung des Geschlechts der Föten mittels PCR**

#### **3.9.1 DNA-Isolation**

Zu Beginn der Geschlechtsbestimmung wurden zunächst DNA-Isolationen aus den Schwanzspitzen der Föten durchgeführt. Dies erfolgte basierend auf der Methode von Wang et al.<sup>98</sup> Nach Entnahme der Föten aus dem Mutterleib wurde ein Stück der Schwanzspitze der Föten abgetrennt. Die DNA wurde durch Lysieren des Schwanzgewebes in 500 µl Mausschwanz-Lysepuffer und Zugabe von 5 µl Proteinase K über Nacht bei 55 °C auf einem Schüttler bei 500 Schüttlungen/Minute verdaut.

Am folgenden Tag wurde die DNA mittels 500 µl Isopropanol ausgefällt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und durch 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15700 x g gesammelt. Anschließend erfolgte eine Waschung mit 500 µl auf -20 °C vorgekühltem 70%igem Ethanol. Der nach der Zentrifugation entstandene Überstand wurde verworfen. Es erfolgte schließlich eine erneute Zentrifugation bei 4 °C und 15700 x g für 10 Minuten, der Überstand wurde schließlich erneut abpipettiert und verworfen und das DNA-Pellet auf einem Heizblock für etwa 10 Minuten bei 55 °C getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl Milli-Q®-Wasser aufgelöst und über Nacht bei 4 °C gelagert. Für die Genotypisierung erfolgte anschließend eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

#### **3.9.2 PCR**

Mittels der PCR lassen sich bestimmte DNA-Sequenzen gezielt vervielfältigen. Da die PCR eine seit Jahrzehnten in der Mikrobiologie etablierte Methode ist, existieren bereits zahlreiche Publikationen zu dieser Methode. Im Folgenden wird dabei der Ablauf modifiziert nach der Publikation von Saiki et al.<sup>99</sup> aus dem Jahre 1988 wiedergegeben. Zu Beginn der PCR erfolgt die Denaturierung, bei derer die doppelsträngige DNA in 2 Einzelstränge aufgetrennt wird. Anschließend erfolgt die Primerhybridisierung, bei der sich die Primer am 3'- und 5'-Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts anlagern. Abschließend erfolgt die Elongation mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase, die ausgehend von den Primern synthetische komplementäre Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) anfügt, um somit einen neuen komplementären DNA-Strang zu bilden. Diese Schritte werden wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Amplifikation der entsprechenden DNA-Sequenz kommt.

Die DNA-Bereiche, die für die Geschlechtsbestimmung von Interesse sind, sind Bereiche, die auf den Geschlechtschromosomen X und Y liegen. Für die PCR wurden pro Probe 1 µl der isolierten DNA mit 9 µl GoTaq® qPCR Master Mix gemischt, wobei sich der Master Mix wie folgt zusammensetzt:

- 4,9 µl Milli-Q®-Wasser
- 1,2 µl Magnesiumchlorid (25 mM)
- 0,2 µl dNTPs (je 10 mM)
- 0,1 µl GoTaq® Flexi DNA Polymerase
- 5x GoTaq® Flexi Reaction Buffer (2 µl)
- 0,4 µl des jeweiligen Primers (je 10 µM)

Die Fragmente des X- (104 bp) und bei männlichen Tieren zusätzlich des Y-Chromosoms (344 bp) wurden entsprechend des oben beschriebenen Ablaufs automatisiert in einem Thermocycler vervielfältigt: Initial wurde die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 3 Minuten durchgeführt, an die sich dann 35 Zyklen des folgenden Vorgehens anschlossen: Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden, Primerhybridisierung bei 58 °C für 1 Minute, Elongation bei 72 °C für 1 Minute. An diese 35 Zyklen folgte ein letzter Elongationsschritt bei 72 °C für 10 Minuten und schließlich die Lagerung der amplifizierten DNA bei 4 °C. Zur abschließenden Bestimmung des Geschlechts erfolgte daraufhin eine Agarose-Gelelektrophorese.

### 3.9.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der amplifizierten DNA und zur Geschlechtsbestimmung anhand der Fragmentgrößen wurde eine nach Smith<sup>100</sup> modifizierte Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die zuvor vervielfältigten DNA-Abschnitte in einem 1,5%igen Gel bestehend aus 1,5 g Agarose-Pulver und 100 ml 1x TAE-Puffer ihrer Basenpaarlänge nach aufgetrennt. Um die Banden anschließend unter ultraviolettem Licht sichtbar zu machen, wurden dem Gel zudem 6 µl des Farbstoffs Midori Green Advance beigegefügt. Die zuvor vervielfältigte DNA (je Probe 8 µl des PCR-Ansatzes) wurde innerhalb des Gels einer elektrischen Spannung von 120 V für etwa eine halbe Stunde ausgesetzt. Die negativ geladene DNA wanderte daraufhin abhängig von der Größe der Basenpaare in Richtung Anode. Kleinere DNA-Fragmente bewegten sich dabei schneller durch das Gel als größere, wodurch eine Trennung der DNA-Fragmente basierend auf ihrer Größe resultierte. Um die jeweilige Größe der Banden bestimmen zu können, wurde in einer Geltasche 8 µl einer DNA-Leiter auf das Gel aufgetragen. Entsprechend der verschiedenen Größen der DNA-Abschnitte entstanden charakteristische Banden im Gel, die eine Geschlechtsbestimmung ermöglichten. Mithilfe des BioDocAnalyze UV-Transilluminators und der Software *BioDocAnalyze* konnten die Banden anschließend detektiert und fotografiert werden.

## **3.10 Immunhistologie**

### **3.10.1 Schneiden**

Nach der Präparation der Köpfe für die Immunfluoreszenz (s. Kapitel 3.8.3) wurden die Köpfe in einem Kryostat bei -21 °C in koronarer Ebene in 16 µm dicke Schnitte geschnitten. Diese Schnitte wurden auf den Adhäsionsobjektträgern Superfrost® Plus fixiert (pro Objektträger 3 Schnitte) und erneut bei -80 °C gelagert. Jeder 10. Schnitt wurde einzeln auf einem Objektträger fixiert und mit einer Hämatoxylin- und Eosinfärbung (HE-Färbung; s. Kapitel 3.10.2) gefärbt, um eingrenzen zu können, auf welchen Objektträgern sich der Hippocampus befand.

### **3.10.2 HE-Färbung**

Zweck der HE-Färbung war es, eine Übersicht darüber zu erhalten, in welchem Abschnitt des Gehirns man sich bei welchen Schnitten befand. Dafür wurde modifiziert nach Feldman et al.<sup>101</sup> vorgegangen. Vor der Färbung wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37 °C in einem Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurden sie 15 Minuten in phosphatgepufferter Formaldehydlösung fixiert und dann 3-mal für je eine Minute in VE-Wasser gestellt.

Daraufhin erfolgte die Färbung mittels der Hämalaunlösung sauer nach Mayer. Diese wurde zuvor gefiltert. Nachdem die Schnitte für 3 Minuten im Hämatoxylin gefärbt wurden, erfolgte 5 Minuten lang das Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte erneut für 1 Minute in VE-Wasser gestellt. Danach erfolgte die Färbung mittels der 0,5%igen Eosin G-Lösung für 1,5 Minuten. Auch das Eosin wurde im Voraus gefiltert. Zudem wurde dem Eosin im Voraus mittels Pasteurpipette ein Tropfen Eisessig (ca. 50 µl) pro 100 ml hinzugefügt. Schließlich erfolgte eine Entwässerung der Schnitte. Dafür wurden die Objektträger für je eine Minute in 70%iges, 80%iges, 96%iges und 100%iges Ethanol gestellt. Als letzten Schritt, bevor die Schnitte mit einem Tropfen Neo-Mount® und einem Deckglas eingedeckt wurden, wurden diese 2-mal für je 5 Minuten in Neo-Clear® gestellt. Schließlich wurden die Schnitte zum Trocknen des Neo-Mounts® über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Die Schnitte wurden anschließend am Olympus BX43 Mikroskop mikroskopiert.

### **3.10.3 Immunfluoreszenzfärbung**

Da Immunfluoreszenzfärbungen des Hippocampus bereits in kooperierenden Arbeitsgruppen etabliert sind, wurde im Folgenden modifiziert nach Schmitz et al.<sup>62</sup> vorgegangen. Vor Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Schnitte für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 3-mal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte für eine halbe Stunde in einer Lösung aus 0,3 % Triton™ X-100 in PBS permeabilisiert. Nach dem 2-stündigen Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen mittels Fisch-Serum-Blockierpuffer wurden die Proben mit den

in Antibody Diluent verdünnten Primärantikörpern (s. Tabelle 4) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine erneute Waschung in PBS (3-mal für je 5 Minuten). Schließlich wurden die Proben bei Raumtemperatur für eine Stunde im Dunkeln mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (verdünnt in Antibody Diluent) inkubiert, sprich mit dem Anti-Kaninchen-IgG Cy3. Die Schnitte wurden schließlich in PBS gespült (3-mal für je 10 Minuten) und für 15 Minuten mit DAPI (1:1000 in Antikörper Diluent) gefärbt. Die Färbung mittels DAPI erfolgte, um Zellkerne gezielt zu markieren. Letztlich erfolgte eine finale Waschung mittels PBS (3-mal für je 10 Minuten), gefolgt von einem kurzen Eintauchen in VE-Wasser.

Abschließend wurden die Schnitte mittels Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium und einem Deckglas eingedeckelt und über Nacht getrocknet und weiterhin bei 4 °C gelagert. Am folgenden Tag wurden schließlich Fluoreszenzbilder mittels des BX43-Mikroskops und der Software *cellSens Dimension* aufgenommen.

### **3.11 Proteomic Screen**

Auch die nativ kryokonservierten Köpfen, welche für den Proteomic Screen genutzt wurden, wurden zu Beginn im Kryostat bei -21 °C in koronarer Ebene in 16 µm dicke Schnitte geschnitten. Die resultierenden Schnitte wurden auf PEN-Membran-Objektträgern fixiert. Dabei wurden pro Objektträger 3 Schnitte fixiert. Jeder 10. Schnitt wurde separat auf einem Adhäsionsobjektträger Superfrost® Plus fixiert und mit einer HE-Färbung (s. Kapitel 3.10.2) gefärbt. Durch diese Vorgehensweise konnten die Schnitte identifiziert werden, die den Hippocampus enthielten. Somit wurde bestimmt, welche der Schnitte auf den PEN-Membran-Objektträgern für die Lasermikrodissektion von Bedeutung waren.

#### **3.11.1 Toluidinblau-Färbung**

Nach der Beurteilung der HE-Färbung am Mikroskop konnte ermittelt werden, auf welchen PEN-Membran-Objektträgern sich der Hippocampus befand. Die Schnitte auf den PEN-Membran-Objektträgern wurden mit einer Toluidinblau-Färbung gefärbt, modifiziert nach Richart<sup>102</sup>. Ziel dieser Färbung war es, eine präzise Zuordnung der einzelnen Hirnareale, insbesondere des Hippocampus, unter dem LCM-Mikroskop zu ermöglichen.

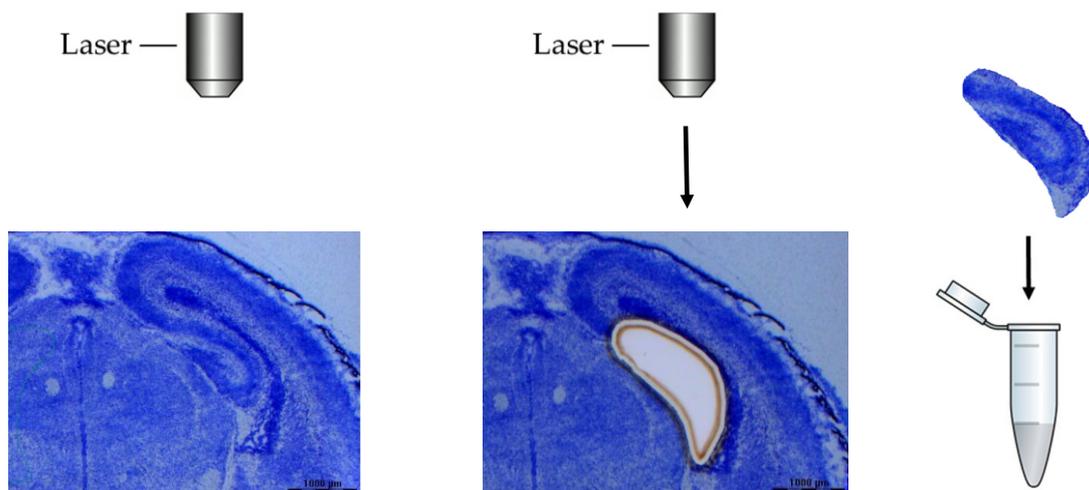
Als erstes wurden die Objektträger für eine Minute zur Fixierung in 50 ml eines Gemisches bestehend aus 70%igem Ethanol (4 °C) und einer cOmplete® Proteaseinhibitor-Tablette gestellt. Anschließend folgte eine 10-sekündige Waschung in VE-Wasser. Daraufhin erfolgte die einminütige Färbung in 1%igem Toluidinblau und schließlich wurden die Schnitte erneut für eine Minute in VE-Wasser gewaschen. Danach wurden die Objektträger für 30 Sekunden

in 70%iges Ethanol gestellt und für mindestens 30 Minuten luftgetrocknet. Die Schnitte wurden schließlich bis zum Mikroskopieren und Lasern bei -80 °C gelagert.

### 3.11.2 Lasermikrodissektion

Die Schritte der Lasermikrodissektion wurden bereits wie oben erwähnt vorab in einer Publikation der AG Appel und der AG Nüsken publiziert<sup>93</sup>. Vor dem Lasern wurden die Toluidinblau-gefärbten Schnitte für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Objektträger mit den luftgetrockneten Schnitten wurden schließlich in den Objektträgerhalter des LCM-Mikroskops fixiert. Die Einstellungen des LCM-Mikroskops waren folgende: Leistung – 38; Blende – 2; Geschwindigkeit – 4

Unter die Schnitte wurde dabei ein 200 µl-Mikroreaktionsgefäß befestigt, sodass die ausgelaserten Stücke des Hippocampus direkt in den Deckel des Mikroreaktionsgefäßes fielen. Alle Schnitte, auf denen der Hippocampus erkennbar war (pro Kopf ca. 20 Objektträger, à 3 Schnitte), wurden pro Kopf gelasert. Ein Beispiel, wie ein Schnitt vor und nach dem Lasern des Hippocampus aussah, ist in Abb. 2 dargestellt. Schließlich wurden die Mikroreaktionsgefäße, die den ausgelaserten Hippocampus enthielten, aus der Halterung entfernt und bei -80 °C gelagert.



**Abb. 2: Exemplarische Darstellung der Lasermikrodissektion**

Nachdem die Hirnpräparate der weiblichen Föten am Kryostat bei -21 °C in 16 µm dicke Schnitte geschnitten wurden, erfolgte eine Färbung mittels Toluidinblau. Nach etwa einstündiger Lufttrocknung der Objektträger bei Raumtemperatur wurden die Objektträger unter dem LCM-Mikroskop fixiert und die Hippocampi wurden ausgelasert. Die ausgelaserten Hippocampi wurden direkt in einem Mikroreaktionsgefäß aufgefangen, das unter dem Objektträger befestigt war und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.11.3 Proteinextraktion

Nachdem alle Hippocampi der Köpfe gelasert wurden, wurde zur Proteinextraktion nach dem "single-pot, solid-phase-enhanced sample-preparation"(SP3)-Protokoll<sup>103</sup> gearbeitet. Das

erfolgte für alle Proben zeitgleich. Dabei wurde zu jeder Probe 30 µl SP3-Lysepuffer hinzugefügt, schließlich erfolgte eine 10-minütige Erhitzung der Proben auf 95 °C und eine Fragmentierung des Chromatins mittels eines Bioruptors® (10 Minuten lang in einem 30/30 Sekunden-Zyklus). Diesem Schritt folgte dann die Reduzierung der Proben durch Zugabe von DTT (Endkonzentration 5 mM). Die Proben wurden nach Zugabe des DTT gevortext. Schließlich folgte eine Inkubationszeit von einer halben Stunde bei 55 °C. Dann erfolgte die Alkylierung mittels Chloracetamid (Endkonzentration 40 mM). Die Proben wurden nach Hinzugabe des Chloracetamids erneut gevortext und schließlich im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Die gesammelten Proben wurden anschließend durch die Protease Trypsin (Enzym-Substrat-Verhältnis 1:75) verdaut. Dafür wurden die Proben über Nacht bei 37 °C mit Trypsin inkubiert. Die Proben wurden danach bei -20 °C gelagert, bevor die Massenspektrometrie durch die Proteomics Core Facility des CECAD durchgeführt wurde.

#### **3.11.4 Massenspektrometrie**

Für die Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) wurden ein Q Exactive Plus Orbitrap Massenspektrometer und ein EASY nLC 1000 Flüssigkeitschromatograph gekoppelt. Die Peptide wurden mit einer Lösung A (0,1 % Ameisensäure in VE-Wasser) auf eine Analysensäule (50 cm - 75 µm Innendurchmesser, gefüllt mit 2,7 µm Poroshell 120 EC-C18) geladen. Anschließend erfolgte die chromatografische Auftrennung bei einer konstanten Flussrate von 250 nl/min unter Nutzung folgender Gradienten:

- 1 Minute Gradient von 3 - 5 % Puffer B (0,1 % Ameisensäure in 80 % Acetonitril)
- 119 Minuten 5 - 30 % Puffer B
- 19 Minuten 30 - 50 % Puffer B
- 1 Minute 50 - 95 % Puffer B

Anschließend erfolgten das Waschen und ein Equilibrieren der Säule. Verwendet wurde am Massenspektrometer die datenabhängige Akquisition. Das Auflösungsvermögen des MS1 Scans betrug 70000 und hatte einen Scanbereich von 300 – 1750 m/z. Die 10 am häufigsten vorkommenden Peptide wurden innerhalb eines 2,1-Th-Fensters isoliert und die Peptide wurden einer HCD-Fragmentierung bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 27 % ausgesetzt. Es erfolgte eine maximale Injektionszeit von 60 Millisekunden, weil das AGC-Ziel auf 5e5 Ladungen eingestellt war. Die resultierenden Ionen wurden anschließend im Orbitrap mit einer Auflösung von 17500 ermittelt. Der dynamische Ausschluss von Vorläufern erfolgte für 25 Sekunden<sup>93</sup>.

### 3.11.5 Analyse und Auswertung der massenspektrometrischen Daten

Die Analyse der in der Massenspektrometrie gewonnenen Rohdaten wurde mithilfe der frei zur Verfügung stehenden Software *Maxquant* unter Standardeinstellungen durch Mitarbeitende der CECAD Proteomics Facility weiter analysiert. Es erfolgte dabei ein Abgleich mit der *UniProt Knowledgebase* Datenbank, die zudem eine Liste der gängigsten Kontaminationen enthält. Die Falscherkennungsraten („false discovery rates“) von Proteinen und Peptiden wurden vom „target-decoy approach“ auf 1 % geschätzt. In der Analyse wurden nur Peptide mit einer Mindestlänge von sieben Aminosäuren berücksichtigt, Carbamidomethylierungen an Cysteinresten wurden als fixe Modifikation betrachtet und Oxidation und Acetylierung als variable Modifikationen. Außerdem wurden noch die Einstellungen „match-between runs“ und „label-free quantification“ (LFQ) aktiviert für die Bestimmung der Proteinmenge in den Proben. Die weitere Analyse erfolgte mit dem Programm *Perseus*. Dazu wurden die LFQ-Werte log<sub>2</sub>-transformiert und Proteine, die als „potential contaminants“, „reverse“ oder „only identified by site“ markiert waren, wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen<sup>93</sup>. Bei der Analyse wurden folgende Gruppen verglichen: 1. HFD vs. SD; 2. HFD+MF vs. HFD; 3. SD+MF vs. SD. Für jedes Protein wurde ein doppelter t-Test vorgenommen, um statistisch signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) festzustellen. Um die Anzahl an falsch-positiven Ergebnisse zu reduzieren, wurden die p-Werte mithilfe der Benjamini–Hochberg-Prozedur<sup>104</sup> korrigiert, woraus sich die q-Werte ergaben. Dabei gilt ein q-Wert von  $< 0,05$  als statistisch signifikant. Darüber hinaus wurde mittels der valid values die Häufigkeit bestimmt, mit der ein Protein innerhalb der jeweiligen Vergleichsgruppe nachgewiesen wurde.

Zusätzlich wurde mittels *Perseus* eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, um eine mögliche Clusterbildung zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen festzustellen und mögliche Ausreißer zu identifizieren. Darüber hinaus wurden mithilfe der Software *RStudio* Volcano Plots generiert, um eine übersichtliche Darstellung aller erfassten Proteine zu ermöglichen und in den Gruppenvergleichen unter anderem signifikant (q-Wert  $< 0,05$ ) und relevant (Fold-Change von  $\geq 1,5$ ) veränderte Proteine zu visualisieren. Zur Darstellung der Proteine, die in mehreren Gruppenvergleichen verändert wurden, wurde ein Venn-Diagramm erstellt. Dieses Diagramm zeigt die Gesamtanzahl der veränderten Proteine in den Gruppenvergleichen sowie die Überschneidungen der veränderten Proteine zwischen den einzelnen Gruppenvergleichen. Die Visualisierung erfolgte mit der Open-Access-Software *FunRich*. Abschließend wurde noch eine *STRING*-Datenbankanalyse durchgeführt. Die *STRING*-Analyse diente dazu, um molekulare Interaktionen, funktionelle Interaktionen und Stoffwechselwege (basierend auf publizierten Experimenten oder kuratierten Datenbanken) aller signifikant (q-Wert  $< 0,05$ ) und relevant (Fold change  $\geq 1,5$ ) veränderten Proteinen darzustellen. Folgende Einstellungen wurden dabei für die *STRING*-Analyse genutzt:

- network type – full *STRING* network

- meaning of network edges – evidence
- active interaction sources – experiments, databases
- minimum required interaction score – medium confidence (0.400)
- max number of interactors to show – 1st shell: none / query proteins only; 2nd shell:  
none

## 4 Ergebnisse

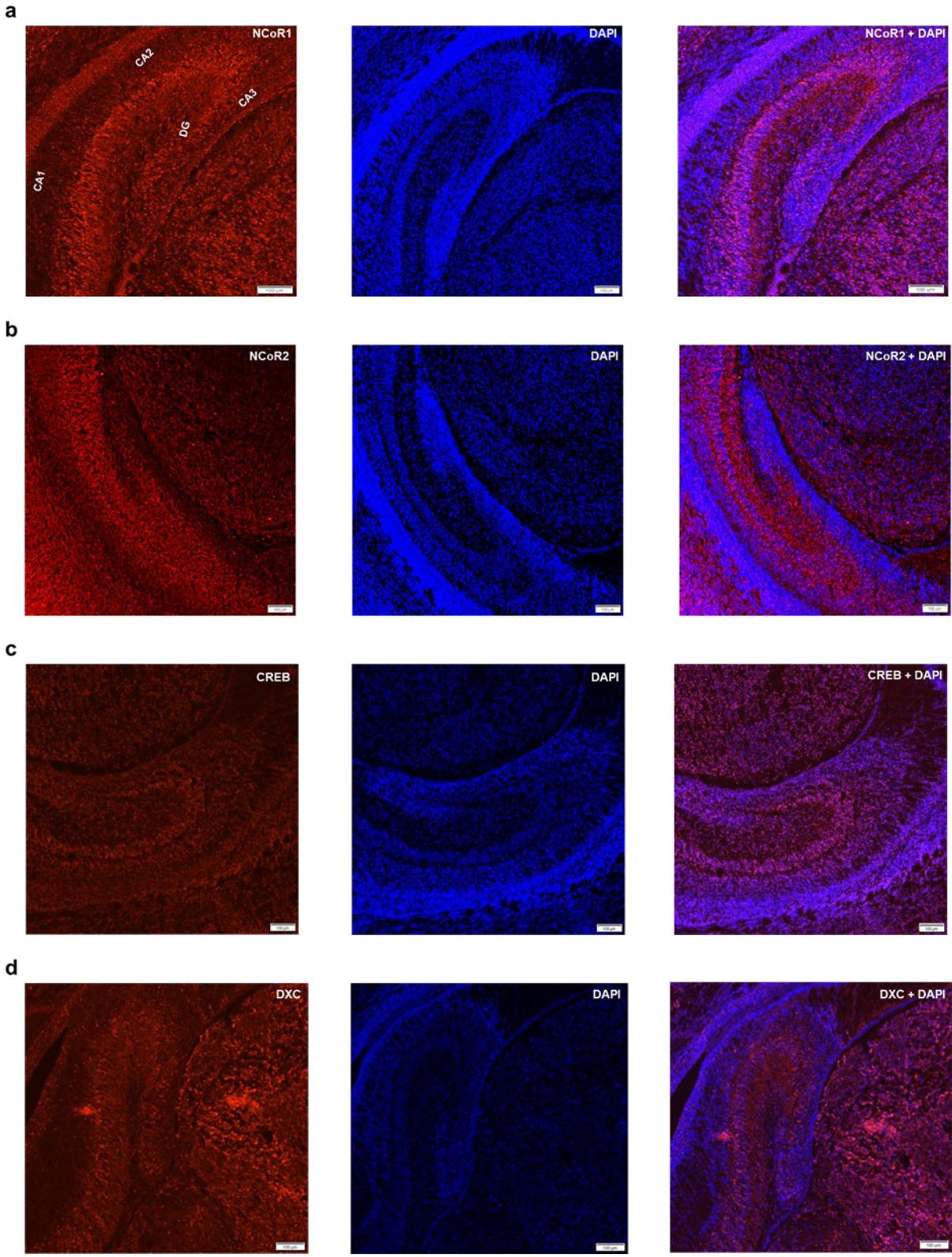
### 4.1 Immunfluoreszenz: Einschränkungen und exemplarische Befunde

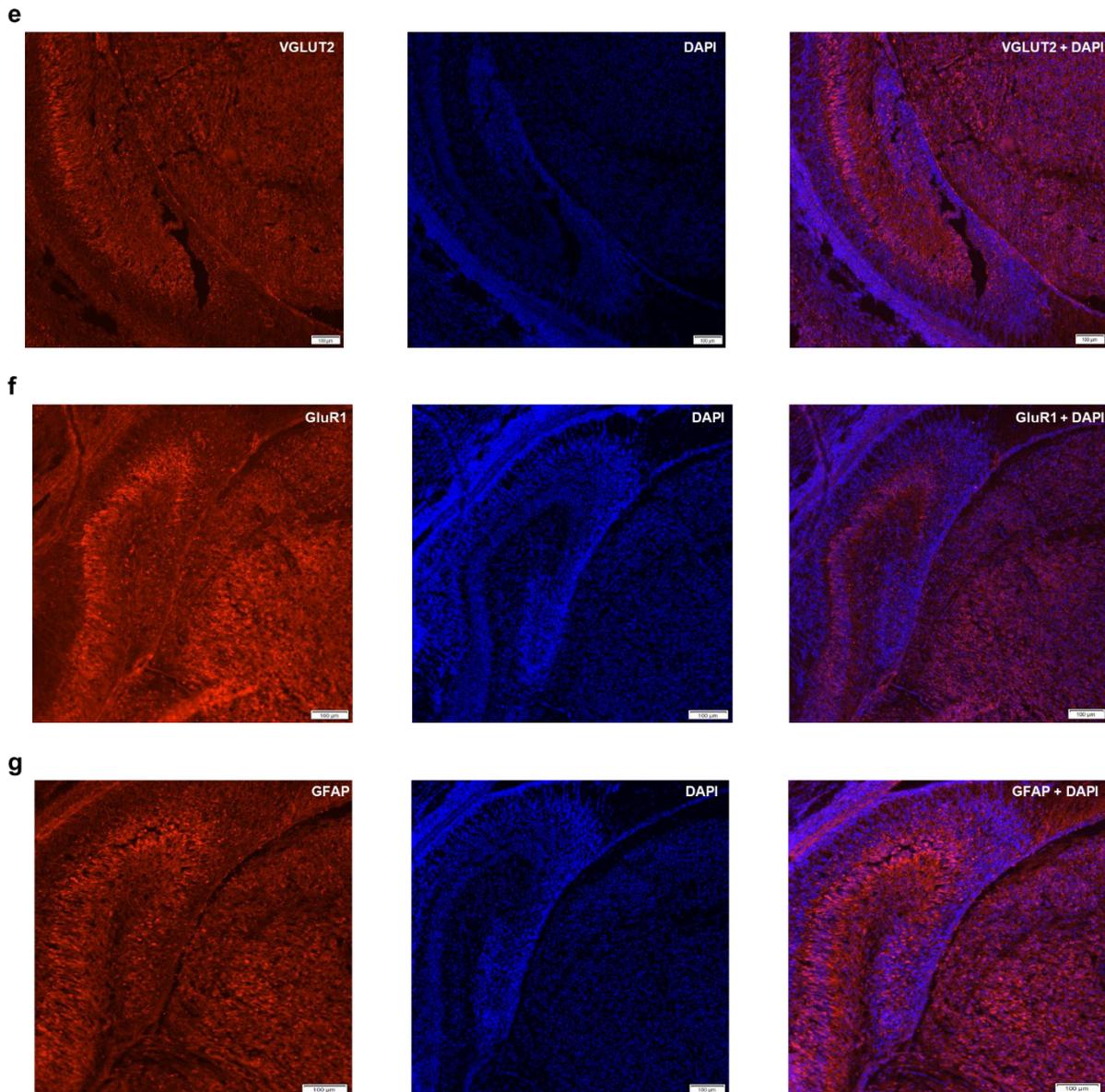
Eine ursprünglich geplante vergleichende Analyse der durchgeführten Immunfluoreszenz-Färbungen unter den 4 Vergleichsgruppen (SD, SD+MF, HFD, HFD+MF) konnte aufgrund von durch den Einfrierprozess induzierten Gewebeschäden in mehreren Gruppen nicht durchgeführt werden. Die Gewebeschäden sind am ehesten durch Gefrierartefakte zu erklären. Dennoch soll im Folgenden kurz auf die einzelnen Färbungen eingegangen und exemplarisch mikroskopische Aufnahmen gezeigt werden (s. Abb. 3). In Abb. 3a sind zudem ausgewählte Hippocampus-Regionen vermerkt.

Um Proteine zu untersuchen, die an der Regulation der Genexpression und Transkriptionsrepression beteiligt sind, wurden NCoR1- (Abb. 3a) und NCoR2-Färbungen (Abb. 3b) durchgeführt. Diese Proteine spielen eine Rolle bei der Regulation der Genexpression durch nukleäre Rezeptoren und könnten somit indirekt die neuronale Funktion im Hippocampus beeinflussen. Darüber hinaus wurde CREB (Abb. 3c) gefärbt, ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der Genexpression beteiligt ist und eine Rolle bei der Langzeitpotenzierung sowie Gedächtnisbildung im Hippocampus spielt.

Zur Untersuchung von neuronaler Plastizität und Entwicklung wurde die Expression von DCX (Abb. 3d) untersucht. DCX ist ein spezifischer Marker für neu gebildete Neuronen und spielt eine Rolle bei der neuronalen Migration und Differenzierung im Hippocampus während der Entwicklung.

Mittels VGLUT2- (Abb. 3e) und GluR1-Färbungen (Abb. 3f) sollte die synaptische Funktion beleuchtet werden. VGLUT2 ist ein Protein, das für den Transport von Glutamat in synaptische Vesikel verantwortlich ist. Somit spielt dieses Protein eine entscheidende Rolle bei der synaptischen Übertragung und Plastizität. Die Expression und Aktivierung des Proteins GluR1 (Abb. 3f) spielt bei der synaptischen Plastizität und bei der Regulation der Neurotransmission im Hippocampus eine Rolle. Zur Darstellung der Astrozyten-Aktivierung wurde eine GFAP-Färbung (Abb. 3g) durchgeführt. GFAP ist ein Protein, das hauptsächlich in Astrozyten exprimiert wird und daher als Marker für die Astrozyten-Aktivierung dienen kann. Astrozyten sind unter anderem an der Regulation der synaptischen Aktivität und des extrazellulären Milieus beteiligt.





**Abb. 3: Exemplarische Aufnahmen aller durchgeführten immunhistochemischen Färbungen**

Die zuvor in Formaldehydlösung fixierten Köpfe der Föten wurden am Kryostat bei  $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$  in koronarer Ebene in  $16\text{ }\mu\text{m}$  dicke Schnitte geschnitten. Um die Schnitte zu identifizieren, die den Hippocampus enthielten, wurde zunächst eine HE-Färbung durchgeführt. Die Schnitte, auf denen sich der Hippocampus befand, wurden anschließend für die immunhistochemische Färbung verwendet: Nach mehrfacher Waschung und Permeabilisierung erfolgte das Blocken von unspezifischen Bindungskomponenten und die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht. Anschließend erfolgten erneute Waschungen und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Cy3. Am folgenden Tag wurden die in dieser Abbildung dargestellten Fluoreszenzbilder mittels eines Mikroskops und der Software *cellSens Dimension* aufgenommen. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Immunfluoreszenz-Färbungen für NCoR1 (a), NCoR2 (b), CREB (c), DXC (d), VGLUT2 (e), GluR1 (f) und GFAP (g) an Schnitten weiblicher Föten an G18,5 der HFD-Gruppe, mit Ausnahme von NCoR2 (HFD+MF-Gruppe) und CREB (SD-Gruppe), bei denen aufgrund besserer Schnittqualität diese Gruppen gewählt wurden. In Abbildung 3a sind der Cornu ammonis (CA1, CA2, CA3) und der Gyrus dentatus (DG) beispielhaft markiert. Zu jeder Färbung werden zudem die DAPI-Färbung sowie eine Überlagerung von DAPI und der entsprechenden Färbung dargestellt. Zur Optimierung der Darstellung der NCoR1- und NCoR2-Immunfluoreszenzfärbung wurden Kontrast und Helligkeit dieser Bilder erhöht. Scale bar =  $100\text{ }\mu\text{m}$

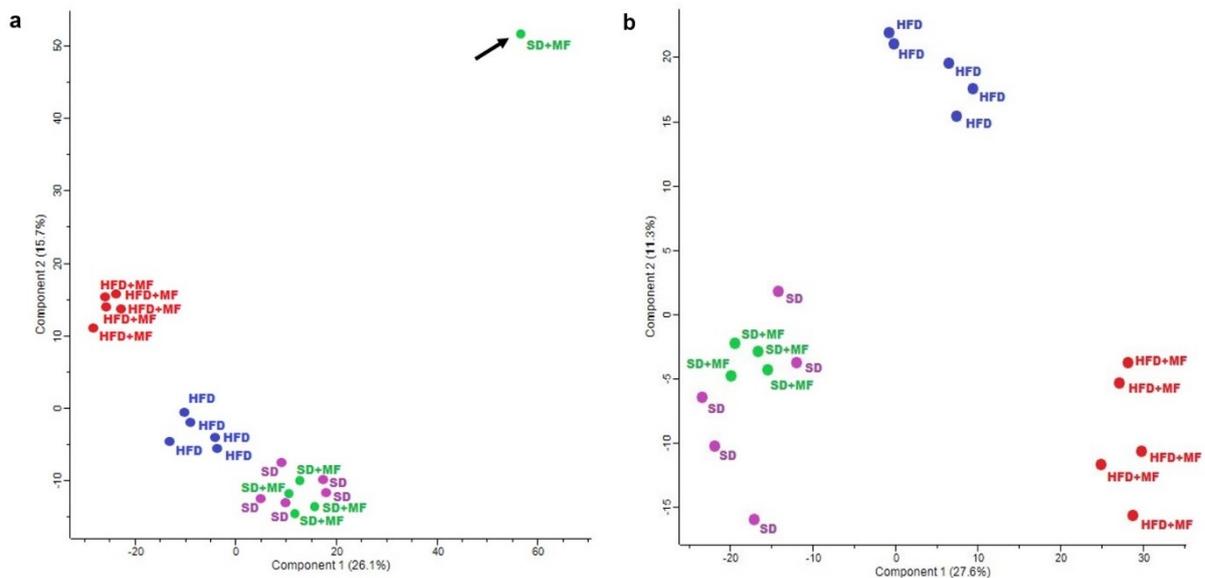
## 4.2 Proteomic Screen

Insgesamt konnten im Proteomic Screen 3747 Proteine detektiert werden.

### 4.2.1 Hauptkomponentenanalyse

Da in der SD+MF-Gruppe die Daten einer Probe deutlich von den Daten der anderen Proben derselben Gruppe in der Hauptkomponentenanalyse abwichen (Abb. 4a), wurde diese Probe als Ausreißer gewertet und aus allen weiteren Vergleichen ausgeschlossen.

Somit wurden in der nachfolgenden Hauptkomponentenanalyse für die SD+MF-Gruppe 4 Proben in den Vergleichen berücksichtigt, während in allen anderen Gruppen (SD, HFD, HFD+MF) 5 Proben berücksichtigt wurden (Abb. 4b). In der Hauptkomponentenanalyse konnte festgestellt werden, dass die einzelnen Versuchsgruppen Cluster bildeten. Während die Cluster der beiden Standarddiät-Gruppen (SD und SD+MF) nah benachbart sind, sind die Cluster der beiden Hochfettdiät-Gruppen (HFD und HFD+MF) weit voneinander entfernt (Abb. 4b). Auch grenzten sich die Gruppen SD und SD+MF jeweils deutlich von den Gruppen HFD und HFD+MF ab.



**Abb. 4: Hauptkomponentenanalyse aller detektierten Proteine**

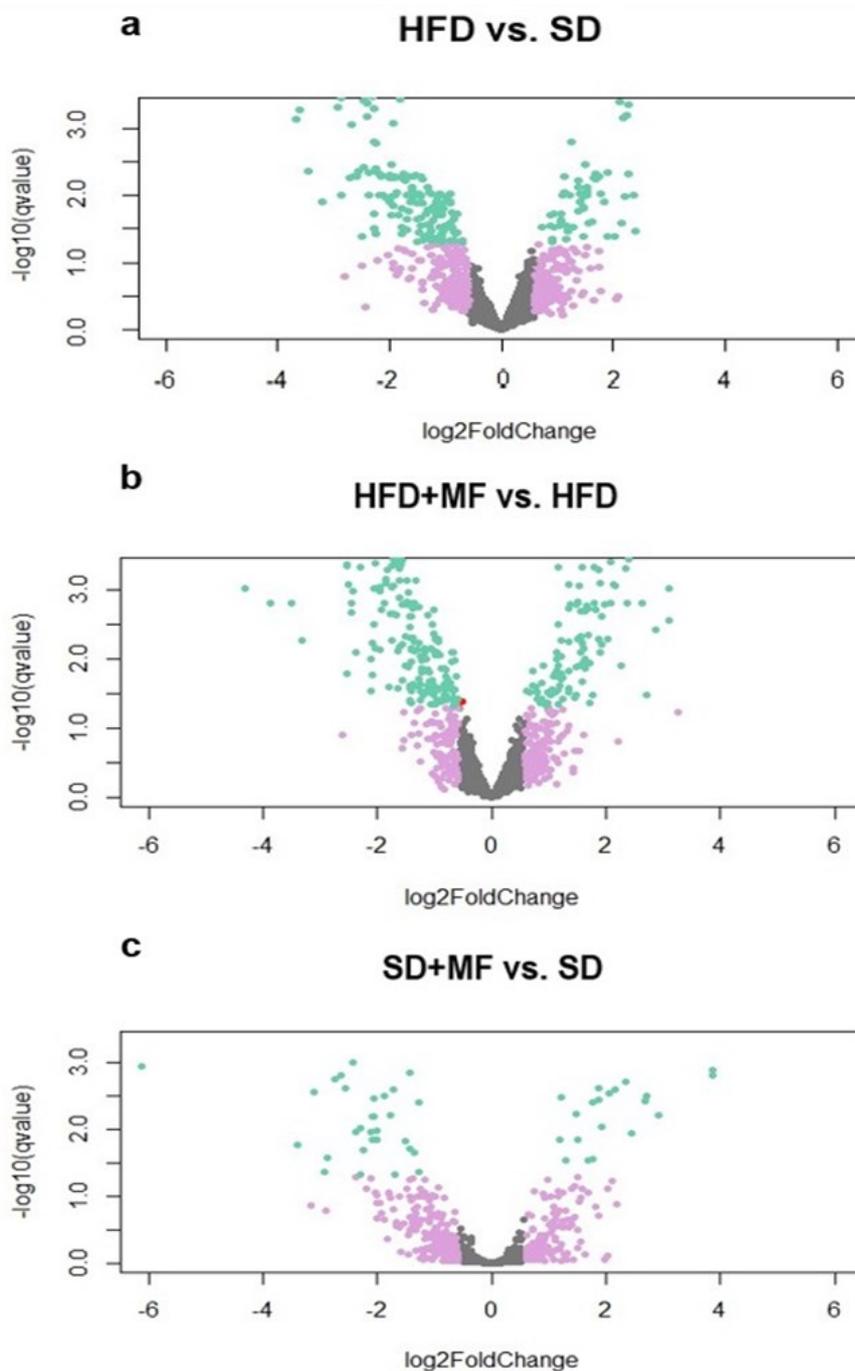
Nach Isolation der Proteine erfolgte eine massenspektrometrische Detektion ebendieser. Eine weitere Analyse der detektierten Proteine erfolgte mittels *MaxQuant*. Schließlich wurde mittels des Programms *Perseus* die abgebildete Hauptkomponentenanalyse erstellt. Jede analysierte Probe ist in der Abbildung durch einen Punkt dargestellt. Da es einen Ausreißer in der SD+MF-Gruppe gab (Abb. 4a; mit  $\rightarrow$  markiert), wurden in dieser Gruppe nur 4 Tiere berücksichtigt (Abb. 4b). In allen anderen Gruppen wurden Hippocampi von 5 Föten pro Gruppe in die Analyse miteinbezogen. SD lila, SD+MF grün, HFD blau, HFD+MF rot.

### 4.2.2 Volcano Plots

Mithilfe von Volcano Plots lässt sich grafisch durch Nutzung unterschiedlicher Farben darstellen, wie viele der 3747 identifizierten Proteine in den unterschiedlichen Vergleichen signifikant ( $q$ -Wert  $< 0,05$ ) und relevant (Fold change  $\geq 1,5$ ) verändert waren. Die Proteine, die

diesen beiden Kriterien ( $q\text{-Wert} < 0,05$  und  $\text{Fold change} \geq 1,5$ ) entsprachen, werden in den jeweiligen Diagrammen grün dargestellt. Proteine, die einem der Kriterien oder beiden Kriterien nicht entsprachen, werden in anderen Farben dargestellt.

Die Volcano Plots zeigen, dass im Vergleich HFD+MF vs. HFD (Abb. 5b) mehr Proteine signifikant ( $q\text{-Wert} < 0,05$ ) und relevant ( $\text{Fold change} \geq 1,5$ ) verändert waren als in den Vergleichen HFD vs. SD (Abb. 5a) und SD+MF vs. SD (Abb. 5c). Auch zeigt sich in den Volcano Plots, dass im Vergleich SD+MF vs. SD (Abb. 5c) die wenigsten Proteine signifikant und relevant verändert waren.



**Abb. 5: Volcano Plots aller detektierten Proteine in den jeweiligen Gruppenvergleichen**

Nach Isolierung der Proteine erfolgte eine massenspektrometrische Detektion ebendieser. Eine weitere Analyse der detektierten Proteine erfolgte mittels *MaxQuant* und *Perseus*. Die Erstellung der Volcano Plots aller detektierten Proteine erfolgte für die Vergleiche HFD vs. SD, HFD+MF vs. HFD und SD+MF vs. SD mittels der Software *RStudio*. Abgebildet werden in den jeweiligen Vergleichen alle detektierten Proteine und deren q-Wert und Fold change. Die **grünen** Punkte stellen die Proteine dar, die in dem jeweiligen Vergleich sowohl signifikant als auch relevant verändert waren (q-Wert < 0,05, Fold change  $\geq$  1,5). Die **roten** Punkte stellen die Proteine dar, die zwar signifikant (q-Wert < 0,05), aber nicht relevant verändert waren (Fold change < 1,5). Die **lila** Punkte stellen die Proteine dar, mit q-Wert von > 0,05 und Fold change von  $\geq$  1,5 (nicht signifikant, jedoch relevant). Die **grauen** Punkte stellen die Proteine dar, die weder relevant noch signifikant verändert waren (q-Wert > 0,05, Fold change < 1,5).

### 4.2.3 Übersichtstabellen aller signifikant und relevant veränderten Proteine

Im folgenden Kapitel werden alle Proteine tabellarisch aufgeführt, die in den 3 Vergleichen HFD vs. SD (Tabelle 10 und Tabelle 11), HFD+MF vs. HFD (Tabelle 12 und Tabelle 13) und SD+MF vs. SD (Tabelle 14 und Tabelle 15) jeweils signifikant (q-Wert < 0,05) und relevant (Fold change  $\geq$  1,5) verändert waren. Aufgeführt sind die Protein-ID, der Proteinname und das Gen. Zusätzlich aufgeführt ist die Fold change, die das Vielfache der Hochregulation bzw. Runterregulation der Proteinmenge zwischen den zwei verglichenen Gruppen angibt. Außerdem werden für jedes Protein die valid values aufgeführt. Diese geben an, in wie vielen analysierten Proben einer Versuchsgruppe das jeweilige Protein detektiert wurde. Die Proteine sind in den Tabellen jeweils nach ihrer Fold change angeordnet.

#### 4.2.3.1 HFD vs. SD

| Protein-ID | Proteinname  | Gen         | q-Wert | Fold change | valid values HFD | valid values SD |
|------------|--|-------------|--------|-------------|------------------|-----------------|
| P0C090     | Roquin-2   | Rc3h2       | < 0,01 | 36,84       | 5                | 0               |
| Q5SSZ5     | Tensin-3   | Tns3        | < 0,01 | 11,74       | 5                | 0               |
| P56183     | Ribosomal RNA processing protein 1 homolog A       | Rrp1        | < 0,01 | 6,49        | 5                | 0               |
| Q64096     | Guanine nucleotide exchange factor DBS             | Mcf2l       | < 0,01 | 6,01        | 5                | 0               |
| Q61062     | Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-3 | Dvl3        | < 0,01 | 5,86        | 5                | 0               |
| Q8VCD6     | Receptor expression-enhancing protein 2            | Reep2       | < 0,05 | 5,23        | 5                | 2               |
| Q8BHE8     | m-AAA protease-interacting protein 1               | Maip1       | < 0,01 | 5,10        | 4                | 0               |
| Q61233     | Plastin-2  | Lcp1        | < 0,01 | 4,87        | 4                | 0               |
| Q9CQ56     | Vesicle transport protein USE1                     | Use1        | < 0,01 | 4,83        | 5                | 0               |
| P03888     | NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1             | Mtnd1       | < 0,01 | 4,77        | 5                | 0               |
| Q9DB25     | Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase        | Alg5        | < 0,01 | 4,75        | 5                | 0               |
| Q60629     | Ephrin type-A receptor 5                           | Epha5       | < 0,05 | 4,65        | 5                | 1               |
| P35601     | Replication factor C subunit 1                     | Rfc1        | < 0,01 | 4,50        | 5                | 0               |
| Q9CQD4     | Charged multivesicular body protein 1b-2           | Chmp1b<br>2 | < 0,05 | 4,41        | 4                | 1               |

|        |  |           |        |      |   |   |
|--------|--|-----------|--------|------|---|---|
| Q8BH60 | Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein              | Gopc      | < 0,01 | 4,29 | 5 | 0 |
| P56380 | Bis(5-nucleosyl)-tetrphosphatase [asymmetrical]                            | Nudt2     | < 0,05 | 4,07 | 5 | 2 |
| Q91XU0 | ATPase WRNIP1  | Wrnip1    | < 0,01 | 4,03 | 5 | 0 |
| Q8VDS8 | Syntaxin-18  | Stx18     | < 0,05 | 3,71 | 4 | 0 |
| Q6ZQB6 | Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 2 | Ppip5k2   | < 0,01 | 3,70 | 5 | 0 |
| Q91W82 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E2   | Ube2e2    | < 0,05 | 3,56 | 4 | 0 |
| Q9Z0T9 | Integrin beta-6  | Itgb6     | < 0,01 | 3,39 | 5 | 0 |
| Q61024 | Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]                              | Asns      | < 0,01 | 3,31 | 5 | 1 |
| Q8BYH8 | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9                                | Chd9      | < 0,01 | 3,18 | 4 | 0 |
| P45952 | Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial                | Acadm     | < 0,01 | 3,18 | 4 | 0 |
| Rps26  | Uncharacterized protein C7orf50 homolog                                    |           | < 0,01 | 3,13 | 5 | 0 |
| Q64523 | Histone H2A type 2-C   | Hist2h2ac | < 0,05 | 3,04 | 4 | 0 |
| P26048 | Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-2                           | Gabra2    | < 0,05 | 2,96 | 5 | 1 |
| Q9Z2X8 | Kelch-like ECH-associated protein 1  | Keap1     | < 0,01 | 2,89 | 5 | 0 |
| Q99NE5 | Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1                          | Rims1     | < 0,01 | 2,89 | 5 | 0 |
| Q6DIC0 | Probable global transcription activator SNF2L2                             | Smarca2   | < 0,01 | 2,88 | 5 | 0 |
| Q9D415 | Disks large-associated protein 1   | Dlgap1    | < 0,01 | 2,82 | 5 | 0 |
| Q6VGS5 | Protein Daple  | Ccdc88c   | < 0,05 | 2,78 | 5 | 2 |
| O89116 | Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A             | Vti1a     | < 0,05 | 2,78 | 4 | 0 |
| Q99LC8 | Translation initiation factor eIF-2B subunit alpha                         | Eif2b1    | < 0,05 | 2,74 | 4 | 0 |
| Q61239 | Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha | Fnta      | < 0,05 | 2,74 | 4 | 0 |
| Q80WW9 | DDRKG domain-containing protein 1  | Ddrkg1    | < 0,01 | 2,73 | 4 | 0 |
| Q3UIA2 | Rho GTPase-activating protein 17   | Arhgap17  | < 0,05 | 2,62 | 4 | 0 |
| P26339 | Chromogranin-A   | Chga      | < 0,01 | 2,62 | 5 | 0 |
| Q8R035 | Peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial                                | Ict1      | < 0,01 | 2,57 | 5 | 0 |
| Q8R3V6 | CUE domain-containing protein 1  | Cuedc1    | < 0,05 | 2,57 | 5 | 0 |

|        |  |         |        |      |   |   |
|--------|--|---------|--------|------|---|---|
| Q62011 | Podoplanin   | Pdpn    | < 0,01 | 2,57 | 5 | 0 |
| Q7TT23 | Dynein axonemal assembly factor 9  | Dnaaf9  | < 0,05 | 2,44 | 4 | 0 |
| O35066 | Kinesin-like protein KIF3C   | Kif3c   | < 0,01 | 2,35 | 5 | 0 |
| Q922E4 | Ethanolamine-phosphate<br>cytidyltransferase                                 | Pcyt2   | < 0,01 | 2,33 | 5 | 0 |
| Q6PFX7 | Neuronal tyrosine-phosphorylated<br>phosphoinositide-3-kinase adapter 1      | Nyap1   | < 0,05 | 2,29 | 4 | 0 |
| Q8BHJ9 | Pre-mRNA-splicing factor SLU7  | Slu7    | < 0,05 | 2,21 | 5 | 0 |
| Q7TT15 | Putative polypeptide N-<br>acetylgalactosaminyltransferase-like protein<br>3 | Wbscr17 | < 0,05 | 2,21 | 5 | 0 |
| Q62083 | PRKCA-binding protein  | Pick1   | < 0,01 | 2,20 | 4 | 0 |
| Q2PFD7 | PH and SEC7 domain-containing protein 3                                      | Psd3    | < 0,01 | 2,20 | 5 | 0 |
| P47867 | Secretogranin-3  | Scg3    | < 0,05 | 2,15 | 5 | 0 |
| E9Q414 | Apolipoprotein B-100   | Apob    | < 0,05 | 2,10 | 5 | 0 |
| Q80YA7 | Dipeptidyl peptidase 8   | Dpp8    | < 0,05 | 2,10 | 5 | 2 |
| Q08481 | Platelet endothelial cell adhesion molecule                                  | Pecam1  | < 0,05 | 2,04 | 4 | 0 |
| Q8K190 | SAYSvFN domain-containing protein 1  | Saysd1  | < 0,05 | 1,93 | 5 | 0 |
| A2ABV5 | Mediator of RNA polymerase II transcription<br>subunit 14                    | Med14   | < 0,05 | 1,90 | 5 | 0 |
| Q9JIH2 | Nuclear pore complex protein Nup50   | Nup50   | < 0,05 | 1,89 | 5 | 5 |
| Q8C525 | Protein MB21D2   | Mb21d2  | < 0,05 | 1,87 | 5 | 1 |
| Q9ER39 | Torsin-1A  | Tor1a   | < 0,05 | 1,83 | 5 | 1 |
| Q921E2 | Ras-related protein Rab-31   | Rab31   | < 0,05 | 1,82 | 5 | 0 |
| Q9CWF2 | Tubulin beta-2B chain  | Tubb2b  | < 0,05 | 1,66 | 5 | 5 |

**Tabelle 10: Signifikant hochregulierte Proteine HFD vs. SD**

Insgesamt waren 60 Proteine in der HFD-Gruppe im Vergleich zu der SD-Gruppe signifikant ( $q$ -Wert  $< 0,05$ ) und relevant (Fold change  $\geq 1,5$ ) hochreguliert. In beiden Versuchsgruppen wurden jeweils 5 Tiere für den Vergleich berücksichtigt. Neben dem  $q$ -Wert und der Fold change werden in dieser Tabelle die Protein-ID, der Proteinname, das Gen und die valid values angegeben. Die Sortierung der Tabelle erfolgte nach der Fold change in absteigender Reihenfolge.

| Protein-ID | Proteinname   | Gen      | q-Wert | Fold change | valid values HFD | valid values SD |
|------------|---|----------|--------|-------------|------------------|-----------------|
| Q3UV17     | Keratin, type II cytoskeletal 2 oral                    | Krt76    | < 0,01 | -166,91     | 0                | 5               |
| P84089     | Enhancer of rudimentary homolog                         | Erh      | < 0,01 | -28,66      | 0                | 5               |
| Q9CQV6     | Microtubule-associated proteins<br>1A/1B light chain 3B | Map1lc3b | < 0,01 | -24,83      | 0                | 5               |
| P62274     | 40S ribosomal protein S29                               | Rps29    | < 0,01 | -18,94      | 0                | 5               |
| P97363     | Serine palmitoyltransferase 2                           | Sptlc2   | < 0,01 | -12,67      | 0                | 4               |
| Q6ZPJ0     | Testis-expressed sequence 2 protein                     | Tex2     | < 0,01 | -12,14      | 0                | 5               |
| Q9QZB7     | Actin-related protein 10                                | Actr10   | < 0,01 | -12,10      | 0                | 5               |
| P13705     | DNA mismatch repair protein Msh3                        | Msh3     | < 0,01 | -10,97      | 0                | 4               |

|        |  |          |        |       |   |   |
|--------|--|----------|--------|-------|---|---|
| Q9WUB4 | Dynactin subunit 6   | Dctn6    | < 0,01 | -9,88 | 0 | 5 |
| Q60974 | Nuclear receptor corepressor 1                                 | Ncor1    | < 0,05 | -9,16 | 0 | 4 |
| Q3ULD5 | Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial      | Mccc2    | < 0,01 | -7,55 | 0 | 5 |
| Q9WV32 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B                   | Arpc1b   | < 0,01 | -7,33 | 0 | 5 |
| Q6ZWY8 | Thymosin beta-10   | Tmsb10   | < 0,01 | -7,23 | 3 | 5 |
| Q923D4 | Splicing factor 3B subunit 5                                   | Sf3b5    | < 0,01 | -6,54 | 0 | 4 |
| Q6ZWM4 | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM8                       | Lsm8     | < 0,01 | -6,46 | 0 | 5 |
| Q9D855 | Cytochrome b-c1 complex subunit 7                              | Uqcrb    | < 0,01 | -6,30 | 3 | 5 |
| P40240 | CD9 antigen  | Cd9      | < 0,01 | -6,03 | 0 | 4 |
| P13020 | Gelsolin   | Gsn      | < 0,01 | -5,91 | 0 | 5 |
| Q9D6J6 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial  | Ndufv2   | < 0,01 | -5,88 | 1 | 5 |
| O35594 | Intraflagellar transport protein 81 homolog                    | Ift81    | < 0,05 | -5,64 | 1 | 4 |
| Q9D0W5 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1                     | Ppil1    | < 0,01 | -5,57 | 0 | 5 |
| O88559 | Menin  | Men1     | < 0,01 | -5,53 | 0 | 5 |
| P70441 | Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1                | Slc9a3r1 | < 0,01 | -5,38 | 0 | 5 |
| Q811W0 | Transcription factor SOX-21                                    | Sox21    | < 0,01 | -5,25 | 0 | 5 |
| Q8R3G1 | Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1                     | Ppp1r8   | < 0,01 | -5,24 | 0 | 5 |
| P61965 | WD repeat-containing protein 5                                 | Wdr5     | < 0,01 | -5,16 | 0 | 4 |
| Q9DCT5 | Stromal cell-derived factor 2                                  | Sdf2     | < 0,01 | -5,14 | 0 | 5 |
| P62313 | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM6                       | Lsm6     | < 0,01 | -5,01 | 0 | 5 |
| O55047 | Serine/threonine-protein kinase tousled-like 2                 | Tlk2     | < 0,01 | -4,88 | 0 | 5 |
| Q8VBV7 | COP9 signalosome complex subunit 8                             | Cops8    | < 0,05 | -4,87 | 1 | 4 |
| Q9WVA3 | Mitotic checkpoint protein BUB3                                | Bub3     | < 0,05 | -4,87 | 3 | 5 |
| Q8R5C5 | Beta-centractin  | Actr1b   | < 0,01 | -4,86 | 0 | 5 |
| Q99MN9 | Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial            | Pccb     | < 0,01 | -4,80 | 0 | 5 |
| Q05AH6 | Spindlin interactor and repressor of chromatin-binding protein | Spindoc  | < 0,05 | -4,77 | 3 | 5 |
| Q9DB15 | 39S ribosomal protein L12, mitochondrial                       | Mrpl12   | < 0,01 | -4,72 | 0 | 5 |
| P49443 | Protein phosphatase 1A   | Ppm1a    | < 0,01 | -4,63 | 0 | 5 |
| Q80W14 | Pre-mRNA-processing factor 40 homolog B                        | Prpf40b  | < 0,01 | -4,52 | 1 | 5 |

|        |  |          |        |       |   |   |
|--------|--|----------|--------|-------|---|---|
| Q9D8T7 | SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial                   | Slirp    | < 0,01 | -4,50 | 0 | 5 |
| P35486 | Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial | Pdha1    | < 0,01 | -4,48 | 5 | 5 |
| Q9DB77 | Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial                               | Uqcrc2   | < 0,01 | -4,46 | 5 | 5 |
| Q9CQC9 | GTP-binding protein SAR1b  | Sar1b    | < 0,01 | -4,35 | 1 | 4 |
| P70349 | Histidine triad nucleotide-binding protein 1                                   | Hint1    | < 0,05 | -4,15 | 0 | 5 |
| Q9DCF9 | Translocon-associated protein subunit gamma                                    | Ssr3     | < 0,01 | -4,02 | 0 | 4 |
| O35900 | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2                                       | Lsm2     | < 0,05 | -4,00 | 0 | 4 |
| Q9WU42 | Nuclear receptor corepressor 2   | Ncor2    | < 0,05 | -3,96 | 1 | 5 |
| P48036 | Annexin A5   | Anxa5    | < 0,01 | -3,96 | 5 | 5 |
| Q03958 | Prefoldin subunit 6  | Pfdn6    | < 0,05 | -3,94 | 0 | 4 |
| Q8QZY9 | Splicing factor 3B subunit 4   | Sf3b4    | < 0,01 | -3,93 | 0 | 5 |
| P15105 | Glutamine synthetase   | Glul     | < 0,05 | -3,83 | 0 | 4 |
| Q99LS3 | Phosphoserine phosphatase  | Psph     | < 0,01 | -3,81 | 0 | 5 |
| Q9CQJ6 | Density-regulated protein  | Denr     | < 0,01 | -3,79 | 0 | 4 |
| Q91WF7 | Polyphosphoinositide phosphatase   | Fig4     | < 0,01 | -3,75 | 0 | 4 |
| Q9CQ75 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2                   | Ndufa2   | < 0,01 | -3,74 | 0 | 5 |
| P84086 | Complexin-2  | Cplx2    | < 0,01 | -3,72 | 0 | 5 |
| Q6NS82 | Protein FAM134A  | Fam134a  | < 0,01 | -3,64 | 0 | 4 |
| Q91YT0 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial                  | Ndufv1   | < 0,05 | -3,56 | 5 | 5 |
| Q921J2 | GTP-binding protein Rheb   | Rheb     | < 0,01 | -3,52 | 0 | 5 |
| Q3THS6 | S-adenosylmethionine synthase isoform type-2                                   | Mat2a    | < 0,01 | -3,47 | 0 | 5 |
| P10518 | Delta-aminolevulinic acid dehydratase  | Alad     | < 0,05 | -3,46 | 0 | 4 |
| Q8BHL8 | Proteasome inhibitor PI31 subunit  | Psmf1    | < 0,05 | -3,45 | 0 | 3 |
| Q9WU28 | Prefoldin subunit 5  | Pfdn5    | < 0,01 | -3,44 | 0 | 4 |
| Q6PHZ2 | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta              | Camk2d   | < 0,05 | -3,43 | 0 | 4 |
| Q9WTI7 | Unconventional myosin-1c   | Myo1c    | < 0,01 | -3,38 | 0 | 4 |
| P63323 | 40S ribosomal protein S12  | Rps12    | < 0,01 | -3,29 | 5 | 5 |
| Q62426 | Cystatin-B   | Cstb     | < 0,01 | -3,28 | 0 | 4 |
| A2AIV2 | Protein virilizer homolog  | Kiaa1429 | < 0,05 | -3,25 | 0 | 5 |
| P24369 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B  | Ppib     | < 0,01 | -3,24 | 2 | 5 |
| Q8K4P0 | pre-mRNA 3 end processing protein WDR33  | Wdr33    | < 0,05 | -3,22 | 1 | 5 |

|        |   |          |        |       |   |   |
|--------|---|----------|--------|-------|---|---|
| Q8C145 | Zinc transporter ZIP6   | Slc39a6  | < 0,05 | -3,19 | 1 | 5 |
| Q9CZ13 | Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial                                  | Uqcrc1   | < 0,01 | -3,19 | 5 | 5 |
| Q925E7 | Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B delta isoform | Ppp2r2d  | < 0,05 | -3,13 | 0 | 4 |
| Q8BU03 | Periodic tryptophan protein 2 homolog   | Pwp2     | < 0,01 | -3,04 | 0 | 5 |
| Q9CPY7 | Cytosol aminopeptidase  | Lap3     | < 0,01 | -3,02 | 0 | 3 |
| P62137 | Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit                  | Ppp1ca   | < 0,05 | -3,02 | 5 | 5 |
| Q9JJK7 | Tropomodulin-2  | Tmod2    | < 0,01 | -3,00 | 5 | 5 |
| Q9CQF3 | Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5                         | Nudt21   | < 0,01 | -2,99 | 5 | 5 |
| P61164 | Alpha-centractin  | Actr1a   | < 0,01 | -2,87 | 5 | 5 |
| P62311 | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm3  | Lsm3     | < 0,05 | -2,84 | 1 | 5 |
| Q9CW79 | Golgin subfamily A member 1   | Golga1   | < 0,05 | -2,82 | 1 | 5 |
| Q8K409 | DNA polymerase beta   | Polb     | < 0,05 | -2,82 | 0 | 4 |
| P62141 | Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit                   | Ppp1cb   | < 0,01 | -2,80 | 5 | 5 |
| Q9JHI5 | Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial                                       | Ivd      | < 0,05 | -2,76 | 1 | 4 |
| P63042 | Stathmin-4  | Stmn4    | < 0,05 | -2,75 | 0 | 4 |
| Q8BIQ5 | Cleavage stimulation factor subunit 2   | Cstf2    | < 0,05 | -2,74 | 3 | 5 |
| O88746 | Target of Myb protein 1   | Tom1     | < 0,01 | -2,74 | 0 | 5 |
| P62843 | 40S ribosomal protein S15   | Rps15    | < 0,01 | -2,73 | 5 | 5 |
| P09926 | Surfeit locus protein 2   | Surf2    | < 0,05 | -2,73 | 0 | 4 |
| A6X919 | Probable C-mannosyltransferase DPY19L1  | Dpy19l1  | < 0,05 | -2,73 | 0 | 4 |
| Q922P8 | Transmembrane protein 132A  | Tmem132a | < 0,05 | -2,66 | 0 | 5 |
| Q9CYL5 | Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1                             | Glpr2    | < 0,05 | -2,65 | 0 | 4 |
| Q3UQA7 | Selenoprotein H   | Selh     | < 0,01 | -2,65 | 0 | 4 |
| P05213 | Tubulin alpha-1B chain  | Tuba1b   | < 0,05 | -2,63 | 5 | 5 |
| Q9JL35 | High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 5                | Hmgn5    | < 0,05 | -2,58 | 5 | 5 |
| A2AR02 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G   | Ppig     | < 0,05 | -2,52 | 2 | 5 |
| P62715 | Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform            | Ppp2cb   | < 0,05 | -2,50 | 5 | 5 |
| Q61696 | Heat shock 70 kDa protein 1A  | Hspa1a   | < 0,05 | -2,47 | 4 | 5 |

|        |   |          |        |       |   |   |
|--------|---|----------|--------|-------|---|---|
| P62267 | 40S ribosomal protein S23                                     | Rps23    | < 0,01 | -2,47 | 5 | 5 |
| O88844 | Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic                   | Idh1     | < 0,01 | -2,43 | 5 | 5 |
| Q8C569 | Protein FAM118B   | Fam118b  | < 0,05 | -2,43 | 0 | 4 |
| P28867 | Protein kinase C delta type                                   | Prkcd    | < 0,05 | -2,43 | 0 | 3 |
| Q8R502 | Volume-regulated anion channel subunit LRRC8C                 | Lrrc8c   | < 0,05 | -2,41 | 0 | 4 |
| O55176 | E3 ubiquitin-protein ligase Praja-1                           | Pja1     | < 0,05 | -2,41 | 0 | 4 |
| P11088 | Filaggrin   | Flg      | < 0,05 | -2,40 | 0 | 4 |
| P14824 | Annexin A6  | Anxa6    | < 0,01 | -2,39 | 5 | 5 |
| Q9JHJ0 | Tropomodulin-3  | Tmod3    | < 0,05 | -2,38 | 4 | 5 |
| Q91VD9 | NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial  | Ndufs1   | < 0,05 | -2,33 | 5 | 5 |
| Q9D3D9 | ATP synthase subunit delta, mitochondrial                     | Atp5d    | < 0,05 | -2,33 | 5 | 5 |
| O55128 | Histone deacetylase complex subunit SAP18                     | Sap18    | < 0,05 | -2,32 | 5 | 5 |
| P62960 | Nuclease-sensitive element-binding protein 1                  | Ybx1     | < 0,05 | -2,29 | 5 | 5 |
| Q3THW5 | Histone H2A.V   | H2afv    | < 0,05 | -2,27 | 5 | 5 |
| O88696 | ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial | Clpp     | < 0,05 | -2,26 | 0 | 3 |
| Q9JIA7 | Sphingosine kinase 2  | Sphk2    | < 0,05 | -2,24 | 0 | 4 |
| P62270 | 40S ribosomal protein S18                                     | Rps18    | < 0,05 | -2,24 | 5 | 5 |
| Q61205 | Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma   | Pafah1b3 | < 0,05 | -2,19 | 5 | 5 |
| Q8VE37 | Regulator of chromosome condensation                          | Rcc1     | < 0,01 | -2,17 | 0 | 4 |
| Q91VJ5 | Polyglutamine-binding protein 1                               | Pqbp1    | < 0,05 | -2,15 | 5 | 5 |
| Q6PE01 | U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein             | Snrnp40  | < 0,05 | -2,15 | 5 | 5 |
| P11031 | Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15   | Sub1     | < 0,05 | -2,15 | 5 | 5 |
| Q80X32 | UPF0461 protein C5orf24 homolog                               |          | < 0,05 | -2,14 | 0 | 5 |
| P68134 | Actin, alpha skeletal muscle                                  | Acta1    | < 0,05 | -2,13 | 5 | 5 |
| Q80WS3 | rRNA/tRNA 2-O-methyltransferase fibrillar-like protein 1      | Fbll1    | < 0,05 | -2,12 | 5 | 5 |
| Q9QZD9 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I          | Eif3i    | < 0,05 | -2,12 | 5 | 5 |
| P62748 | Hippocalcin-like protein 1                                    | Hpcal1   | < 0,05 | -2,12 | 0 | 4 |
| Q9CY57 | Chromatin target of PRMT1 protein                             | Chtop    | < 0,05 | -2,11 | 5 | 5 |
| Q8CC21 | Tetratricopeptide repeat protein 19, mitochondrial            | Ttc19    | < 0,05 | -2,11 | 0 | 4 |
| P42932 | T-complex protein 1 subunit theta                             | Cct8     | < 0,05 | -2,10 | 5 | 5 |

|        |   |          |        |       |   |   |
|--------|---|----------|--------|-------|---|---|
| P83882 | 60S ribosomal protein L36a  | Rpl36a   | < 0,05 | -2,10 | 5 | 5 |
| Q8C570 | mRNA export factor  | Rae1     | < 0,05 | -2,09 | 5 | 5 |
| Q9CQV7 | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14                                     | Dnajc19  | < 0,05 | -2,06 | 0 | 2 |
| P63260 | Actin, cytoplasmic 2  | Actg1    | < 0,05 | -2,05 | 5 | 5 |
| P97927 | Laminin subunit alpha-4   | Lama4    | < 0,05 | -2,02 | 4 | 5 |
| P63325 | 40S ribosomal protein S10   | Rps10    | < 0,05 | -1,99 | 5 | 5 |
| P68040 | Small ribosomal subunit protein RACK1   | Rack1    | < 0,05 | -1,98 | 5 | 5 |
| Q62203 | Splicing factor 3A subunit 2  | Sf3a2    | < 0,05 | -1,95 | 5 | 5 |
| P20029 | 78 kDa glucose-regulated protein  | Hspa5    | < 0,05 | -1,90 | 5 | 5 |
| P46414 | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B  | Cdkn1b   | < 0,05 | -1,90 | 5 | 5 |
| Q9D6R2 | Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial                                       | Idh3a    | < 0,05 | -1,89 | 5 | 5 |
| Q9D1T0 | Leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing nogo receptor-interacting protein 1 | Lingo1   | < 0,01 | -1,88 | 0 | 4 |
| Q9D051 | Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial                                   | Pdhb     | < 0,05 | -1,88 | 5 | 5 |
| P51859 | Hepatoma-derived growth factor  | Hdgf     | < 0,05 | -1,88 | 5 | 5 |
| Q8VIJ6 | Splicing factor, proline- and glutamine-rich  | Sfpq     | < 0,05 | -1,85 | 5 | 5 |
| P62855 | 40S ribosomal protein S26   | Rps26    | < 0,05 | -1,83 | 5 | 5 |
| P56480 | ATP synthase subunit beta, mitochondrial  | Atp5b    | < 0,05 | -1,82 | 5 | 5 |
| Q8C1B7 | Septin-11   | Septin11 | < 0,05 | -1,81 | 5 | 5 |
| P63168 | Dynein light chain 1, cytoplasmic   | Dynll1   | < 0,05 | -1,79 | 5 | 5 |
| Q9CXS4 | Centromere protein V  | Cenpv    | < 0,05 | -1,77 | 5 | 5 |
| P61957 | Small ubiquitin-related modifier 2  | Sumo2    | < 0,05 | -1,77 | 5 | 5 |
| Q9JKB3 | Y-box-binding protein 3   | Ybx3     | < 0,05 | -1,74 | 5 | 5 |
| P63158 | High mobility group protein B1  | Hmgb1    | < 0,05 | -1,73 | 5 | 5 |
| P50518 | V-type proton ATPase subunit E 1  | Atp6v1e1 | < 0,05 | -1,63 | 5 | 5 |
| Q9R190 | Metastasis-associated protein MTA2  | Mta2     | < 0,05 | -1,63 | 5 | 5 |

**Tabelle 11: Signifikant runterregulierte Proteine HFD vs. SD**

Insgesamt waren 151 Proteine in der HFD-Gruppe im Vergleich zu der SD-Gruppe signifikant (q-Wert < 0,05) und relevant (Fold change  $\geq$  1,5) runterreguliert. In beiden Versuchsgruppen wurden jeweils 5 Tiere für den Vergleich berücksichtigt. Neben dem q-Wert und der Fold change werden in dieser Tabelle die Protein-ID, der Proteinname, das Gen und die valid values angegeben. Die Sortierung der Tabelle erfolgte nach der Fold change in absteigender Reihenfolge.

#### 4.2.3.2 HFD+MF vs. HFD

| Protein-ID | Proteinname   | Gen     | q-Wert | Fold change | valid values HFD+MF | valid values HFD |
|------------|---|---------|--------|-------------|---------------------|------------------|
| Q3UV17     | Keratin, type II cytoskeletal 2 oral                            | Krt76   | < 0,01 | 111,34      | 5                   | 0                |
| Q60974     | Nuclear receptor corepressor 1                                  | Ncor1   | < 0,01 | 20,87       | 5                   | 0                |
| P09922     | Interferon-induced GTP-binding protein Mx1                      | Mx1     | < 0,01 | 14,37       | 5                   | 0                |
| brinQ80TE0 | RNA polymerase II-associated protein 1                          | Rpap1   | < 0,01 | 10,33       | 5                   | 0                |
| Q09143     | High affinity cationic amino acid transporter 1                 | Slc7a1  | < 0,01 | 8,56        | 4                   | 0                |
| Q6ZPJ0     | Testis-expressed sequence 2 protein                             | Tex2    | < 0,01 | 8,54        | 4                   | 0                |
| Q7M6Z4     | Kinesin-like protein KIF27                                      | Kif27   | < 0,01 | 8,32        | 5                   | 0                |
| Q5SRY7     | F-box/WD repeat-containing protein 11                           | Fbxw11  | < 0,01 | 7,33        | 4                   | 0                |
| Q61586     | Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, mitochondrial           | Gpam    | < 0,01 | 6,64        | 5                   | 0                |
| Q80TE7     | Leucine-rich repeat-containing protein 7                        | Lrrc7   | < 0,05 | 6,51        | 4                   | 1                |
| Q9CR21     | Acyl carrier protein, mitochondrial                             | Ndufab1 | < 0,01 | 6,16        | 5                   | 0                |
| P53811     | Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform              | Pitpnb  | < 0,01 | 5,90        | 5                   | 0                |
| Q9CQJ6     | Density-regulated protein                                       | Denr    | < 0,01 | 5,59        | 5                   | 0                |
| O55047     | Serine/threonine-protein kinase tousel-like 2                   | Tlk2    | < 0,01 | 5,46        | 5                   | 0                |
| Q4KWH5     | 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1 | Plch1   | < 0,01 | 5,27        | 5                   | 0                |
| Q9CQC9     | GTP-binding protein SAR1b                                       | Sar1b   | < 0,01 | 5,17        | 5                   | 1                |
| A6X919     | Probable C-mannosyltransferase DPY19L1                          | Dpy19l1 | < 0,01 | 5,03        | 5                   | 0                |
| Q99LS3     | Phosphoserine phosphatase                                       | Psph    | < 0,01 | 4,97        | 5                   | 0                |
| Q61324     | Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2                | Arnt2   | < 0,05 | 4,82        | 5                   | 1                |
| Q80YE7     | Death-associated protein kinase 1                               | Dapk1   | < 0,01 | 4,57        | 5                   | 0                |
| P63042     | Stathmin-4  | Stmn4   | < 0,01 | 4,47        | 5                   | 0                |
| Q5PR73     | GTP-binding protein Di-Ras2                                     | Diras2  | < 0,01 | 4,36        | 5                   | 0                |
| P55264     | Adenosine kinase  | Adk     | < 0,01 | 4,23        | 5                   | 0                |
| Q5H8C4     | Vacuolar protein sorting-associated protein 13A                 | Vps13a  | < 0,01 | 4,21        | 5                   | 0                |
| Q9D8T7     | SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial    | Slirp   | < 0,01 | 4,11        | 5                   | 0                |
| Q9DB15     | 39S ribosomal protein L12, mitochondrial                        | Mrpl12  | < 0,01 | 4,04        | 5                   | 0                |
| P43346     | Deoxycytidine kinase  | Dck     | < 0,01 | 3,93        | 4                   | 0                |

|        |  |          |        |      |   |   |
|--------|--|----------|--------|------|---|---|
| P11531 | Dystrophin   | Dmd      | < 0,01 | 3,76 | 5 | 1 |
| Q80VJ3 | 2-deoxynucleoside 5-phosphate N-hydrolase 1          | Dnph1    | < 0,01 | 3,75 | 4 | 0 |
| Q8R3L2 | Transcription factor 25                              | Tcf25    | < 0,01 | 3,73 | 5 | 0 |
| P97346 | Nucleoredoxin  | Nxn      | < 0,01 | 3,72 | 5 | 1 |
| P28867 | Protein kinase C delta type                          | Prkcd    | < 0,01 | 3,71 | 5 | 0 |
| Q62426 | Cystatin-B   | Cstb     | < 0,01 | 3,68 | 5 | 0 |
| Q8C145 | Zinc transporter ZIP6                                | Slc39a6  | < 0,01 | 3,65 | 5 | 1 |
| Q6A009 | E3 ubiquitin-protein ligase listerin                 | Ltn1     | < 0,01 | 3,54 | 5 | 0 |
| Q9DC04 | Regulator of G-protein signaling 3                   | Rgs3     | < 0,01 | 3,48 | 5 | 0 |
| Q9CXX9 | CUE domain-containing protein 2                      | Cuedc2   | < 0,01 | 3,43 | 5 | 0 |
| Q8R323 | Replication factor C subunit 3                       | Rfc3     | < 0,05 | 3,42 | 3 | 0 |
| P50171 | Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8                    | Hsd17b8  | < 0,01 | 3,41 | 5 | 0 |
| Q9WU42 | Nuclear receptor corepressor 2                       | Ncor2    | < 0,05 | 3,28 | 5 | 1 |
| Q60987 | Forkhead box protein G1                              | Foxg1    | < 0,05 | 3,25 | 5 | 2 |
| Q811W0 | Transcription factor SOX-21                          | Sox21    | < 0,01 | 3,23 | 4 | 0 |
| P70441 | Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1      | Slc9a3r1 | < 0,01 | 3,19 | 5 | 0 |
| Q6P9L6 | Kinesin-like protein KIF15                           | Kif15    | < 0,01 | 3,14 | 5 | 0 |
| Q8C078 | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 | Camkk2   | < 0,05 | 3,12 | 5 | 0 |
| A2AIV2 | Protein virilizer homolog                            | Kiaa1429 | < 0,05 | 3,10 | 4 | 0 |
| P56818 | Beta-secretase 1                                     | Bace1    | < 0,01 | 3,09 | 5 | 0 |
| Q8K409 | DNA polymerase beta                                  | Polb     | < 0,01 | 3,07 | 4 | 0 |
| Q9R1T4 | Septin-6   | Sept6    | < 0,05 | 3,06 | 5 | 3 |
| Q68ED7 | CREB-regulated transcription coactivator 1           | Crtc1    | < 0,05 | 3,01 | 4 | 1 |
| Q9CW79 | Golgin subfamily A member 1                          | Golga1   | < 0,01 | 2,99 | 5 | 1 |
| Q8R3P6 | von Willebrand factor A domain-containing protein 9  | Vwa9     | < 0,01 | 2,96 | 5 | 0 |
| Q9DAK9 | 14 kDa phosphohistidine phosphatase                  | Phpt1    | < 0,01 | 2,95 | 4 | 0 |
| O55176 | E3 ubiquitin-protein ligase Praja-1                  | Pja1     | < 0,01 | 2,93 | 5 | 0 |
| Q922P8 | Transmembrane protein 132A                           | Tmem132a | < 0,01 | 2,92 | 5 | 0 |
| Q8R3H9 | Tetratricopeptide repeat protein 4                   | Ttc4     | < 0,01 | 2,92 | 5 | 0 |
| Q9JIA7 | Sphingosine kinase 2                                 | Sphk2    | < 0,01 | 2,88 | 5 | 0 |
| E9Q5F9 | Histone-lysine N-methyltransferase SETD2             | Setd2    | < 0,05 | 2,86 | 4 | 0 |
| Q8R3Y8 | Interferon regulatory factor 2-binding protein 1     | Irf2bp1  | < 0,01 | 2,85 | 4 | 0 |

|        |   |         |        |      |   |   |
|--------|---|---------|--------|------|---|---|
| Q8CIV8 | Tubulin-specific chaperone E                                      | Tbce    | < 0,01 | 2,84 | 5 | 0 |
| O70293 | G protein-coupled receptor kinase 6                               | Grk6    | < 0,01 | 2,84 | 5 | 0 |
| Q6PHZ2 | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta | Camk2d  | < 0,05 | 2,80 | 3 | 0 |
| Q8CJ61 | CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 4        | Cmtm4   | < 0,05 | 2,79 | 5 | 2 |
| P42859 | Huntingtin  | Htt     | < 0,01 | 2,76 | 5 | 0 |
| Q64324 | Syntaxin-binding protein 2  | Stxbp2  | < 0,05 | 2,74 | 5 | 0 |
| Q8BFV2 | PCI domain-containing protein 2                                   | Pcid2   | < 0,01 | 2,56 | 5 | 0 |
| Q9QWV9 | Cyclin-T1   | Ccnt1   | < 0,01 | 2,56 | 5 | 0 |
| Q6PHU5 | Sortilin  | Sort1   | < 0,05 | 2,54 | 4 | 0 |
| O08919 | Numb-like protein   | Numbl   | < 0,05 | 2,54 | 5 | 0 |
| Q9DCF9 | Translocon-associated protein subunit gamma                       | Ssr3    | < 0,05 | 2,53 | 4 | 0 |
| Q6PB70 | Anoctamin-8   | Ano8    | < 0,01 | 2,52 | 5 | 0 |
| Q9D892 | Inosine triphosphate pyrophosphatase                              | ltpa    | < 0,01 | 2,52 | 5 | 0 |
| Q14AX6 | Cyclin-dependent kinase 12  | Cdk12   | < 0,05 | 2,37 | 4 | 0 |
| Q9ESC8 | AF4/FMR2 family member 4  | Aff4    | < 0,05 | 2,37 | 5 | 0 |
| P33174 | Chromosome-associated kinesin KIF4                                | Kif4    | < 0,01 | 2,33 | 4 | 0 |
| Q5XG73 | Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5                      | Acbd5   | < 0,01 | 2,32 | 5 | 0 |
| P21447 | Multidrug resistance protein 1A                                   | Abcb1a  | < 0,05 | 2,31 | 5 | 0 |
| P17156 | Heat shock-related 70 kDa protein 2                               | Hspa2   | < 0,05 | 2,30 | 5 | 0 |
| Q60790 | Ras GTPase-activating protein 3                                   | Rasa3   | < 0,05 | 2,26 | 5 | 1 |
| E9PZJ8 | Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3                | Ascc3   | < 0,01 | 2,25 | 4 | 0 |
| Q922R5 | Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3B      | Smek2   | < 0,05 | 2,24 | 4 | 0 |
| P24472 | Glutathione S-transferase A4                                      | Gsta4   | < 0,05 | 2,24 | 4 | 0 |
| Q68FF7 | SLAIN motif-containing protein 1                                  | Slain1  | < 0,05 | 2,23 | 4 | 0 |
| Q8BVI4 | Dihydropteridine reductase  | Qdpr    | < 0,05 | 2,22 | 5 | 4 |
| A2AG50 | MAP7 domain-containing protein 2                                  | Map7d2  | < 0,01 | 2,22 | 5 | 0 |
| Q9ES56 | Trafficking protein particle complex subunit 4                    | Trappc4 | < 0,05 | 2,19 | 4 | 0 |
| O55017 | Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha-1B         | Cacna1b | < 0,01 | 2,19 | 5 | 0 |
| Q7TME0 | Lipid phosphate phosphatase-related protein type 4                | Lppr4   | < 0,05 | 2,18 | 5 | 0 |
| P16330 | 2,3-cyclic-nucleotide 3-phosphodiesterase                         | Cnp     | < 0,05 | 2,17 | 4 | 0 |
| Q8CIQ7 | Dedicator of cytokinesis protein 3                                | Dock3   | < 0,05 | 2,15 | 5 | 1 |
| Q9CZ30 | Obg-like ATPase 1   | Ola1    | < 0,05 | 2,15 | 5 | 5 |
| P33215 | Protein NEDD1   | Nedd1   | < 0,05 | 2,11 | 5 | 1 |

|        |   |          |        |      |   |   |
|--------|---|----------|--------|------|---|---|
| Q8K2Y9 | Cerebral cavernous malformations protein 2 homolog            | Ccm2     | < 0,05 | 2,08 | 4 | 0 |
| Q9D1G5 | Leucine-rich repeat-containing protein 57                     | Lrrc57   | < 0,05 | 2,04 | 5 | 2 |
| P41216 | Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1                           | Acs1     | < 0,05 | 1,96 | 4 | 0 |
| Q9CQV7 | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14 | Dnajc19  | < 0,05 | 1,95 | 2 | 0 |
| O54790 | Transcription factor MafG                                     | Mafg     | < 0,05 | 1,94 | 4 | 0 |
| Q8CG76 | Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2                      | Akr7a2   | < 0,05 | 1,92 | 5 | 3 |
| P70340 | Mothers against decapentaplegic homolog 1                     | Smad1    | < 0,05 | 1,88 | 5 | 0 |
| Q9QXJ1 | Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1   | Apbb1    | < 0,05 | 1,83 | 4 | 0 |
| Q62101 | Serine/threonine-protein kinase D1                            | Prkd1    | < 0,05 | 1,82 | 5 | 0 |
| Q9JJU8 | SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein            | Sh3bgr1  | < 0,05 | 1,79 | 5 | 5 |
| Q9CQS4 | Solute carrier family 25 member 46                            | Slc25a46 | < 0,05 | 1,75 | 4 | 1 |
| Q8JZR6 | Electroneutral sodium bicarbonate exchanger 1                 | Slc4a8   | < 0,05 | 1,72 | 4 | 0 |
| P01027 | Complement C3   | C3       | < 0,05 | 1,72 | 5 | 5 |
| P61957 | Small ubiquitin-related modifier 2                            | Sumo2    | < 0,05 | 1,64 | 5 | 5 |
| Q8VCW8 | Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial            | Acsf2    | < 0,05 | 1,63 | 5 | 5 |
| Q8BK63 | Casein kinase I isoform alpha                                 | Csnk1a1  | < 0,05 | 1,59 | 5 | 5 |
| Q9WUA6 | RAC-gamma serine/threonine-protein kinase                     | Akt3     | < 0,05 | 1,52 | 5 | 5 |

**Tabelle 12: Signifikant hochregulierte Proteine HFD+MF vs. HFD**

Insgesamt waren 109 Proteine in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zu der HFD-Gruppe signifikant (q-Wert < 0,05) und relevant (Fold change  $\geq$  1,5) hochreguliert. In beiden Versuchsgruppen wurden jeweils 5 Tiere für den Vergleich berücksichtigt. Neben dem q-Wert und der Fold change werden in dieser Tabelle die Protein-ID, der Proteinname, das Gen und die valid values angegeben. Die Sortierung der Tabelle erfolgte nach der Fold change in absteigender Reihenfolge.

| Protein-ID | Proteinname                                 | Gen   | q-Wert | Fold change | valid values HFD+MF | valid values HFD |
|------------|---|-------|--------|-------------|---------------------|------------------|
| E9PZM4     | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 2 | Chd2  | < 0,01 | -571,08     | 0                   | 5                |
| Q3UHD1     | Brain-specific angiogenesis inhibitor 1     | Bai1  | < 0,01 | -44,78      | 0                   | 5                |
| P62843     | 40S ribosomal protein S15                   | Rps15 | < 0,01 | -31,39      | 0                   | 5                |
| O88597     | Beclin-1                                    | Becn1 | < 0,01 | -19,84      | 1                   | 5                |

|        |  |         |        |        |   |   |
|--------|--|---------|--------|--------|---|---|
| Q9D7G0 | Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1   | Prps1   | < 0,01 | -17,85 | 0 | 5 |
| P62137 | Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit               | Ppp1ca  | < 0,01 | -15,60 | 2 | 5 |
| Q9D3D9 | ATP synthase subunit delta, mitochondrial                                      | Atp5d   | < 0,01 | -14,58 | 1 | 5 |
| Q61070 | Etoposide-induced protein 2.4  | Ei24    | < 0,01 | -12,69 | 0 | 5 |
| P56382 | ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial                                    | Atp5e   | < 0,01 | -12,53 | 0 | 5 |
| Q4ACU6 | SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3                              | Shank3  | < 0,01 | -11,32 | 0 | 4 |
| Q5SSZ5 | Tensin-3   | Tns3    | < 0,01 | -11,00 | 0 | 5 |
| P62305 | Small nuclear ribonucleoprotein E  | Snrpe   | < 0,01 | -10,69 | 0 | 5 |
| Q69ZK6 | Probable JmjC domain-containing histone demethylation protein 2C               | Jmjd1c  | < 0,01 | -9,97  | 0 | 4 |
| P19536 | Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial                                 | Cox5b   | < 0,01 | -8,05  | 0 | 5 |
| Q9QXV1 | Chromobox protein homolog 8  | Cbx8    | < 0,01 | -7,87  | 0 | 5 |
| P83870 | PHD finger-like domain-containing protein 5A                                   | Phf5a   | < 0,01 | -6,48  | 0 | 5 |
| Q6PDK2 | Histone-lysine N-methyltransferase 2D  | Kmt2d   | < 0,01 | -6,39  | 0 | 5 |
| P32233 | Developmentally-regulated GTP-binding protein 1                                | Drg1    | < 0,01 | -5,99  | 0 | 5 |
| P35486 | Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial | Pdha1   | < 0,01 | -5,78  | 0 | 5 |
| Q63810 | Calcineurin subunit B type 1   | Ppp3r1  | < 0,01 | -5,77  | 0 | 5 |
| Q05AH6 | Spindlin interactor and repressor of chromatin-binding protein                 | Spindoc | < 0,05 | -5,74  | 0 | 3 |
| P63087 | Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit               | Ppp1cc  | < 0,01 | -5,73  | 5 | 5 |
| P21126 | Ubiquitin-like protein 4A  | Ubl4a   | < 0,01 | -5,50  | 1 | 5 |
| O55128 | Histone deacetylase complex subunit SAP18                                      | Sap18   | < 0,01 | -5,44  | 4 | 5 |
| P40336 | Vacuolar protein sorting-associated protein 26A                                | Vps26a  | < 0,01 | -5,36  | 0 | 5 |
| P62141 | Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit                | Ppp1cb  | < 0,01 | -5,35  | 0 | 5 |
| P83882 | 60S ribosomal protein L36a   | Rpl36a  | < 0,01 | -5,19  | 3 | 5 |
| Q6ZWU9 | 40S ribosomal protein S27  | Rps27   | < 0,01 | -4,92  | 0 | 5 |
| Q8BMB3 | Eukaryotic translation initiation factor 4E type 2                             | Eif4e2  | < 0,01 | -4,90  | 0 | 5 |
| O35594 | Intraflagellar transport protein 81 homolog                                    | Ift81   | < 0,05 | -4,34  | 0 | 1 |

|        |  |           |        |       |   |   |
|--------|--|-----------|--------|-------|---|---|
| P83917 | Chromobox protein homolog 1  | Cbx1      | < 0,05 | -4,32 | 0 | 5 |
| Q9CQF3 | Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5            | Nudt21    | < 0,05 | -4,26 | 4 | 5 |
| Q64523 | Histone H2A type 2-C   | Hist2h2ac | < 0,01 | -4,24 | 0 | 4 |
| Q60692 | Proteasome subunit beta type-6                                       | Psmb6     | < 0,01 | -4,18 | 5 | 5 |
| Q9QZD9 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I                 | Eif3i     | < 0,01 | -4,16 | 5 | 5 |
| Q9R1P3 | Proteasome subunit beta type-2                                       | Psmb2     | < 0,01 | -4,14 | 5 | 5 |
| Q8VC31 | Coiled-coil domain-containing protein 9                              | Ccdc9     | < 0,01 | -4,12 | 0 | 5 |
| P60867 | 40S ribosomal protein S20  | Rps20     | < 0,01 | -4,06 | 4 | 5 |
| O35658 | Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial | C1qbp     | < 0,01 | -3,87 | 5 | 5 |
| O09061 | Proteasome subunit beta type-1                                       | Psmb1     | < 0,01 | -3,86 | 5 | 5 |
| Q6PE01 | U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein                    | Snrnp40   | < 0,01 | -3,85 | 2 | 5 |
| Q9JHJ0 | Tropomodulin-3   | Tmod3     | < 0,01 | -3,78 | 0 | 4 |
| Q9D7B6 | Isobutyryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial                          | Acad8     | < 0,01 | -3,70 | 0 | 4 |
| Q6PDM2 | Serine/arginine-rich splicing factor 1                               | Srsf1     | < 0,01 | -3,62 | 5 | 5 |
| Q9D0B0 | Serine/arginine-rich splicing factor 9                               | Srsf9     | < 0,01 | -3,60 | 0 | 5 |
| Q8R1S0 | Ubiquinone biosynthesis monooxygenase COQ6, mitochondrial            | Coq6      | < 0,01 | -3,56 | 0 | 5 |
| O70378 | ER membrane protein complex subunit 8                                | Emc8      | < 0,05 | -3,47 | 2 | 5 |
| O88630 | Golgi SNAP receptor complex member 1                                 | Gosr1     | < 0,05 | -3,46 | 1 | 5 |
| Q91WM3 | U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2                         | Rrp9      | < 0,01 | -3,44 | 0 | 5 |
| P57784 | U2 small nuclear ribonucleoprotein A                                 | Snrpa1    | < 0,01 | -3,37 | 5 | 5 |
| Q61205 | Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma          | Pafah1b3  | < 0,01 | -3,35 | 0 | 5 |
| P14131 | 40S ribosomal protein S16  | Rps16     | < 0,01 | -3,34 | 5 | 5 |
| Q9DCC8 | Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog                  | Tomm20    | < 0,01 | -3,30 | 0 | 5 |
| P62858 | 40S ribosomal protein S28  | Rps28     | < 0,01 | -3,29 | 5 | 5 |
| P26339 | Chromogranin-A   | Chga      | < 0,01 | -3,28 | 0 | 5 |
| Q9CXL3 | Uncharacterized protein C7orf50 homolog                              |           | < 0,01 | -3,25 | 0 | 5 |
| Q8BP67 | 60S ribosomal protein L24  | Rpl24     | < 0,01 | -3,22 | 5 | 5 |
| Q6DID5 | PWWP domain-containing protein MUM1                                  | Mum1      | < 0,01 | -3,18 | 0 | 4 |
| Q8K209 | G-protein coupled receptor 56  | Gpr56     | < 0,01 | -3,18 | 0 | 5 |

|        |  |          |        |       |   |   |
|--------|--|----------|--------|-------|---|---|
| Q8BYH8 | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9                                | Chd9     | < 0,01 | -3,15 | 0 | 4 |
| Q91XD7 | Cysteine-rich with EGF-like domain protein 1                               | Crel1    | < 0,05 | -3,13 | 0 | 2 |
| Q6PH08 | ERC protein 2  | Erc2     | < 0,01 | -3,13 | 0 | 5 |
| Q9CZX8 | 40S ribosomal protein S19  | Rps19    | < 0,01 | -3,08 | 5 | 5 |
| Q9QUM9 | Proteasome subunit alpha type-6  | Psm6     | < 0,01 | -3,08 | 5 | 5 |
| Q9D0M1 | Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1                 | Prpsap1  | < 0,01 | -3,07 | 0 | 5 |
| Q9CQA3 | Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial    | Sdhb     | < 0,01 | -3,07 | 5 | 5 |
| Q6ZQB6 | Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 2 | Ppip5k2  | < 0,01 | -3,02 | 0 | 5 |
| Q9JJI8 | 60S ribosomal protein L38  | Rpl38    | < 0,01 | -2,97 | 1 | 5 |
| Q9CQN7 | 39S ribosomal protein L41, mitochondrial                                   | Mrpl41   | < 0,05 | -2,95 | 0 | 4 |
| P11352 | Glutathione peroxidase 1   | Gpx1     | < 0,01 | -2,94 | 0 | 5 |
| P99026 | Proteasome subunit beta type-4   | Psm4     | < 0,01 | -2,93 | 5 | 5 |
| P47915 | 60S ribosomal protein L29  | Rpl29    | < 0,01 | -2,87 | 5 | 5 |
| A2AR02 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G                                      | Ppig     | < 0,05 | -2,86 | 0 | 2 |
| Q8BH79 | Anoctamin-10   | Ano10    | < 0,01 | -2,81 | 0 | 5 |
| Q9R1P0 | Proteasome subunit alpha type-4  | Psm4     | < 0,01 | -2,80 | 5 | 5 |
| Q8BTU1 | Cilia- and flagella-associated protein 20                                  | Cfap20   | < 0,01 | -2,79 | 0 | 5 |
| Q6PGG6 | Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein                     | Gnl3l    | < 0,05 | -2,76 | 0 | 4 |
| O55234 | Proteasome subunit beta type-5   | Psm5     | < 0,01 | -2,74 | 5 | 5 |
| P62315 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1                                      | Snrpd1   | < 0,01 | -2,73 | 5 | 5 |
| Q8BU88 | 39S ribosomal protein L22, mitochondrial                                   | Mrpl22   | < 0,01 | -2,72 | 0 | 4 |
| Q9R1P1 | Proteasome subunit beta type-3   | Psm3     | < 0,01 | -2,72 | 5 | 5 |
| Q8R035 | Peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial                                | Ict1     | < 0,05 | -2,71 | 0 | 5 |
| Q9ERF3 | WD repeat-containing protein 61  | Wdr61    | < 0,05 | -2,71 | 0 | 5 |
| P70362 | Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog                             | Ufd1l    | < 0,01 | -2,70 | 5 | 5 |
| Q9CR51 | V-type proton ATPase subunit G 1   | Atp6v1g1 | < 0,05 | -2,70 | 4 | 5 |
| Q8K2B3 | Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial   | Sdha     | < 0,01 | -2,70 | 5 | 5 |
| Q9CQJ2 | PIH1 domain-containing protein 1   | Pih1d1   | < 0,05 | -2,68 | 2 | 5 |
| P59708 | Splicing factor 3B subunit 6   | Sf3b6    | < 0,05 | -2,66 | 0 | 5 |
| Q9Z2U0 | Proteasome subunit alpha type-7  | Psm7     | < 0,01 | -2,66 | 5 | 5 |
| Q99NE5 | Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1                          | Rims1    | < 0,01 | -2,65 | 0 | 5 |

|        |  |         |        |       |   |   |
|--------|--|---------|--------|-------|---|---|
| A2ABV5 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14               | Med14   | < 0,01 | -2,65 | 0 | 5 |
| P31650 | Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 3                    | Slc6a11 | < 0,05 | -2,64 | 0 | 4 |
| P03888 | NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1                               | Mtnd1   | < 0,05 | -2,64 | 1 | 5 |
| Q62011 | Podoplanin   | Pdpn    | < 0,01 | -2,64 | 0 | 5 |
| Q9DB77 | Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial                     | Uqcrc2  | < 0,05 | -2,62 | 5 | 5 |
| Q8BTW3 | Exosome complex component MTR3                                       | Exosc6  | < 0,01 | -2,61 | 4 | 5 |
| Q6PFX7 | Neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adapter 1 | Nyap1   | < 0,01 | -2,59 | 0 | 4 |
| P84104 | Serine/arginine-rich splicing factor 3                               | Srsf3   | < 0,01 | -2,57 | 5 | 5 |
| Q8BL97 | Serine/arginine-rich splicing factor 7                               | Srsf7   | < 0,01 | -2,57 | 5 | 5 |
| Q08481 | Platelet endothelial cell adhesion molecule                          | Pecam1  | < 0,01 | -2,55 | 0 | 4 |
| Q9D0F4 | NF-kappa-B-activating protein  | Nkap    | < 0,05 | -2,51 | 0 | 4 |
| Q9Z2U1 | Proteasome subunit alpha type-5                                      | Psma5   | < 0,01 | -2,51 | 5 | 5 |
| Q3TWW8 | Serine/arginine-rich splicing factor 6                               | Srsf6   | < 0,01 | -2,48 | 5 | 5 |
| P62317 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2                                | Snrpd2  | < 0,01 | -2,44 | 5 | 5 |
| P62320 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3                                | Snrpd3  | < 0,01 | -2,43 | 5 | 5 |
| Q9JJK7 | Tropomodulin-2   | Tmod2   | < 0,05 | -2,42 | 5 | 5 |
| P21107 | Tropomyosin alpha-3 chain  | Tpm3    | < 0,05 | -2,39 | 5 | 5 |
| Q9D855 | Cytochrome b-c1 complex subunit 7                                    | Uqcrb   | < 0,05 | -2,38 | 0 | 3 |
| Q9D162 | Coiled-coil domain-containing protein 167                            | Ccdc167 | < 0,05 | -2,37 | 0 | 4 |
| Q62093 | Serine/arginine-rich splicing factor 2                               | Srsf2   | < 0,01 | -2,37 | 5 | 5 |
| Q8CES0 | N-alpha-acetyltransferase 30   | Naa30   | < 0,05 | -2,35 | 0 | 5 |
| Q8R574 | Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2           | Prpsap2 | < 0,05 | -2,35 | 5 | 5 |
| P50136 | 2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial          | Bckdha  | < 0,05 | -2,34 | 0 | 4 |
| Q9CQL5 | 39S ribosomal protein L18, mitochondrial                             | Mrpl18  | < 0,05 | -2,34 | 0 | 4 |
| P35290 | Ras-related protein Rab-24   | Rab24   | < 0,05 | -2,34 | 0 | 4 |
| Q8BH97 | Reticulocalbin-3   | Rcn3    | < 0,05 | -2,30 | 2 | 5 |
| P49722 | Proteasome subunit alpha type-2                                      | Psma2   | < 0,01 | -2,26 | 5 | 5 |
| Q62083 | PRKCA-binding protein  | Pick1   | < 0,01 | -2,24 | 0 | 4 |
| Q8BX10 | Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5, mitochondrial            | Pgam5   | < 0,05 | -2,20 | 5 | 5 |
| Q91W53 | Golgin subfamily A member 7  | Golga7  | < 0,05 | -2,19 | 1 | 5 |
| P70195 | Proteasome subunit beta type-7                                       | Psmb7   | < 0,01 | -2,18 | 5 | 5 |
| Q5DTT2 | PH and SEC7 domain-containing protein 1                              | Psd     | < 0,05 | -2,18 | 0 | 5 |

|        |  |           |        |       |   |   |
|--------|--|-----------|--------|-------|---|---|
| Q922E4 | Ethanolamine-phosphate<br>cytidyltransferase             | Pcyt2     | < 0,05 | -2,17 | 0 | 5 |
| Q810A3 | Tetratricopeptide repeat protein 9C                      | Ttc9c     | < 0,05 | -2,17 | 0 | 5 |
| Q9QZ06 | Toll-interacting protein                                 | Tollip    | < 0,05 | -2,14 | 0 | 3 |
| Q9CPR5 | 39S ribosomal protein L15,<br>mitochondrial              | Mrpl15    | < 0,05 | -2,13 | 3 | 5 |
| P62996 | Transformer-2 protein homolog beta                       | Tra2b     | < 0,01 | -2,10 | 5 | 5 |
| Q6IRU2 | Tropomyosin alpha-4 chain                                | Tpm4      | < 0,05 | -2,08 | 5 | 5 |
| P84096 | Rho-related GTP-binding protein RhoG                     | Rhog      | < 0,05 | -2,07 | 0 | 5 |
| P62908 | 40S ribosomal protein S3                                 | Rps3      | < 0,01 | -2,07 | 5 | 5 |
| Q9R1P4 | Proteasome subunit alpha type-1                          | Psma1     | < 0,01 | -2,06 | 5 | 5 |
| P97351 | 40S ribosomal protein S3a                                | Rps3a     | < 0,01 | -2,02 | 5 | 5 |
| P27048 | Small nuclear ribonucleoprotein-<br>associated protein B | Snrpb     | < 0,05 | -2,02 | 5 | 5 |
| Q9JIH2 | Nuclear pore complex protein Nup50                       | Nup50     | < 0,05 | -2,01 | 5 | 5 |
| Q8K190 | SAYSvFN domain-containing protein 1                      | Saysd1    | < 0,01 | -2,00 | 0 | 5 |
| P63276 | 40S ribosomal protein S17                                | Rps17     | < 0,05 | -2,00 | 5 | 5 |
| P62264 | 40S ribosomal protein S14                                | Rps14     | < 0,01 | -2,00 | 5 | 5 |
| Q8K4M5 | COMM domain-containing protein 1                         | Commd1    | < 0,05 | -1,99 | 0 | 5 |
| Q9CYH6 | Ribosome biogenesis regulatory<br>protein homolog        | Rrs1      | < 0,05 | -1,98 | 1 | 2 |
| P62855 | 40S ribosomal protein S26                                | Rps26     | < 0,01 | -1,97 | 5 | 5 |
| P62270 | 40S ribosomal protein S18                                | Rps18     | < 0,05 | -1,96 | 5 | 5 |
| Q6ZWY9 | Histone H2B type 1-C/E/G                                 | Hist1h2bc | < 0,01 | -1,96 | 5 | 5 |
| Q9CQ06 | 39S ribosomal protein L24,<br>mitochondrial              | Mrpl24    | < 0,05 | -1,96 | 2 | 5 |
| Q9D0J8 | Parathymosin   | Ptms      | < 0,05 | -1,94 | 5 | 5 |
| O08912 | Polypeptide N-<br>acetylgalactosaminyltransferase 1      | Galnt1    | < 0,01 | -1,93 | 0 | 5 |
| Q8R146 | Acylamino-acid-releasing enzyme                          | Apeh      | < 0,05 | -1,93 | 0 | 5 |
| Q9D415 | Disks large-associated protein 1                         | Dlgap1    | < 0,05 | -1,92 | 0 | 5 |
| P62242 | 40S ribosomal protein S8                                 | Rps8      | < 0,01 | -1,92 | 5 | 5 |
| Q8BU04 | Putative E3 ubiquitin-protein ligase<br>UBR7             | Ubr7      | < 0,05 | -1,90 | 4 | 0 |
| Q9CPW4 | Actin-related protein 2/3 complex<br>subunit 5           | Arpc5     | < 0,05 | -1,89 | 5 | 5 |
| P62849 | 40S ribosomal protein S24                                | Rps24     | < 0,01 | -1,87 | 5 | 5 |
| Q9R0U0 | Serine/arginine-rich splicing factor 10                  | Srsf10    | < 0,05 | -1,86 | 5 | 5 |
| Q9Z1Z2 | Serine-threonine kinase receptor-<br>associated protein  | Strap     | < 0,05 | -1,83 | 5 | 5 |
| P43276 | Histone H1.5   | Hist1h1b  | < 0,05 | -1,83 | 5 | 5 |
| P10922 | Histone H1.0   | H1f0      | < 0,05 | -1,83 | 5 | 5 |
| Q5DU14 | Unconventional myosin-XVI                                | Myo16     | < 0,05 | -1,80 | 0 | 5 |
| Q8VE97 | Serine/arginine-rich splicing factor 4                   | Srsf4     | < 0,05 | -1,79 | 5 | 5 |

|        |  |          |        |       |   |   |
|--------|--|----------|--------|-------|---|---|
| P43277 | Histone H1.3                                       | Hist1h1d | < 0,05 | -1,79 | 5 | 5 |
| P43274 | Histone H1.4                                       | Hist1h1e | < 0,05 | -1,78 | 5 | 5 |
| Q9Z2N8 | Actin-like protein 6A                              | Actl6a   | < 0,05 | -1,78 | 5 | 5 |
| Q9D1B9 | 39S ribosomal protein L28,<br>mitochondrial        | Mrpl28   | < 0,05 | -1,78 | 5 | 5 |
| Q62203 | Splicing factor 3A subunit 2                       | Sf3a2    | < 0,05 | -1,77 | 5 | 5 |
| Q9CRB2 | H/ACA ribonucleoprotein complex<br>subunit 2       | Nhp2     | < 0,05 | -1,75 | 4 | 5 |
| Q68FL4 | Putative adenosylhomocysteinase 3                  | Ahcy12   | < 0,05 | -1,75 | 0 | 5 |
| P62754 | 40S ribosomal protein S6                           | Rps6     | < 0,05 | -1,74 | 5 | 5 |
| Q9CWZ3 | RNA-binding protein 8A                             | Rbm8a    | < 0,05 | -1,73 | 5 | 5 |
| P38647 | Stress-70 protein, mitochondrial                   | Hspa9    | < 0,05 | -1,72 | 5 | 5 |
| P51410 | 60S ribosomal protein L9                           | Rpl9     | < 0,05 | -1,72 | 5 | 5 |
| Q9DCL9 | Multifunctional protein ADE2                       | Paics    | < 0,05 | -1,71 | 5 | 5 |
| O70435 | Proteasome subunit alpha type-3                    | Psm3     | < 0,05 | -1,68 | 5 | 5 |
| Q3V1L4 | Cytosolic purine 5-nucleotidase                    | Nt5c2    | < 0,05 | -1,67 | 5 | 5 |
| Q9EPR5 | VPS10 domain-containing receptor<br>SorCS2         | Sorcs2   | < 0,05 | -1,64 | 0 | 4 |
| Q8BHN3 | Neutral alpha-glucosidase AB                       | Ganab    | < 0,05 | -1,64 | 5 | 5 |
| Q91VC3 | Eukaryotic initiation factor 4A-III                | Eif4a3   | < 0,05 | -1,62 | 5 | 5 |
| Q9CSN1 | SNW domain-containing protein 1                    | Snw1     | < 0,05 | -1,62 | 5 | 5 |
| P20152 | Vimentin   | Vim      | < 0,01 | -1,62 | 5 | 5 |
| Q9QXT0 | Protein canopy homolog 2                           | Cnpy2    | < 0,05 | -1,61 | 5 | 5 |
| P25444 | 40S ribosomal protein S2                           | Rps2     | < 0,05 | -1,61 | 5 | 5 |
| Q91V09 | WD repeat-containing protein 13                    | Wdr13    | < 0,05 | -1,60 | 5 | 5 |
| Q8C0E2 | Vacuolar protein sorting-associated<br>protein 26B | Vps26b   | < 0,01 | -1,59 | 5 | 5 |
| P62281 | 40S ribosomal protein S11                          | Rps11    | < 0,05 | -1,58 | 5 | 5 |
| P35979 | 60S ribosomal protein L12                          | Rpl12    | < 0,05 | -1,58 | 5 | 5 |
| P62830 | 60S ribosomal protein L23                          | Rpl23    | < 0,05 | -1,56 | 5 | 5 |
| P62245 | 40S ribosomal protein S15a                         | Rps15a   | < 0,05 | -1,55 | 5 | 5 |
| Q64012 | RNA-binding protein Raly                           | Raly     | < 0,05 | -1,53 | 5 | 5 |
| Q9D903 | Probable rRNA-processing protein<br>EBP2           | Ebna1bp2 | < 0,05 | -1,53 | 5 | 5 |
| Q9Z2D8 | Methyl-CpG-binding domain protein 3                | Mbd3     | < 0,05 | -1,52 | 5 | 5 |
| Q9CR00 | 26S proteasome non-ATPase<br>regulatory subunit 9  | Psm9     | < 0,05 | -1,50 | 5 | 5 |

**Tabelle 13: Signifikant runterregulierte Proteine HFD+MF vs. HFD**

Insgesamt waren 188 Proteine in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zu der HFD-Gruppe signifikant (q-Wert < 0,05) und relevant (Fold change  $\geq$  1,5) runterreguliert. In beiden Versuchsgruppen wurden jeweils 5 Tiere für den Vergleich berücksichtigt. Neben dem q-Wert und der Fold change werden in dieser Tabelle die Protein-ID, der Proteinname, das Gen und die valid values angegeben. Die Sortierung der Tabelle erfolgte nach der Fold change in absteigender Reihenfolge.

#### 4.2.3.3 SD+MF vs. SD

| Protein-ID | Proteinname   | Gen       | q-Wert | Fold change | valid values SD+MF | valid values SD |
|------------|---|-----------|--------|-------------|--------------------|-----------------|
| Q6WKZ8     | E3 ubiquitin-protein ligase UBR2                                | Ubr2      | < 0,01 | 59,79       | 4                  | 0               |
| P0C090     | Roquin-2  | Rc3h2     | < 0,01 | 38,45       | 4                  | 0               |
| Q61324     | Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2                | Arnt2     | < 0,01 | 14,39       | 4                  | 0               |
| P09922     | Interferon-induced GTP-binding protein Mx1                      | Mx1       | < 0,01 | 14,36       | 4                  | 0               |
| Q5SSZ5     | Tensin-3  | Tns3      | < 0,01 | 7,56        | 3                  | 0               |
| Q8R323     | Replication factor C subunit 3                                  | Rfc3      | < 0,01 | 6,49        | 4                  | 0               |
| Q06194     | Coagulation factor VIII   | F8        | < 0,01 | 6,45        | 4                  | 1               |
| P97346     | Nucleoredoxin   | Nxn       | < 0,05 | 5,40        | 4                  | 0               |
| Q61062     | Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-3              | Dvl3      | < 0,01 | 5,08        | 4                  | 0               |
| P58064     | 28S ribosomal protein S6, mitochondrial                         | Mrps6     | < 0,01 | 4,48        | 4                  | 0               |
| Q8BH60     | Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein   | Gopc      | < 0,01 | 4,10        | 4                  | 0               |
| P43346     | Deoxycytidine kinase  | Dck       | < 0,01 | 3,81        | 4                  | 0               |
| Q8R3V6     | CUE domain-containing protein 1                                 | Cuedc1    | < 0,01 | 3,64        | 4                  | 0               |
| Q4KWH5     | 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1 | Plch1     | < 0,01 | 3,62        | 4                  | 0               |
| Q6DIC0     | Probable global transcription activator SNF2L2                  | Smarca2   | < 0,05 | 3,41        | 4                  | 0               |
| O70293     | G protein-coupled receptor kinase 6                             | Grk6      | < 0,01 | 3,38        | 4                  | 0               |
| E9PZJ8     | Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3              | Ascc3     | < 0,05 | 3,22        | 4                  | 0               |
| Q921E6     | Polycomb protein EED  | Eed       | < 0,05 | 2,85        | 4                  | 0               |
| Q8R035     | Peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial                     | Ict1      | < 0,01 | 2,76        | 4                  | 0               |
| Q64523     | Histone H2A type 2-C  | Hist2h2ac | < 0,05 | 2,43        | 4                  | 0               |
| Q68FF7     | SLAIN motif-containing protein 1                                | Slain1    | < 0,01 | 2,32        | 3                  | 0               |
| D3YXK1     | Atherin   | Samd1     | < 0,05 | 2,29        | 4                  | 0               |

**Tabelle 14: Signifikant hochregulierte Proteine SD+MF vs. SD**

Insgesamt waren 22 Proteine in der SD+MF-Gruppe im Vergleich zu der SD-Gruppe signifikant (q-Wert < 0,05) und relevant (Fold change  $\geq$  1,5) hochreguliert. In der Gruppe SD+MF wurden 4 Tiere und in der Gruppe SD wurden 5 Tiere für den Vergleich berücksichtigt. Neben dem q-Wert und der Fold change werden in dieser Tabelle die Protein-ID, der Proteinname, das Gen und die valid values angegeben. Die Sortierung der Tabelle erfolgte nach der Fold change in absteigender Reihenfolge.

| Protein-ID | Proteinname  | Gen      | q-Wert | Fold change | valid values SD+MF | valid values SD |
|------------|--|----------|--------|-------------|--------------------|-----------------|
| Q3UV17     | Keratin, type II cytoskeletal 2 oral                           | Krt76    | < 0,01 | -198,62     | 0                  | 5               |
| Q60870     | Receptor expression-enhancing protein 5                        | Reep5    | < 0,01 | -69,88      | 0                  | 5               |
| O88597     | Beclin-1   | Becn1    | < 0,01 | -66,74      | 0                  | 5               |
| Q05AH6     | Spindlin interactor and repressor of chromatin-binding protein | Spindoc  | < 0,05 | -10,46      | 1                  | 5               |
| Q80W14     | Pre-mRNA-processing factor 40 homolog B                        | Prpf40b  | < 0,01 | -8,67       | 0                  | 5               |
| Q91WJ7     | SPATS2-like protein  | Spats2l  | < 0,01 | -8,64       | 0                  | 5               |
| P13705     | DNA mismatch repair protein Msh3                               | Msh3     | < 0,05 | -7,65       | 0                  | 4               |
| P97363     | Serine palmitoyltransferase 2                                  | Sptlc2   | < 0,05 | -7,36       | 0                  | 4               |
| Q64331     | Unconventional myosin-VI                                       | Myo6     | < 0,01 | -6,75       | 0                  | 5               |
| O35638     | Cohesin subunit SA-2   | Stag2    | < 0,01 | -6,19       | 0                  | 5               |
| Q6ZPJ0     | Testis-expressed sequence 2 protein                            | Tex2     | < 0,01 | -5,92       | 0                  | 5               |
| Q9D2N4     | Dystrobrevin alpha   | Dtna     | < 0,01 | -5,39       | 0                  | 5               |
| Q8VCX5     | Calcium uptake protein 1, mitochondrial                        | Micu1    | < 0,05 | -5,23       | 0                  | 4               |
| P15105     | Glutamine synthetase   | Glul     | < 0,05 | -4,94       | 0                  | 4               |
| P40240     | CD9 antigen  | Cd9      | < 0,05 | -4,93       | 0                  | 4               |
| Q8BGR9     | Ubiquitin-like domain-containing CTD phosphatase 1             | Ublcp1   | < 0,05 | -4,77       | 0                  | 4               |
| Q811W0     | Transcription factor SOX-21                                    | Sox21    | < 0,05 | -4,32       | 0                  | 5               |
| Q8CGU1     | Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 1    | Calcoco1 | < 0,01 | -4,27       | 0                  | 5               |
| P05532     | Mast/stem cell growth factor receptor Kit                      | Kit      | < 0,05 | -4,23       | 0                  | 4               |
| Q8C6A8     | Class E basic helix-loop-helix protein 22                      | Bhlhe22  | < 0,01 | -4,19       | 0                  | 3               |
| Q8QZY9     | Splicing factor 3B subunit 4                                   | Sf3b4    | < 0,01 | -4,16       | 0                  | 5               |
| Q91WF7     | Polyphosphoinositide phosphatase                               | Fig4     | < 0,05 | -4,05       | 0                  | 4               |
| Q8BU11     | TOX high mobility group box family member 4                    | Tox4     | < 0,05 | -4,02       | 0                  | 4               |
| Q3UQA7     | Selenoprotein H  | Selh     | < 0,01 | -3,70       | 0                  | 4               |
| Q9WTI7     | Unconventional myosin-Ic                                       | Myo1c    | < 0,01 | -3,40       | 0                  | 4               |
| Q3UFY8     | Mitochondrial ribonuclease P protein 1                         | Trmt10c  | < 0,01 | -3,30       | 0                  | 4               |
| Q8CIV2     | Membralin  | Tmem259  | < 0,05 | -3,25       | 0                  | 4               |
| Q6P1G0     | HEAT repeat-containing protein 6                               | Heatr6   | < 0,05 | -2,86       | 0                  | 4               |
| Q8CC21     | Tetratricopeptide repeat protein 19, mitochondrial             | Ttc19    | < 0,05 | -2,70       | 0                  | 4               |
| Q6DID5     | PWWP domain-containing protein MUM1                            | Mum1     | < 0,01 | -2,70       | 0                  | 5               |
| P63080     | Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-3                | Gabrb3   | < 0,05 | -2,54       | 0                  | 5               |
| Q99J47     | Dehydrogenase/reductase SDR family member 7B                   | Dhrs7b   | < 0,01 | -2,44       | 0                  | 5               |
| Q9Z199     | Transcription elongation factor SPT4-B                         | Supt4h1b | < 0,05 | -2,40       | 0                  | 5               |

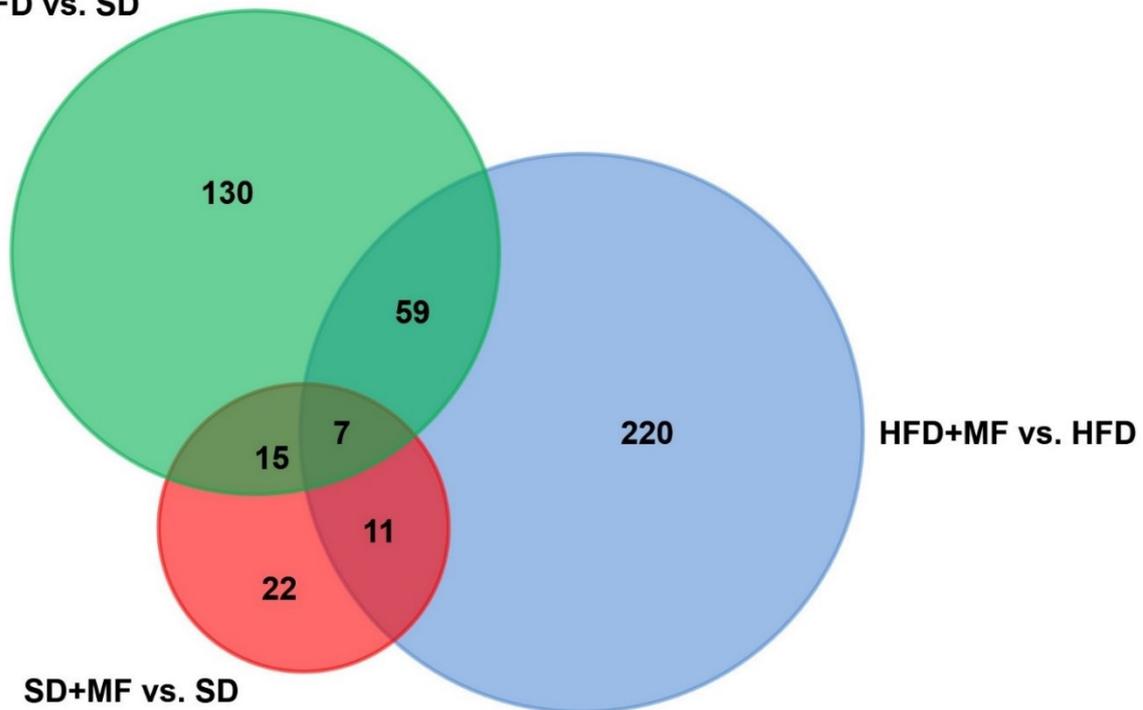
**Tabelle 15: Signifikant runterregulierte Proteine SD+MF vs. SD**

Insgesamt waren 33 Proteine in der SD+MF-Gruppe im Vergleich zu der SD-Gruppe signifikant ( $q$ -Wert  $< 0,05$ ) und relevant (Fold change  $\geq 1,5$ ) runterreguliert. In der Gruppe SD+MF wurden 4 Tiere und in der Gruppe SD wurden 5 Tiere für den Vergleich berücksichtigt. Neben dem  $q$ -Wert und der Fold change werden in dieser Tabelle die Protein-ID, der Proteinname, das Gen und die valid values angegeben. Die Sortierung der Tabelle erfolgte nach der Fold change in absteigender Reihenfolge.

#### 4.2.4 Venn-Diagramm

In diesem Kapitel wird mittels eines Venn-Diagramms (Abb. 6), das mithilfe der Software *Funrich* erstellt wurde, visualisiert, wie viele Proteine in den 3 Vergleichen HFD vs. SD, HFD+MF vs. HFD und SD+MF vs. SD signifikant ( $q$ -Wert  $< 0,05$ ) und relevant (Fold change  $\geq 1,5$ ) verändert waren. Zudem kann mittels des Venn-Diagramms dargestellt werden, wie viele dieser Proteine in 2 oder allen 3 Vergleichen signifikant und relevant veränderten waren und sich somit in den Gruppenvergleichen überschneiden. Die Proteine, die sich in den Gruppenvergleichen überschneiden, werden am Ende dieses Kapitels tabellarisch aufgeführt. Im Vergleich HFD+MF vs. HFD waren insgesamt 297 Proteine relevant und signifikant verändert. Im Vergleich HFD vs. SD waren es insgesamt 211 Proteine, die signifikant und relevant verändert waren. Im Vergleich SD+MF vs. SD waren 55 Proteine signifikant und relevant verändert (s. ebenfalls Kapitel 4.2.3). In den Vergleichen HFD vs. SD und HFD+MF vs. HFD wurden in beiden Vergleichen 66 identische Proteine als relevant und signifikant verändert identifiziert. 45 dieser Proteine wiesen eine gegengleiche Regulation auf, 21 der Proteine waren in dieselbe Richtung hoch- bzw. runterreguliert (Tabelle 16). Im Vergleich HFD+MF vs. HFD und SD+MF vs. SD waren insgesamt 18 selbe Proteine relevant und signifikant verändert. 12 dieser Proteine waren in dieselbe Richtung hoch- bzw. runterreguliert, 6 Proteine waren gegengleich reguliert (Tabelle 17). Im Vergleich HFD vs. SD und im Vergleich SD+MF vs. SD waren 22 selbe Proteine relevant und signifikant verändert. Alle 22 Proteine waren in den Gruppen HFD und SD+MF gegenüber SD in dieselbe Richtung hoch- bzw. runterreguliert (Tabelle 18). Es gab insgesamt 7 Proteine (Krt76, Tex2, Sox21, Tns3, Spindoc, Hist2h2ac, Ict1), die in allen 3 Vergleichen relevant und signifikant verändert waren.

HFD vs. SD



**Abb. 6: Venn-Diagramm der signifikant und relevant veränderten Proteine aller Gruppenvergleiche**

Nach Isolierung der Proteine erfolgte eine massenspektrometrische Detektion ebendieser. Eine weitere Analyse der detektierten Proteine erfolgte mittels *MaxQuant* und *Perseus*. Die signifikant ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ) und relevant (Fold Change  $\geq 1,5$ ) veränderten Proteine, die in allen Gruppenvergleichen identifiziert wurden, wurden mithilfe der Software *FunRich* in einem Venn-Diagramm dargestellt. Dabei wurde festgestellt, dass es zwischen HFD vs. SD und HFD+MF vs. HFD 66 Proteine gibt, die sich überschneiden. Im Vergleich von HFD vs. SD und SD+MF vs. SD wurden 22 gleiche Proteine als relevant und signifikant verändert identifiziert. Im Vergleich von HFD+MF vs. HFD und SD+MF vs. SD wurden 18 sich überschneidende Proteine festgestellt. 7 Proteine überlappten sich in allen 3 Gruppenvergleichen.

Die nachfolgenden 3 Tabellen präsentieren Proteine, die in mehreren Gruppenvergleichen überschneidend sowohl signifikant als auch relevant verändert waren. In Tabelle 16 sind jene Proteine aufgeführt, die sowohl im Gruppenvergleich HFD vs. SD als auch im Gruppenvergleich HFD+MF vs. HFD signifikant und relevant verändert waren. Tabelle 17 zeigt die Proteine, die in den Gruppenvergleichen HFD+MF vs. HFD und SD+MF vs. SD überschneidend signifikant und relevant verändert waren. In der Tabelle 18 werden die Proteine dargestellt, die in den Gruppenvergleichen HFD vs. SD und SD+MF vs. SD überschneidend signifikant und relevant verändert waren.

| Protein IDs | Proteinname                          | Gen   | HFD vs. SD |             | HFD+MF vs. HFD |             |
|-------------|--------------------------------------|-------|------------|-------------|----------------|-------------|
|             |                                      |       | Regulation | Fold change | Regulation     | Fold change |
| Q3UV17      | Keratin, type II cytoskeletal 2 oral | Krt76 | ↓          | -166,91     | ↑              | 111,34      |
| Q6ZPJ0      | Testis-expressed sequence 2 protein  | Tex2  | ↓          | -12,14      | ↑              | 8,54        |
| Q5SSZ5      | Tensin-3                             | Tns3  | ↑          | 11,74       | ↓              | -11,00      |

|        |  |          |   |       |   |       |
|--------|--|----------|---|-------|---|-------|
| Q60974 | Nuclear receptor corepressor 1   | Ncor1    | ↓ | -9,16 | ↑ | 20,87 |
| Q9D855 | Cytochrome b-c1 complex subunit 7  | Uqcrb    | ↓ | -6,30 | ↓ | -2,38 |
| O35594 | Intraflagellar transport protein 81 homolog                                    | Ift81    | ↓ | -5,64 | ↓ | -4,34 |
| P70441 | Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1                                | Slc9a3r1 | ↓ | -5,38 | ↑ | 3,19  |
| Q811W0 | Transcription factor SOX-21  | Sox21    | ↓ | -5,25 | ↑ | 3,23  |
| O55047 | Serine/threonine-protein kinase tousled-like 2                                 | Tlk2     | ↓ | -4,88 | ↑ | 5,46  |
| P03888 | NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1   | Mtnd1    | ↑ | 4,77  | ↓ | -2,64 |
| Q05AH6 | Spindlin interactor and repressor of chromatin-binding protein                 | Spindoc  | ↓ | -4,77 | ↓ | -5,74 |
| Q9DB15 | 39S ribosomal protein L12, mitochondrial                                       | Mrpl12   | ↓ | -4,72 | ↑ | 4,04  |
| Q9D8T7 | SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial                   | Slirp    | ↓ | -4,50 | ↑ | 4,11  |
| P35486 | Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial | Pdha1    | ↓ | -4,48 | ↓ | -5,78 |
| Q9DB77 | Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial                               | Uqcrc2   | ↓ | -4,46 | ↓ | -2,62 |
| Q9CQC9 | GTP-binding protein SAR1b  | Sar1b    | ↓ | -4,35 | ↑ | 5,17  |
| Q9DCF9 | Translocon-associated protein subunit gamma                                    | Ssr3     | ↓ | -4,02 | ↑ | 2,53  |
| Q9WU42 | Nuclear receptor corepressor 2   | Ncor2    | ↓ | -3,96 | ↑ | 3,28  |
| Q99LS3 | Phosphoserine phosphatase  | Psph     | ↓ | -3,81 | ↑ | 4,97  |
| Q9CQJ6 | Density-regulated protein  | Denr     | ↓ | -3,79 | ↑ | 5,59  |
| Q6ZQB6 | Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 2     | Ppip5k2  | ↑ | 3,70  | ↓ | -3,02 |
| Q6PHZ2 | Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta              | Camk2d   | ↓ | -3,43 | ↑ | 2,80  |
| Q62426 | Cystatin-B   | Cstb     | ↓ | -3,29 | ↑ | 3,68  |
| A2AIV2 | Protein virilizer homolog  | Kiaa1429 | ↓ | -3,25 | ↑ | 3,10  |
| Q8C145 | Zinc transporter ZIP6  | Slc39a6  | ↓ | -3,19 | ↑ | 3,65  |
| Q8BYH8 | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9                                    | Chd9     | ↑ | 3,18  | ↓ | -3,15 |
| Q9CXL3 | Uncharacterized protein C7orf50 homolog  |          | ↑ | 3,13  | ↓ | -3,25 |

|        |  |              |   |       |   |        |
|--------|--|--------------|---|-------|---|--------|
| Q64523 | Histone H2A type 2-C   | Hist2h2ac    | ↑ | 3,04  | ↓ | -4,24  |
| P62137 | Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit     | Ppp1ca       | ↓ | -3,02 | ↓ | -15,60 |
| Q9JJK7 | Tropomodulin-2   | Tmod2        | ↓ | -3,00 | ↓ | -2,42  |
| Q9CQF3 | Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5            | Nudt21       | ↓ | -2,99 | ↓ | -4,26  |
| Q99NE5 | Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1                    | Rims1        | ↑ | 2,89  | ↓ | -2,65  |
| Q9D415 | Disks large-associated protein 1                                     | Dlgap1       | ↑ | 2,82  | ↓ | -1,92  |
| Q8K409 | DNA polymerase beta  | Polb         | ↓ | -2,82 | ↑ | 3,07   |
| Q9CW79 | Golgin subfamily A member 1  | Golga1       | ↓ | -2,82 | ↑ | 2,99   |
| P62141 | Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit      | Ppp1cb       | ↓ | -2,80 | ↓ | -5,35  |
| P63042 | Stathmin-4   | Stmn4        | ↓ | -2,75 | ↑ | 4,47   |
| A6X919 | Probable C-mannosyltransferase DPY19L1                               | Dpy19l1      | ↓ | -2,73 | ↑ | 5,03   |
| P62843 | 40S ribosomal protein S15  | Rps15        | ↓ | -2,73 | ↓ | -31,39 |
| Q922P8 | Transmembrane protein 132A   | Tmem132a     | ↓ | -2,66 | ↑ | 2,92   |
| P26339 | Chromogranin-A   | Chga         | ↑ | 2,62  | ↓ | -3,28  |
| Q62011 | Podoplanin   | Pdpn         | ↑ | 2,57  | ↓ | -2,64  |
| Q8R035 | Peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial                          | Ict1         | ↑ | 2,57  | ↓ | -2,71  |
| A2AR02 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase G                                | Ppig         | ↓ | -2,52 | ↓ | -2,86  |
| P28867 | Protein kinase C delta type  | Prkcd (PKCδ) | ↓ | -2,43 | ↑ | 3,71   |
| O55176 | E3 ubiquitin-protein ligase Praja-1                                  | Pja1         | ↓ | -2,41 | ↑ | 2,93   |
| Q9JHJ0 | Tropomodulin-3   | Tmod3        | ↓ | -2,38 | ↓ | -3,78  |
| Q922E4 | Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase                            | Pcyt2        | ↑ | 2,33  | ↓ | -2,17  |
| Q9D3D9 | ATP synthase subunit delta, mitochondrial                            | Atp5d        | ↓ | -2,33 | ↓ | -14,58 |
| O55128 | Histone deacetylase complex subunit SAP18                            | Sap18        | ↓ | -2,32 | ↓ | -5,44  |
| Q6PFX7 | Neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adapter 1 | Nyap1        | ↑ | 2,29  | ↓ | -2,59  |
| P62270 | 40S ribosomal protein S18  | Rps18        | ↓ | -2,24 | ↓ | -1,96  |

|        |   |          |   |       |   |       |
|--------|---|----------|---|-------|---|-------|
| Q9JIA7 | Sphingosine kinase 2  | Sphk2    | ↓ | -2,24 | ↑ | 2,88  |
| Q62083 | PRKCA-binding protein   | Pick1    | ↑ | 2,20  | ↓ | -2,24 |
| Q61205 | Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma   | Pafah1b3 | ↓ | -2,19 | ↓ | -3,35 |
| Q6PE01 | U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein             | Snrnp40  | ↓ | -2,15 | ↓ | -3,85 |
| Q9QZD9 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I          | Eif3i    | ↓ | -2,12 | ↓ | -4,16 |
| P83882 | 60S ribosomal protein L36a                                    | Rpl36a   | ↓ | -2,10 | ↓ | -5,19 |
| Q9CQV7 | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM14 | Dnajc19  | ↓ | -2,06 | ↑ | 1,95  |
| Q08481 | Platelet endothelial cell adhesion molecule                   | Pecam1   | ↑ | 2,04  | ↓ | -2,55 |
| Q62203 | Splicing factor 3A subunit 2                                  | Sf3a2    | ↓ | -1,95 | ↓ | -1,77 |
| Q8K190 | SAYSvFN domain-containing protein 1                           | Saysd1   | ↑ | 1,93  | ↓ | -2,00 |
| A2ABV5 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14        | Med14    | ↑ | 1,90  | ↓ | -2,65 |
| Q9JIH2 | Nuclear pore complex protein Nup50                            | Nup50    | ↑ | 1,89  | ↓ | -2,01 |
| P62855 | 40S ribosomal protein S26                                     | Rps26    | ↓ | -1,83 | ↓ | -1,97 |
| P61957 | Small ubiquitin-related modifier 2                            | Sumo2    | ↓ | -1,77 | ↑ | 1,64  |

**Tabelle 16: Signifikant und relevant veränderte Proteine HFD vs. SD und HFD+MF vs. HFD**

66 selbe Proteine waren sowohl im Vergleich HFD vs. SD als auch im Vergleich HFD+MF vs. HFD relevant (q-Wert < 0,05) und signifikant (Fold Change ≥ 1,5) verändert. 45 dieser Proteine wiesen eine gegengleiche Regulation auf, 21 der Proteine waren in dieselbe Richtung hochreguliert (↑) bzw. runterreguliert (↓). Die Proteine, deren Regulation in dieselbe Richtung erfolgte, sind in dieser Tabelle grau schattiert dargestellt. Die Sortierung der Proteine in dieser Tabelle erfolgt entlang der Fold change des Vergleichs HFD vs. SD in absteigender Reihenfolge. Aufgeführt sind zudem jeweils die Protein-ID, der Proteinname und das Gen. Pro Gruppe wurden 5 Tiere in der Analyse berücksichtigt.

| Protein IDs | Proteinname                                      | Gen   | SD+MF vs. SD |             | HFD+MF vs. HFD |             |
|-------------|--|-------|--------------|-------------|----------------|-------------|
|             |  |       | Regulation   | Fold change | Regulation     | Fold change |
| Q3UV17      | Keratin, type II cytoskeletal 2 oral             | Krt76 | ↓            | -198,62     | ↑              | 111,34      |
| O88597      | Beclin-1   | Becn1 | ↓            | -66,74      | ↓              | -19,84      |
| Q61324      | Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 | Arnt2 | ↑            | 14,39       | ↑              | 4,82        |

|        |   |           |   |        |   |        |
|--------|---|-----------|---|--------|---|--------|
| P09922 | Interferon-induced GTP-binding protein Mx1                      | Mx1       | ↑ | 14,36  | ↑ | 14,37  |
| Q05AH6 | Spindlin interactor and repressor of chromatin-binding protein  | Spindoc   | ↓ | -10,46 | ↓ | -5,74  |
| Q5SSZ5 | Tensin-3  | Tns3      | ↑ | 7,56   | ↓ | -11,00 |
| Q8R323 | Replication factor C subunit 3                                  | Rfc3      | ↑ | 6,49   | ↑ | 3,42   |
| Q6ZPJ0 | Testis-expressed sequence 2 protein                             | Tex2      | ↓ | -5,92  | ↑ | 8,54   |
| P97346 | Nucleoredoxin   | Nxn       | ↑ | 5,40   | ↑ | 3,72   |
| Q811W0 | Transcription factor SOX-21                                     | Sox21     | ↓ | -4,32  | ↑ | 3,23   |
| P43346 | Deoxycytidine kinase  | Dck       | ↑ | 3,81   | ↑ | 3,93   |
| Q4KWH5 | 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1 | Plch1     | ↑ | 3,62   | ↑ | 5,27   |
| O70293 | G protein-coupled receptor kinase 6                             | Grk6      | ↑ | 3,38   | ↑ | 2,84   |
| Q8R035 | Peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial                     | Ict1      | ↑ | 2,76   | ↓ | -2,71  |
| Q6DID5 | PWWP domain-containing protein MUM1                             | Mum1      | ↓ | -2,70  | ↓ | -3,18  |
| Q64523 | Histone H2A type 2-C  | Hist2h2ac | ↑ | 2,43   | ↓ | -4,24  |
| Q68FF7 | SLAIN motif-containing protein 1                                | Slain1    | ↑ | 2,32   | ↑ | 2,23   |
| E9PZJ8 | Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3              | Ascc3     | ↑ | 1,69   | ↑ | 2,25   |

**Tabelle 17: Signifikant und relevant veränderte Proteine SD+MF vs. SD und HFD+MF vs. HFD**

18 selbe Proteine waren in den beiden Gruppenvergleichen HFD+MF vs. HFD und SD+MF vs. SD signifikant (q-Wert < 0,05) und relevant (Fold Change ≥ 1,5) verändert. 12 dieser Proteine waren in dieselbe Richtung hochreguliert (↑) bzw. runterreguliert (↓), 6 Proteine wiesen eine gegengleiche Regulation auf. Die Proteine, die eine gegengleiche Regulation aufwiesen, sind in dieser Tabelle grau schattiert dargestellt. Die Sortierung der Proteine in dieser Tabelle erfolgt entlang der Fold change des Vergleichs SD+MF vs. SD in absteigender Reihenfolge. Aufgeführt ist zudem jeweils die Protein-ID, der Proteinname und das Gen. In der Gruppe SD+MF wurden 4 Tiere in der Analyse berücksichtigt, in den 3 anderen Gruppen jeweils 5 Tiere.

| Protein IDs | Proteinname                          | Gen   | HFD vs. SD |             | SD+MF vs. SD |             |
|-------------|--------------------------------------|-------|------------|-------------|--------------|-------------|
|             |                                      |       | Regulation | Fold change | Regulation   | Fold change |
| Q3UV17      | Keratin, type II cytoskeletal 2 oral | Krt76 | ↓          | -166,91     | ↓            | -198,62     |
| P0C090      | Roquin-2                             | Rc3h2 | ↑          | 36,84       | ↑            | 38,45       |

|        |  |           |   |        |   |       |
|--------|--|-----------|---|--------|---|-------|
| P97363 | Serine palmitoyltransferase 2                                  | Sptlc2    | ↓ | -12,67 | ↓ | -7,36 |
| Q6ZPJ0 | Testis-expressed sequence 2 protein                            | Tex2      | ↓ | -12,14 | ↓ | -5,92 |
| Q5SSZ5 | Tensin-3   | Tns3      | ↑ | 11,74  | ↑ | 7,56  |
| P13705 | DNA mismatch repair protein Msh3                               | Msh3      | ↓ | -10,97 | ↓ | -7,65 |
| P40240 | CD9 antigen  | Cd9       | ↓ | -6,03  | ↓ | -4,93 |
| Q61062 | Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-3             | Dvl3      | ↑ | 5,86   | ↑ | 5,08  |
| Q811W0 | Transcription factor SOX-21                                    | Sox21     | ↓ | -5,25  | ↓ | -4,32 |
| Q05AH6 | Spindlin interactor and repressor of chromatin-binding protein | Spindoc   | ↓ | -4,77  | ↓ | -0,46 |
| Q80W14 | Pre-mRNA-processing factor 40 homolog B                        | Prpf40b   | ↓ | -4,52  | ↓ | -8,67 |
| Q8BH60 | Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif-containing protein  | Gopc      | ↑ | 4,29   | ↑ | 4,10  |
| Q8QZY9 | Splicing factor 3B subunit 4                                   | Sf3b4     | ↓ | -3,93  | ↓ | -4,16 |
| P15105 | Glutamine synthetase   | Glul      | ↓ | -3,83  | ↓ | -4,94 |
| Q91WF7 | Polyphosphoinositide phosphatase                               | Fig4      | ↓ | -3,75  | ↓ | -4,05 |
| Q9WTI7 | Unconventional myosin-1c                                       | Myo1c     | ↓ | -3,38  | ↓ | -3,40 |
| Q64523 | Histone H2A type 2-C   | Hist2h2ac | ↑ | 3,04   | ↑ | 2,43  |
| Q6DIC0 | Probable global transcription activator SNF2L2                 | Smarca2   | ↑ | 2,88   | ↑ | 3,41  |
| Q3UQA7 | Selenoprotein H  | Selh      | ↓ | -2,65  | ↓ | -3,70 |
| Q8R3V6 | CUE domain-containing protein 1                                | Cuedc1    | ↑ | 2,57   | ↑ | 3,64  |
| Q8R035 | Peptidyl-tRNA hydrolase ICT1, mitochondrial                    | Ict1      | ↑ | 2,57   | ↑ | 2,76  |
| Q8CC21 | Tetatricopeptide repeat protein 19, mitochondrial              | Ttc19     | ↓ | -2,11  | ↓ | -2,70 |

**Tabelle 18: Signifikant und relevant veränderte Proteine HFD vs. SD und SD+MF vs. SD**

22 selbe Proteine waren in den beiden Gruppenvergleichen HFD vs. SD und SD+MF vs. SD signifikant (q-Wert < 0,05) und relevant (Fold Change  $\geq$  1,5) verändert. Alle 22 Proteine waren in dieselbe Richtung hoch- bzw. runterreguliert. Die Sortierung der Proteine in dieser Tabelle erfolgt entlang der Fold change des Vergleichs HFD vs. SD in absteigender Reihenfolge. Aufgeführt ist zudem jeweils die Protein-ID, der Proteinname und das Gen. In der Gruppe SD+MF wurden 4 Tiere in der Analyse berücksichtigt, in den 2 anderen Gruppen jeweils 5 Tiere.

#### 4.2.5 STRING-Analyse

Um mögliche Proteininteraktionen zwischen den signifikant (q-Wert < 0,05) und relevant (Fold Change  $\geq$  1,5) veränderten Proteinen in den entsprechenden Vergleichen zu identifizieren und potenzielle biologische Prozesse zu beleuchten, wurde für jeden Vergleich (HFD vs. SD; HFD+MF vs. HFD; SD+MF vs. SD) eine *STRING*-Analyse durchgeführt. Zusätzlich ermöglichte diese Analyse die Gruppierung von Proteinen nach funktionaler Ähnlichkeit, wodurch Proteine mit möglicherweise gemeinsamen biologischen Funktionen oder

Signalwegen identifiziert wurden. *STRING* gibt dabei sogenannte „functional enrichments“ an, die auf diese möglichen Funktionen, Signalwege und biologischen Prozesse hinweisen.

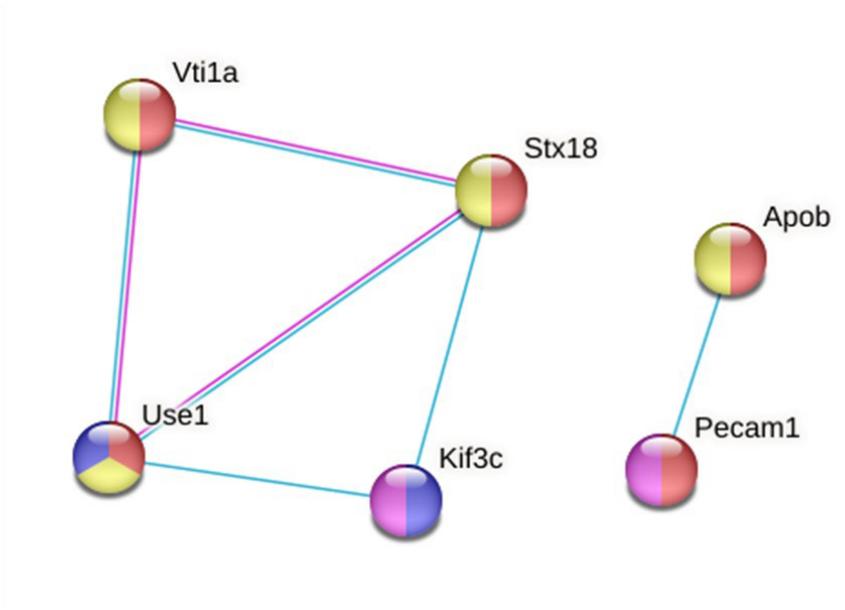
#### 4.2.5.1 HFD vs. SD

Mithilfe der *STRING*-Analyse konnten bei den insgesamt 60 hochregulierten Proteinen im Vergleich zwischen HFD und SD (Abb. 7a) 2 Cluster potenziell interagierender Proteine identifiziert werden. Das 1. Cluster umfasste die Proteine Use1, Vti1a, Stx18 und Kif3c, die alle eine Rolle beim intrazellulären Transport spielen. Das 2. Cluster bestand aus den Proteinen Pecam1, das unter anderem an der Regulation der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt ist, und Apob, das an der Regulation des Lipidstoffwechsels beteiligt ist. Von den insgesamt 60 hochregulierten Proteinen wurden die meisten Proteine, insgesamt 32 Proteine, dem biologischen Prozess der Organisation bzw. Biogenese zellulärer Komponenten zugeordnet. Zusätzlich konnten 20 der hochregulierten Proteine mittels *STRING* dem Hirngewebe zugeordnet werden. Unter diesen 20 Proteinen waren 5 (Rims1, Dlgap1, Pick1, Tor1a, Psd3) mit den *UniProt Knowledgebase* Schlüsselwörtern "Synapse" und "Zellverbindung" versehen, was darauf hindeutet, dass sie eine wichtige Rolle bei synaptischen Prozessen und Zellverbindungen spielen. 2 weitere Proteine, Gabra2 und Gopc, scheinen ebenfalls eine Rolle bei synaptischen Prozessen zu spielen, obwohl sie nicht explizit dem Hirngewebe zugeordnet werden. Weiterhin konnten 6 Proteine (Rims1, Pick1, Reep2, Rab31, Use1, Nup50), die dem Hirngewebe zugeordnet wurden, dem biologischen Prozess des Proteintransports zugeordnet werden.

Von den insgesamt 151 runterregulierten Proteinen im Vergleich HFD vs. SD (Abb. 7b) zeigten 91 Proteine in der *STRING*-Analyse eine potenzielle Interaktion. Die 4 größten Cluster umfassten eine Gruppierung von ribosomalen Proteinen, Proteinen, die an der Spliceosom-Aktivität beteiligt sind, solchen, die das Zytoskelett modulieren, sowie Proteinen, die eine Rolle in der mitochondrialen Atmungskette spielen. Darüber hinaus konnten 50 der runterregulierten Proteine allgemein dem Nervensystem zugeordnet werden, 32 dieser Proteine interagierten dabei mit mindestens einem weiteren Protein. Insgesamt 10 der runterregulierten Proteine in diesem Vergleich wurden mit der neurodegenerativen Krankheit Alzheimer-Demenz assoziiert. Diese Krankheit geht unter anderem mit einer Degeneration und einem Verlust von Neuronen im Hippocampus einher. 9 dieser Proteine (Uqcrb, Ndufv2, Uqcrc1, Ndufv1, Ndufa2, Ndufs1, Uqcrc2, Atp5b, Atp5d) spielen eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Atmungskette. Darüber hinaus konnten 47 der runterregulierten Proteine mittels *STRING* dem Hirngewebe zugeordnet werden, 30 dieser Proteine zeigen dabei eine potenzielle Interaktion zu mindestens einem weiteren Protein. 8 dieser Proteine (Actr1b, Ppp2cb, Ppp1ca, Ndufv2, Rack1, Pdhb, Tmod2, Hint1) wurden in der *STRING*-Analyse zudem speziell mit dem

Hippocampus in Verbindung gebracht. Weiterhin scheinen 19 Proteine, die dem Hirngewebe zugeordnet wurden, eine Rolle bei der Signaltransduktion zu spielen.

**a**



**b**

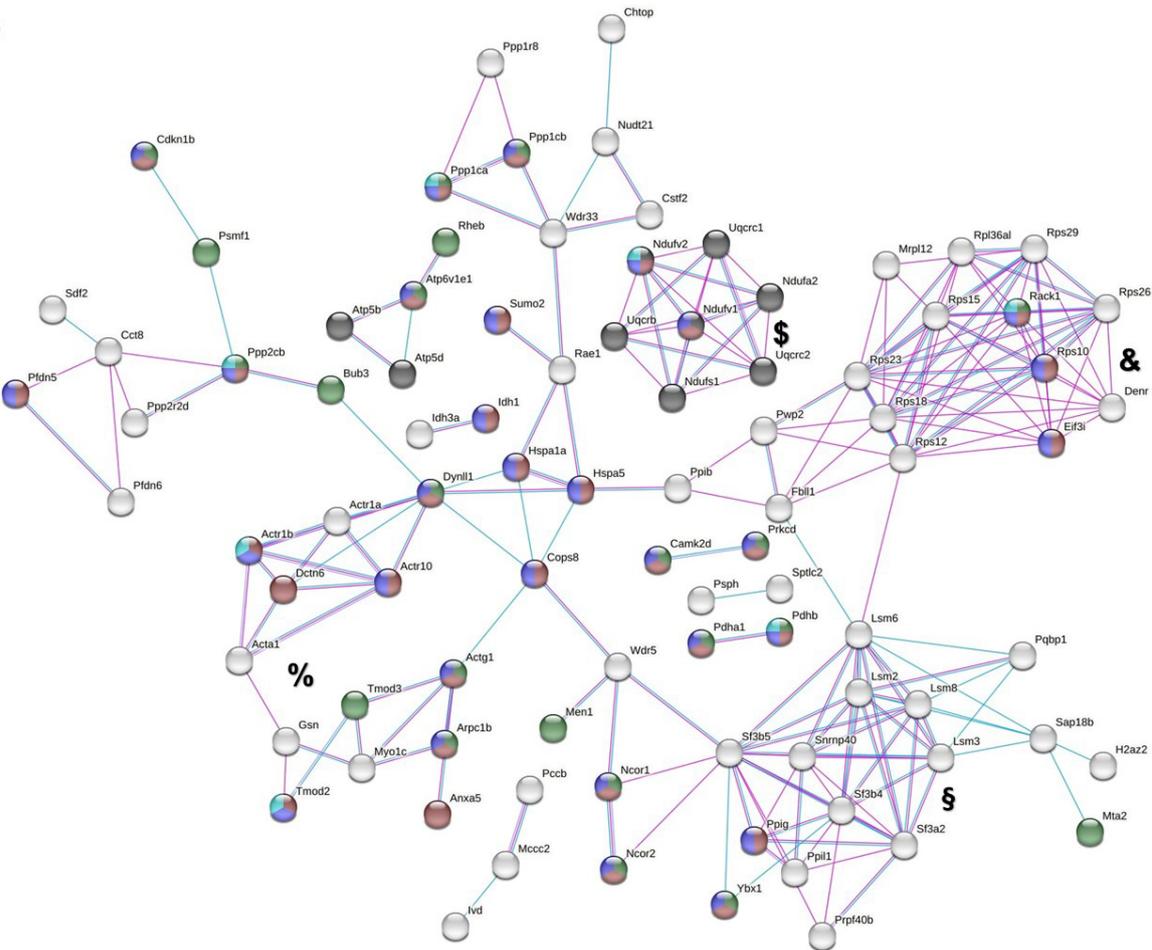


Abb. 7: STRING-Analyse signifikant und relevant veränderter Proteine im Vergleich HFD vs. SD

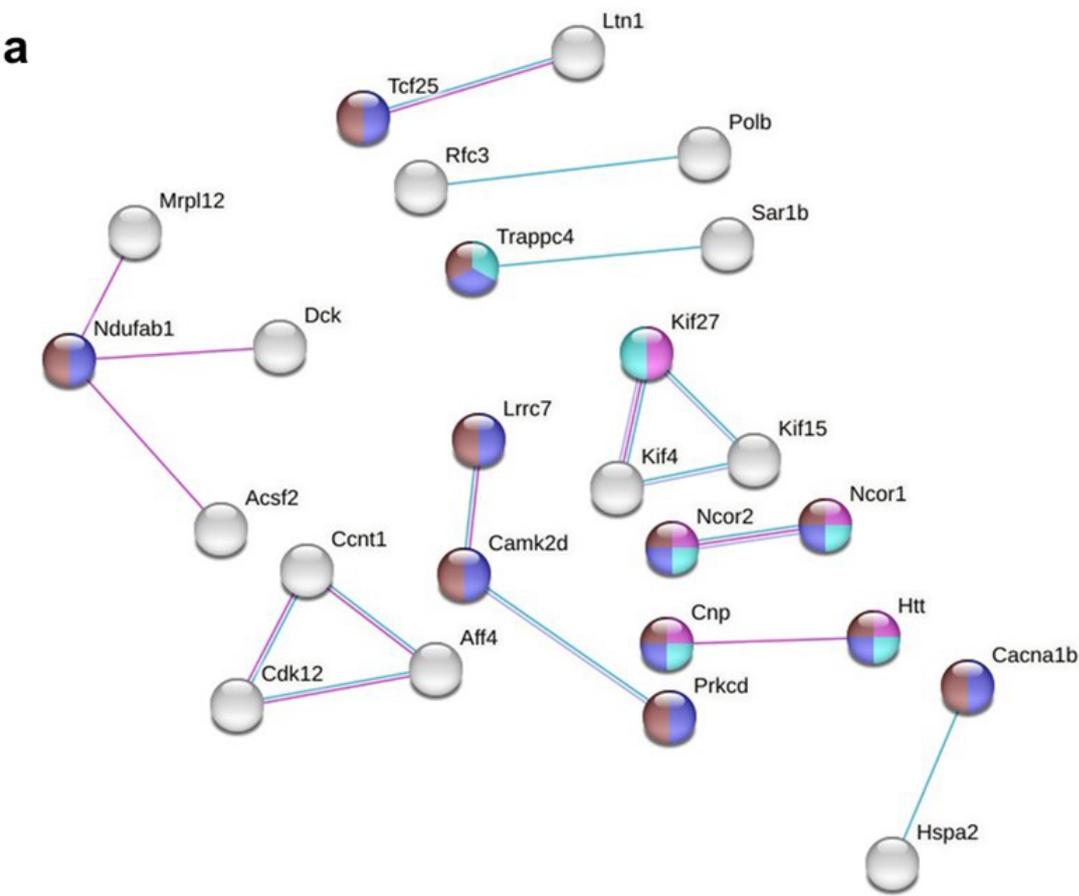
Nach Isolierung der Proteine erfolgte eine massenspektrometrische Detektion ebendieser. Eine weitere Analyse der detektierten Proteine erfolgte mittels *MaxQuant* und *Perseus*. Es erfolgte daraufhin eine *STRING*-Analyse, wobei nur die Proteine in *STRING* analysiert wurden, die sowohl signifikant ( $q$ -Wert  $< 0,05$ ) als auch relevant (Fold change  $\geq 1,5$ ) verändert waren. In dieser Abbildung sind die Proteine mit potenziellen Interaktionen dargestellt, die im Vergleich HFD vs. SD hochreguliert (a) bzw. runterreguliert (b) waren. Alle Proteine in diesem Vergleich, die keine Interaktion zu anderen Proteinen aufwiesen, werden in dieser Abbildung nicht dargestellt. Für die hochregulierten Proteine bildete sich ein Cluster bestehend aus Proteinen, die eine Rolle beim intrazellulären Transport spielen (Use1, Vti1a, Stx18 und Kif3c) und ein Cluster bestehend aus dem Protein Pecam1, einem Protein, das eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion spielt und dem Protein Apob, einem Protein des Lipidstoffwechsels. Die runterregulierten Proteine in diesem Vergleich gruppieren sich in mehrere Cluster, wobei die 4 größten Cluster Proteine der Atmungskette (§), des Spliceosoms (§), des Zytoskeletts (%) und ribosomale Proteine (&) umfassten. Die in dieser Abbildung dargestellten roten Kreise repräsentieren Proteine, die an der Organisation bzw. Biogenese zellulärer Komponenten beteiligt sind, gelbe Kreise zeigen Proteine an, die eine Rolle beim Proteintransport spielen, olivgrünen Kreise stellen Proteine dar, die an der Signaltransduktion beteiligt sind und rosa Kreise repräsentieren Proteine, die eine mögliche Rolle bei Zellverbindungen haben. Braune Kreise stellen Proteine dar, die dem Nervensystem zugehören, während die dunkelblauen Kreise für Proteine stehen, die dem Hirngewebe zugeordnet wurden. Die türkisenen Kreise stellen Proteine dar, die speziell dem Hippocampus zugeordnet wurden. Dunkelgraue Kreise repräsentieren Proteine, die eine Assoziation zur neurodegenerativen Erkrankung Alzheimer-Demenz hatten. Die Interaktionen zwischen den Proteinen sind durch rosa Linien, basierend auf experimentellen Daten, blaue Linien, basierend auf kuratierten Datenbanken, und lila Linien, basierend auf Protein-Homologien, dargestellt. n: HFD = 5, SD = 5

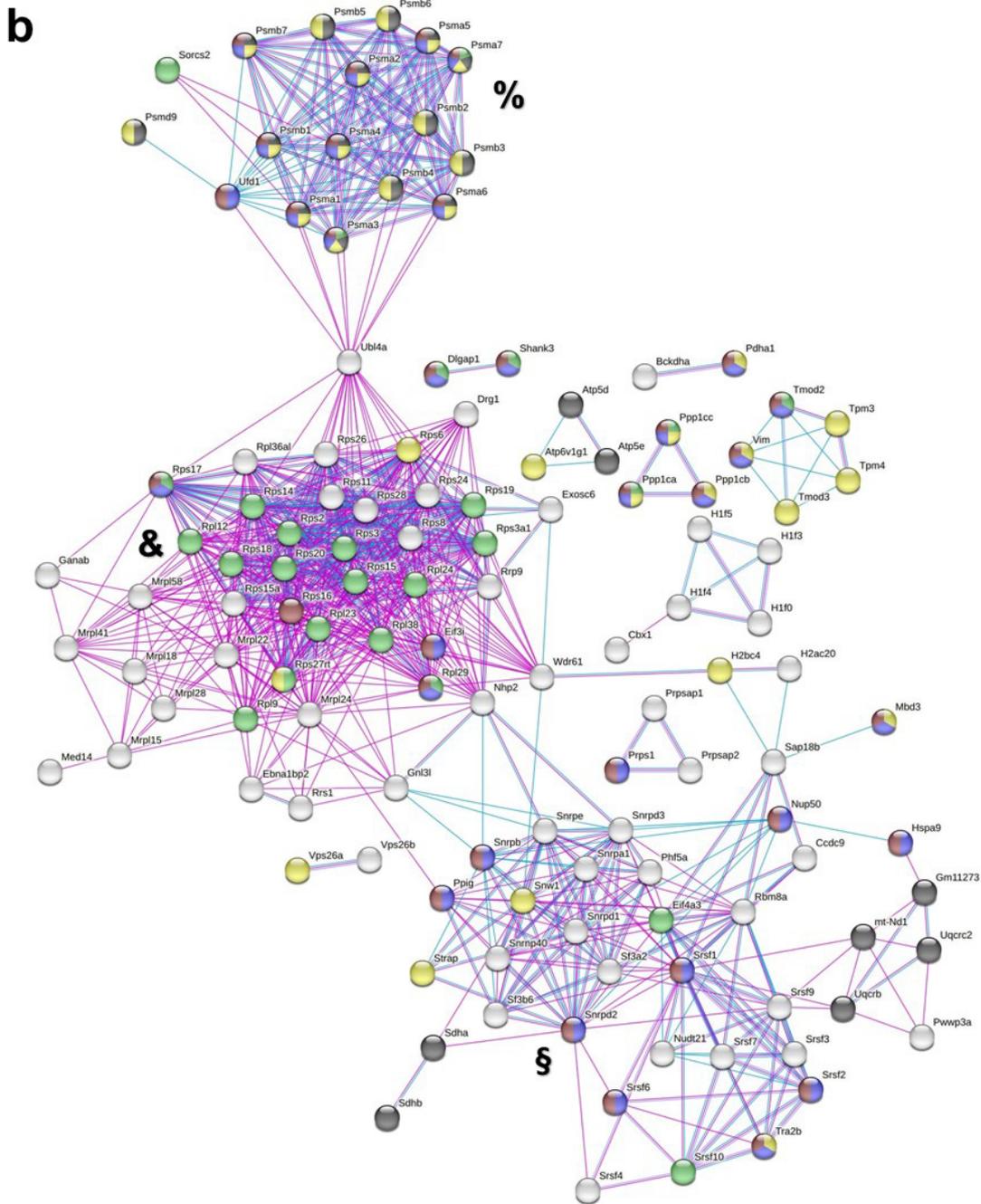
#### 4.2.5.2 HFD+MF vs. HFD

Die *STRING*-Analyse hat gezeigt, dass von den insgesamt 109 hochregulierten Proteinen im Vergleich zwischen HFD+MF und HFD 26 Proteine potenziell miteinander interagieren könnten (Abb. 8a). 25 der runterregulierten Proteine waren in *STRING* mit der Entwicklung des Nervensystems und 16 mit der Hirnentwicklung assoziiert. Die Proteine Setd2, Htt und Cnp, die sowohl mit der Hirnentwicklung als auch der Entwicklung des Nervensystems in Verbindung gebracht wurden, bildeten ein Cluster mit den Proteinen Cdk12, Aff4 und Ccnt1. Alle Proteine dieses Clusters spielen eine Rolle bei der Regulation der Genexpression. Zusätzlich bildeten die Proteine Ncor1 und Ncor2, die ebenfalls in *STRING* mit der Hirnentwicklung und der Entwicklung des Nervensystems assoziiert sind, ein eigenes Cluster. Abgesehen von der Hirnentwicklung und der Entwicklung des Nervensystems wurden 36 der 109 hochregulierten Proteine allgemein dem Hirngewebe und 38 der 109 Proteine allgemein dem Nervensystem zugeordnet. Abgesehen von den 2 bereits genannten Clustern, wurde auch das Cluster bestehend aus den Proteinen Lrrc7, Camk2d und Prkcd in *STRING* dem Hirngewebe und Nervensystem zugeordnet.

Unter den 188 Proteinen, die im Vergleich HFD+MF vs. HFD runterreguliert sind, zeigten 125 Proteine potenzielle Interaktionen (Abb. 8b). Die 3 größten Cluster umfassten dabei ribosomale Proteine, Proteine, die am Prozess des Spleißens beteiligt sind bzw. proteasomale Proteine. Von diesen 188 runterregulierten Proteinen konnten 47 dem Hirngewebe und 50 dem Nervensystem zugeordnet werden. Zusätzlich spielten 34 der runterregulierten Proteine eine Rolle im Bereich der Synapse. Des Weiteren konnten insgesamt 40 Proteine der Signaltransduktion zugeordnet werden, wobei 19 davon auch dem Hirngewebe zugeordnet wurden. Zusätzlich wurden 25 der runterregulierten Proteine in *STRING* mit der Alzheimer-Demenz assoziiert, wobei 15 dieser Proteine ein Cluster bildeten, das aus Proteinen des

Proteasoms besteht. Von den Proteinen, die mit der Alzheimer-Demenz assoziiert waren, wurden 11 in der *STRING*-Analyse dem Hirngewebe zugeordnet.





**Abb. 8: STRING-Analyse signifikant und relevant veränderter Proteine im Vergleich HFD+MF vs. HFD**

Nach Isolierung der Proteine erfolgte eine massenspektrometrische Detektion ebendieser. Eine weitere Analyse der detektierten Proteine erfolgte mittels *MaxQuant* und *Perseus*. Es erfolgte daraufhin eine *STRING*-Analyse, wobei nur die Proteine in *STRING* analysiert wurden, die sowohl signifikant ( $q$ -Wert  $< 0,05$ ) als auch relevant (Fold change  $\geq 1,5$ ) verändert waren. In dieser Abbildung sind die Proteine mit potenziellen Interaktionen dargestellt, die im Vergleich HFD+MF vs. HFD hochreguliert (a) bzw. runterreguliert (b) waren. Alle Proteine in diesem Vergleich, die keine Interaktion zu anderen Proteinen aufwiesen, werden in dieser Abbildung nicht dargestellt. Bei den hochregulierten Proteinen zeigten 26 Proteine potenzielle Interaktionen, 25 der hochregulierten Proteine wurden in *STRING* zudem mit der Entwicklung des Nervensystems in Verbindung gebracht (türkisene Kreise), 16 der hochregulierten Proteine wurden mit der Hirnentwicklung assoziiert (rosa Kreise). Die runterregulierten Proteine in diesem Vergleich gruppieren sich in mehrere Cluster, wobei die 3 größten Cluster Proteine des Spliceosoms (§), des Proteasoms (%) und ribosomale Proteine (&) umfassten. Die in dieser Abbildung dargestellten gelben Kreise zeigen Proteine an, die an der Signaltransduktion beteiligt. Braune Kreise stellen Proteine dar, die dem Nervensystem zugehören, während die dunkelblauen Kreise für Proteine stehen, die dem Hirngewebe zugeordnet wurden. Hellgrünen Kreise repräsentieren Proteine, die mit dem Begriff „Synapse“ assoziiert waren, während dunkelgraue Kreise Proteine darstellen, die eine Assoziation zur neurodegenerativen Erkrankung Alzheimer-Demenz hatten. Die Interaktionen zwischen den Proteinen sind durch rosa Linien, basierend auf experimentellen

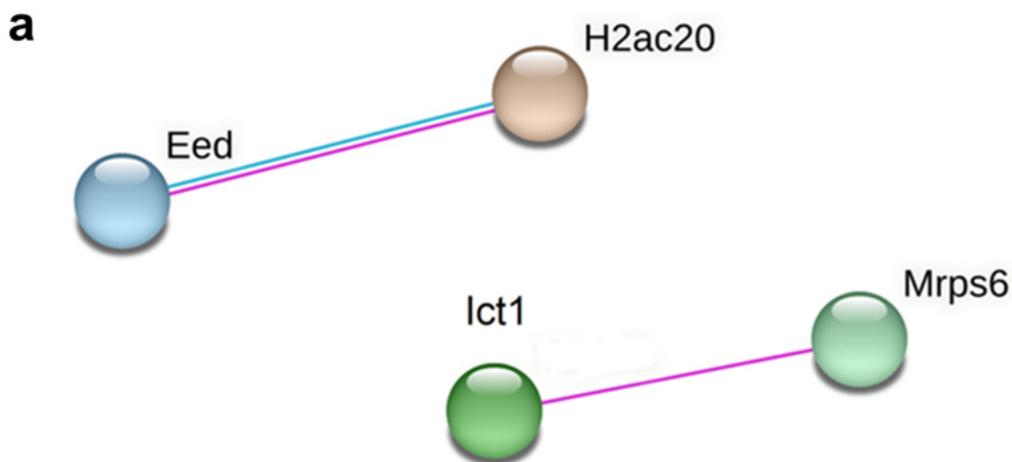
Daten, **blaue** Linien, basierend auf kuratierten Datenbanken, und **lila** Linien, basierend auf Protein-Homologien, dargestellt. n: HFD+MF = 5, HFD = 5

#### 4.2.5.3 SD+MF vs. SD

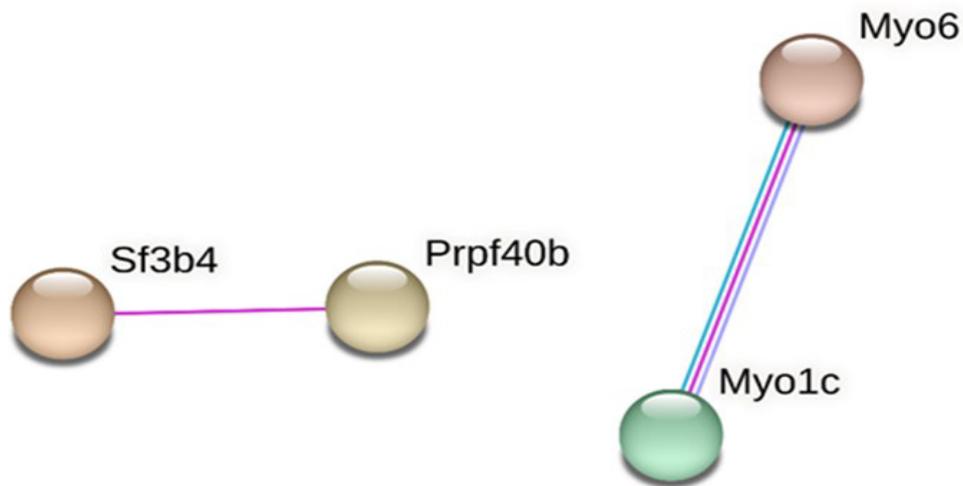
Mithilfe der *STRING*-Analyse konnten weder bei den insgesamt 22 hochregulierten Proteinen im Vergleich SD+MF vs. SD noch bei den insgesamt 33 runterregulierten Proteinen im Vergleich SD+MF vs. SD „functional enrichments“ nachgewiesen werden.

Jedoch haben Experimente und Datenbankanalysen eine potenzielle Interaktion zwischen dem hochregulierten Protein Eed und dem hochregulierten Protein Hist2h2ac aufgezeigt. Eed spielt eine Rolle bei der epigenetischen Regulation der Transkription durch den Polycomb-Repressor-Komplex, während Hist2h2ac ein Mitglied der Histone ist. Darüber hinaus legen Experimente nahe, dass eine mögliche Interaktion zwischen dem Protein Ict1, und dem Protein Mrps6 besteht, die beide an der Regulation der Proteinbiosynthese beteiligt sind (Abb. 9a).

Experimente und Datenbanken deuten darauf hin, dass unter den runterregulierten Proteinen potenzielle Interaktionen zwischen den Myosin-Proteinen Myo1c und Myo6 bestehen, die beide an der Zellbewegung und dem intrazellulären Transport beteiligt sind. Zusätzlich weisen Experimente auf mögliche Interaktionen zwischen den runterregulierten Proteinen Prpf40b und Sf3b4 hin, die beide eine Funktion beim Spleißen haben (Abb. 9b).



**b**



**Abb. 9: STRING-Analyse signifikant und relevant veränderter Proteine im Vergleich SD+MF vs. SD**

Nach Isolierung der Proteine erfolgte eine massenspektrometrische Detektion ebendieser. Eine weitere Analyse der detektierten Proteine erfolgte mittels *MaxQuant* und *Perseus*. Es erfolgte daraufhin eine *STRING*-Analyse, wobei nur die Proteine in *STRING* analysiert wurden, die sowohl signifikant ( $q$ -Wert  $< 0,05$ ) als auch relevant (Fold change  $\geq 1,5$ ) verändert waren. In dieser Abbildung sind die Proteine mit potenziellen Interaktionen dargestellt, die im Vergleich SD+MF vs. SD hochreguliert (a) bzw. runterreguliert (b) sind. Sowohl für die hochregulierten als auch die runterregulierten Proteine, ergaben sich 2 Cluster potenziell interagierender Proteine. Alle Proteine in diesem Vergleich, die keine Interaktion zu anderen Proteinen aufwiesen, werden in dieser Abbildung nicht dargestellt. Die Interaktionen zwischen den Proteinen sind durch **rosa** Linien, basierend auf experimentellen Daten, **blaue** Linien, basierend auf kuratierten Datenbanken, und **lila** Linien, basierend auf Protein-Homologien, dargestellt. n: SD+MF= 4, SD = 5

## 5 Diskussion

Diese Arbeit hatte zum Ziel, die Auswirkungen maternaler Adipositas während der Schwangerschaft auf den Hippocampus weiblicher Nachkommen zu untersuchen sowie die potenziellen Effekte einer maternalen Metforminintervention während der Schwangerschaft auf den Hippocampus dieser Nachkommen zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden weibliche C57BL/6N-Mäuse ab der 3. Lebenswoche randomisiert entweder mit einer SD oder HFD gefüttert und erhielten während der Schwangerschaft entweder Metformin oder keine medikamentöse Intervention. Die Analyse erfolgte an den weiblichen Nachkommen am G18,5. Zur Untersuchung der hippocampalen Veränderungen wurden Immunfluoreszenz-Methoden und ein Proteomic Screen eingesetzt. Der Analyseschwerpunkt des Proteomic Screens lag insbesondere auf Proteinen, die mit Gedächtnis, Neuroplastizität, oxidativem Stress und mitochondrialer Funktion assoziiert sind, da diese Faktoren bekanntermaßen durch Adipositas beeinflusst werden (s. Kapitel 2.2.2) und möglicherweise durch Metformin positiv beeinflusst werden könnten (s. Kapitel 2.3.2).

### 5.1 Gefrierartefakte bei Immunfluoreszenz-Färbungen: Ursachen und Lösungsansätze

Die verlässliche Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen scheiterte an Gewebeschäden, die am ehesten auf Gefrierartefakte zurückzuführen waren, was zu einem Mangel an verwertbaren Proben für die weitere Analyse führte. Gefrierartefakte entstehen durch die Bildung von Eiskristallen im Gewebe während des Einfrierprozesses<sup>105</sup>. Es ist bekannt, dass unter anderem eine unzulängliche Fixierung und Einfriermethode zu einer erhöhten Anfälligkeit für Gefrierartefakte führen<sup>106</sup>. Die beobachteten Gefrierartefakte traten ausschließlich bei den Hirnschnitten auf, die in 4%iger Formaldehydlösung fixiert und anschließend in 20%iger Sucroselösung entwässert wurden, bevor sie auf Trockeneis eingefroren wurden. Im Gegensatz dazu waren die Hirnschnitte der nativ eingefrorenen Gehirne, die mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, frei von solchen Artefakten. Dies deutet darauf hin, dass die gewählte Fixierungs- und Einfriermethode möglicherweise unzureichend war und die Ursache für die beobachteten Artefakte darstellt. Laut Rosene et al. könnten Gefrierartefakte bei Hirngewebe beispielsweise verringert werden, indem der Gewebeblock vor dem Einfrieren mit 20 % Glycerol und 2 % Dimethylsulfoxid durchtränkt und zur schnellen Abkühlung in -75 °C kaltes Isopentan getaucht wird<sup>107</sup>. Daher sollte für zukünftige Experimente eine Anpassung der Einfriermethode und Fixierung der Gehirne evaluiert werden, um Artefakte zu vermeiden.

## **5.2 Effekte von maternaler Nahrungs- und Metforminintervention während der Schwangerschaft auf das hippocampale Proteom weiblicher Nachkommen**

In der Hauptkomponentenanalyse zeigte sich, dass die Gruppen SD und SD+MF zwei eng benachbarte Cluster bildeten, was auf eine ähnliche Zusammensetzung des Proteoms in diesen Gruppen hindeutet. Im Gegensatz dazu wiesen die Cluster der Nachkommen der beiden Hochfett-diät-Gruppen (HFD und HFD+MF) einen deutlichen Abstand zueinander auf. Zudem waren die Cluster der Gruppen SD und SD+MF in der Hauptkomponentenanalyse jeweils weit von den Gruppen HFD und HFD+MF entfernt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ernährung der Muttertiere während der Schwangerschaft einen signifikanten Einfluss auf das fetale hippocampale Proteom ausübt. Zudem scheint die zusätzliche Einnahme von Metformin bei Muttertieren, die mit einer Standarddiät ernährt wurden, einen vergleichsweise geringeren Einfluss auf das hippocampale Proteom der weiblichen Nachkommen zu haben. Diese Annahme wird durch die geringe Anzahl signifikant ( $q$ -Wert  $< 0,05$ ) und relevant (Fold change  $\geq 1,5$ ) veränderter Proteine (55 Proteine) im Vergleich SD+MF vs. SD unterstützt. Die hohe Anzahl signifikant und relevant veränderter Proteine (297 Proteine) im Vergleich HFD+MF vs. HFD hingegen deutet darauf hin, dass Metformin in den Hochfett-diät-Gruppen einen stärkeren Einfluss auf das hippocampale Proteom hat. Dies könnte darauf hindeuten, dass Metformin in der Hochfett-diät-Gruppen zusätzliche proteomische Veränderungen hervorruft, die über die Wirkung der Diät allein hinausgehen. Da Metformin über den Darm resorbiert wird<sup>108</sup> und in erster Linie über die Nieren ausgeschieden wird<sup>109</sup>, könnte ein möglicher Grund sein, dass durch metabolische Veränderungen in den Hochfett-diät-Gruppen, wie beispielsweise eine veränderte Funktionsfähigkeit der Nieren oder durch ein verändertes Darmmikrobiom, die Wirkung von Metformin in den Hochfett-diät-Gruppen im Vergleich zu den Standarddiät-Gruppen verstärkt werden könnte. Denn sowohl die Nierenfunktion als auch die Zusammensetzung des Darmmikrobioms werden bekanntermaßen durch Übergewicht verändert<sup>110,111</sup>. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um die genauen Mechanismen zu identifizieren, die die scheinbar verstärkte Wirkung von Metformin in den Hochfett-diät-Gruppen erklären könnten.

### **5.2.1 Effekte von maternaler Adipositas während der Schwangerschaft auf das hippocampale Proteom weiblicher Nachkommen**

In diesem Abschnitt werden die Auswirkungen maternaler Adipositas, welche durch eine HFD induziert wurde, auf das hippocampale Proteom weiblicher Nachkommen diskutiert. Der Fokus liegt auf Neuroplastizität, Gedächtnisleistung, mitochondrialer Funktion und oxidativem Stress. Dabei werden ausgewählte Proteine diskutiert, die mit mindestens einem dieser Schwerpunkte in Zusammenhang stehen und im Vergleich HFD vs. SD signifikant ( $q$ -Wert  $< 0,05$ ) und relevant (Fold change  $\geq 1,5$ ) verändert waren.

### 5.2.1.1 Neuronale Plastizität und Gedächtnis

Ein Protein, das in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe signifikant und relevant runterreguliert war, ist der Rezeptor für die aktivierte C-Kinase 1 (Rack1). In einem Modell mit männlichen Mäusen konnten Zhu et al. nachweisen, dass ein Mangel an Rack1 im Hippocampus die Gedächtnisleistung der Mäuse beeinträchtigte, indem das mit Autophagie assoziierte Protein Beclin-1 (Becn1) hochreguliert wurde<sup>112</sup>. Die Hochregulation von Becn1 führte unter anderem zu einer Verschlechterung des räumlichen Gedächtnisses<sup>112</sup>. Des Weiteren zeigte ein Mausmodell, dass Rack1 an der Steuerung der Synaptogenese und der synaptischen Plastizität im Kleinhirn beteiligt ist<sup>113</sup>. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass Rack1 eine Rolle in der neuronalen Funktion und Gedächtnisleistung spielt und dass ein Mangel an diesem Protein in der HFD-Gruppe zu kognitiven Defiziten führen könnte. Interessanterweise konnten unsere Ergebnisse jedoch keine signifikante und relevante Hochregulation von Becn1 in der HFD-Gruppe feststellen, obwohl Rack1 runterreguliert war. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Auswirkungen eines Rack1-Mangels auf die Gedächtnisleistung und die Hochregulation von Becn1 möglicherweise geschlechtsspezifisch sind, da die Studie von Zhu et al. mit männlichen Mäusen durchgeführt wurde. Eine weitere Erklärung für die beobachteten Unterschiede könnte in den unterschiedlichen experimentellen Methoden liegen: Während in dieser Arbeit ein Proteomic Screen verwendet wurde, nutzten Zhu et al. einen Western Blot zur Untersuchung der Becn1-Expression. Ein weiteres Protein, das in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe signifikant und relevant runterreguliert war, ist das Protein Glutamin-Synthetase (Glul). Zhou et al. konnten in einem Versuch mit männlichen und weiblichen Mäusen nachweisen, dass eine Deletion von Glul im Hippocampus und Neokortex mit einer Neurodegeneration einhergeht<sup>114</sup>, sodass auch durch die Runterregulation von Glul kognitive Defizite denkbar wären. In einem Alzheimer-Mausmodell mit männlichen Mäusen konnte gezeigt werden, dass die mRNA- und Proteinmenge von Prefoldin-Untereinheit 5 (Pfdn5), einem ebenfalls runterregulierten Protein in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe, während synaptischer Plastizität ansteigt, während sie bei beeinträchtigter synaptischer Plastizität sinkt<sup>115</sup>. Diese Erkenntnis legt nahe, dass eine Runterregulation von Pfdn5 in der HFD-Gruppe auf eine Dysfunktion synaptischer Prozesse hindeuten könnte, was wiederum Lern- und Gedächtnisleistungen negativ beeinflussen könnte. Auch das Protein Complexin-2 (Cplx2) war in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert. Studien mit männlichen Mäusen, die einen Cplx2-Knockout aufwiesen, zeigten eine signifikante Reduktion der Langzeitpotenzierung in der CA3-Region des Hippocampus<sup>116</sup>. Eine solche Reduktion der Langzeitpotenzierung könnte mit kognitiven Defiziten einhergehen, da Versuche mit männlichen und weiblichen Mäusen bereits gezeigt haben, dass ein Cplx2-Knockout zu Defiziten im räumlichen Lernen führt<sup>117</sup>. Diese Befunde

deuten darauf hin, dass Cplx2 für die Aufrechterhaltung kognitiver Funktionen notwendig ist und dass eine Runterregulation ebenfalls zu Lern- und Gedächtnisproblemen führen könnte. Ein weiteres Protein, das in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert war und mit der Gedächtnisleistung assoziiert ist, ist Menin (Men1). In einer Studie mit männlichen und weiblichen Mäusen wurde nachgewiesen, dass die Deletion des Men1-Gens in der CA1-Region des Hippocampus zu Defiziten in der Furchtkonditionierung führt, welche jedoch durch eine Überexpression von Men1 wieder ausgeglichen werden können<sup>118</sup>. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Men1 eine entscheidende Rolle bei der Gedächtnisbildung hat. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Zhuang et al. weiter gestützt. In Versuchen mit männlichen Mäusen konnten sie zeigen, dass eine Deletion von Men1 im Hippocampus zu Defekten bei den dendritischen Verzweigungen und den Dornfortsätzen führt, was wiederum in beeinträchtigter synaptischer Funktion, einer reduzierter Langzeitpotenzierung und einer beeinträchtigten Lern- und Gedächtnisleistung resultierte<sup>31</sup>. Die Runterregulation von Men1 in der HFD-Gruppe könnte somit die kognitive Leistung der HFD-Tiere negativ beeinflussen. In der HFD-Gruppe zeigte sich eine Hochregulation des Proteins Apolipoprotein B-100 (ApoB-100) im Vergleich zu der SD-Gruppe. Transgene Mäuse, die das menschliche ApoB-100-Protein überexprimieren, wiesen im Hippocampus strukturelle Veränderungen in den Gehirnkapillaren, Schwellungen der Astrozytenendfüße und veränderte Tight Junctions auf, was mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke einherging<sup>119</sup>. Eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke im Bereich des Hippocampus wurde auch im alternden menschlichen Gehirn beobachtet und könnte zu kognitiven Defiziten beitragen<sup>120</sup>. Weitere Versuche zeigten, dass ein erhöhtes Level des menschlichen ApoB-100-Proteins in transgenen Mäusen in einer beeinträchtigten präsynaptischen Funktion und Langzeitpotenzierung sowie einer neuronalen Apoptose im Hippocampus resultierte<sup>121</sup>. Dies könnte möglicherweise durch erhöhte Triglyceridspiegel im Serum und im Hippocampus infolge des erhöhten ApoB-100-Levels verursacht werden<sup>121</sup>. Insgesamt deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass eine Hochregulation des Proteins ApoB-100 in der HFD-Gruppe möglicherweise ebenfalls negative Auswirkungen auf die Neuroplastizität und Gedächtnisleistung haben könnte.

Interessanterweise wurden in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe auch Proteine signifikant und relevant verändert, die potenziell mit einer Verbesserung des Gedächtnisses und der neuronalen Plastizität in Verbindung gebracht werden könnten. Das Leucin-reiche Wiederholungs- und Immunoglobulin-ähnliche Domänen enthaltende Protein 1 (Lingo1) ist in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe signifikant und relevant runterreguliert. Mehrere Studien mit männlichen Mäusen und Ratten zeigten, dass eine Antagonisierung von Lingo1 zu einer Verbesserung der räumlichen Lern- und Gedächtnisleistung führt und die Differenzierung sowie Reifung von Oligodendrozyten im Hippocampus fördert<sup>122,123</sup>. Zudem

scheint eine Antagonisierung von Lingo1 die Wiederherstellung dendritischer Dornfortsätze im Hippocampus von Alzheimer-Mäusen zu unterstützen<sup>124</sup>. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die Runterregulation von Lingo1 in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe potenziell einen positiven Einfluss auf das Gedächtnis und die neuronale Signalübertragung haben könnte. Das Protein Ephrin-Typ-A-Rezeptor 5 (Epha5), das in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe hochreguliert ist, scheint bei männlichen Ratten eine wesentliche Rolle bei der Initiierung der Synaptogenese im Hippocampus zu spielen<sup>125</sup>. Zudem scheint Epha5 im Hippocampus erwachsener Mäuse eine Rolle bei der synaptischen Plastizität zu spielen, da eine Blockierung dieses Rezeptors mit einer beeinträchtigten Induktion der Langzeitpotenzierung einhergeht<sup>126</sup>. Insgesamt legt die Hochregulation von Epha5 in der HFD-Gruppe nahe, dass dieses Protein potenziell positive Auswirkungen auf die neuronale Plastizität und die Gedächtnisfunktionen der HFD-Gruppe haben könnte. Ähnliche Annahmen ergeben sich für die Proteine Tubulin beta-2B-Kette (Tubb2b) und Gamma-Aminobuttersäure-Rezeptor-Untereinheit Alpha-2 (Gabra2), die beide in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe hochreguliert sind. In einem Versuch mit männlichen Mäusen zeigte sich beispielsweise, dass eine heterozygote Mutation im Tubb2b-Gen zu Defiziten im Bereich des räumlichen Gedächtnisses und einer reduzierten Langzeitpotenzierung im Hippocampus führte<sup>127</sup>. Eine Deletion von Gabra2 im Hippocampus männlicher Mäuse führte zu einer Rückbildung distaler Dendriten, was möglicherweise auf funktionelle Defizite in der synaptischen Übertragung hinweist<sup>128</sup>. Daher könnte auch bei diesen beiden Proteinen eine Hochregulation potenziell positive Auswirkungen auf das Gedächtnis und die synaptische Plastizität haben.

Die vorliegenden Erkenntnisse zeigen, dass sowohl Proteine, die potenziell negative Auswirkungen auf die Neuroplastizität und das Gedächtnis haben könnten, als auch Proteine, die potenziell positive Effekte in Bezug auf Neuroplastizität und Gedächtnis aufweisen, in der HFD-Gruppe signifikant und relevant verändert sind. Insgesamt ist die Befundlage daher komplex. Somit bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Folgen dieser Veränderungen im Proteom genauer zu verstehen und einzuordnen.

### **5.2.1.2 Mitochondriale Funktion und oxidativer Stress**

Bereits die *STRING*-Analyse (s. Kapitel 4.2.5.1) zeigte, dass mehrere in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterregulierten Proteine eine Rolle in der mitochondrialen Atmungskette spielen. Diese Runterregulationen deuten darauf hin, dass maternale Adipositas während der Schwangerschaft zu einer möglichen mitochondrialen Dysfunktion im Hippocampus weiblicher Nachkommen führen könnte. Eine solche Dysfunktion wurde bereits mehrfach als Folge von Adipositas beschrieben (siehe Kapitel 2.2.2). NADH-Dehydrogenase

[Ubichinon] Flavoprotein 2, mitochondrial (Ndufv2) und NADH-Dehydrogenase [Ubichinon] Flavoprotein 1, mitochondrial (Ndufv1) gehören zum Komplex I der Atmungskette und sind in der Literatur mit oxidativem Stress assoziiert. Beide Proteine sind in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert. Eine Studie mit männlichen Ratten zeigte, dass der Gehalt von Ndufv2 in nicht-synaptischen Mitochondrien aus dem zerebralen Kortex alternder Tiere reduziert ist, was mit einem Anstieg oxidativer Stressmarker und erhöhtem oxidativem Stress einherging<sup>129</sup>. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Abnahme von Ndufv2 in der HFD-Gruppe mit gesteigertem oxidativem Stress verbunden sein könnte. Eine weitere interessante Studie von Grad et al. untersuchte transgene Stämme von *Caenorhabditis elegans* mit einer Mutation im *Caenorhabditis elegans*-Homolog des Ndufv1-Gens. Diese Stämme zeigten neben einer verminderten mitochondrialen Atmung auch eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies<sup>130</sup>. Auch diese Erkenntnisse unterstützen die Annahme, dass Störungen im Komplex I der mitochondrialen Atmungskette in der HFD-Gruppe zu einem Ungleichgewicht in der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führen könnten, was wiederum zu oxidativem Stress und potenziell schädlichen Prozessen beitragen könnte. Ein Protein des Komplex III der Atmungskette, Untereinheit 1 des Cytochrom-b-c1-Komplexes (Uqcrc1), das in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert ist, wird in der Literatur ebenfalls mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht. Eine Studie mit menschlichen Endothelzellen hat gezeigt, dass eine Hochregulation von Uqcrc1 die Reduktion von oxidativem Stress unterstützt<sup>131</sup>. Weiterhin ergab eine Untersuchung mit epithelialen Zellen, dass bei erhöhtem oxidativem Stress ein Verlust von Uqcrc1 beobachtet wurde<sup>132</sup>. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Uqcrc1 möglicherweise zum Schutz von Zellen vor den schädlichen Auswirkungen von oxidativem Stress beitragen könnte. Die Runterregulation von Uqcrc1 in der HFD-Gruppe könnte zudem darauf hindeuten, dass der oxidative Stress in dieser Gruppe erhöht ist, was möglicherweise zu einem Verlust des Proteins geführt haben könnte. Das Protein Kelch-ähnliche ECH-assoziierte Protein 1 (Keap1), welches in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe hochreguliert ist, wird ebenfalls mit oxidativem Stress assoziiert. Keap1 spielt eine wichtige Rolle im Schutz der Zellen vor oxidativem Stress, indem es mit dem Transkriptionsfaktor Nrf2 interagiert<sup>133</sup>. Keap1 reguliert die Aktivität von Nrf2, indem Keap1 Nrf2 im Zytosol bindet, wodurch die Transkription antioxidativer Gene verhindert wird<sup>133</sup>. Unter Bedingungen von oxidativem Stress wird die Aktivität von Keap1 reduziert, wodurch Nrf2 sich im Zellkern anreichern kann und die Transkription antioxidativer Proteine gesteigert wird<sup>134</sup>. Interessanterweise zeigten Ebrahimnezhad et al. in ihrer Studie aus dem Jahre 2023, dass bei männlichen Ratten mit Typ 2 Diabetes ebenfalls höhere Menge an Keap1 im Hippocampus nachweisbar waren, was mit niedrigeren Leveln an antioxidativen Enzymen einherging<sup>135</sup>. Daher könnte die Hochregulation

von Keap1 in der HFD-Gruppe zu einer verminderten Menge antioxidativer Proteine führen und somit den oxidativen Stress erhöhen.

Weitere Proteine, von Interesse im Zusammenhang mit oxidativem Stress sind Histidin-Triaden-Nukleotid-bindendes Protein 1 (Hint1) und High-Mobility-Group-Protein B1 (Hmgb1), die beide in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert sind. Eine Studie mit männlichen Mäusen zeigte, dass ein Hint1-Knockout zu erhöhten Leveln von antioxidativen Enzymen wie Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase im Hippocampus und präfrontalen Kortex führte, sowie zu verringerten Leveln des oxidativen Stressmarkers Malondialdehyd<sup>136</sup>. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Runterregulation von Hint1 in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe möglicherweise mit einer erhöhten Expression antioxidativer Enzyme einhergehen könnte, was auf eine potenzielle Schutzwirkung gegen oxidativen Stress hindeutet. Auch die Runterregulation von Hmgb1 in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe könnte in der HFD-Gruppe nützliche Effekte in Bezug auf oxidativen Stress haben. Versuche mit männlichen Ratten zeigten, dass eine Inhibition von Hmgb1 nach chronischer zerebraler Hypoperfusion ebenfalls zu erhöhten Aktivitäten von antioxidativen Enzymen wie Superoxiddismutase und Katalase sowie einer verminderten Produktion von Malondialdehyd im Hippocampus führte<sup>137</sup>. Interessanterweise zeigten Studien mit männlichen Ratten, die mittels einer fett- und zuckerreichen Ernährung ernährt wurden, dass die Menge von Hmgb1 bei diesen Tieren anstieg<sup>138-140</sup>, sowohl im Hippocampus als auch im Plasma<sup>139</sup>. Dieser scheinbare Widerspruch zu unseren Ergebnissen könnte durch Unterschiede in den verwendeten Tiermodellen (weibliche Mäuse vs. männliche Ratten) erklärt werden. Zudem könnte die Hochregulation von Hmgb1 spezifisch bei den direkt mit HFD ernährten Tieren auftreten, während Föten möglicherweise nicht betroffen sind. Unterschiede in der Zusammensetzung der Diät oder deren Dauer könnten ebenfalls zu den unterschiedlichen Befunden beigetragen haben. Sobesky et al. zeigten jedoch, dass bereits eine Dauer von 3 Tagen ausreicht, um eine Hochregulation von Hmgb1 zu erzielen<sup>140</sup>. Insgesamt sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die genauen Mechanismen und Bedingungen zu klären, unter denen Hmgb1 reguliert wird und wie dies mit oxidativem Stress und den damit verbundenen Zellfunktionen zusammenhängt.

Die Ergebnisse zeigen, dass in der HFD-Gruppe mehrere Proteine der mitochondrialen Atmungskette im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert sind, was auf eine mitochondriale Dysfunktion im Hippocampus hindeutet. Diese Dysfunktion könnte zu erhöhtem oxidativem Stress führen. Auch weitere Proteine weisen auf einen reduzierten antioxidativen Schutz in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe hin, während gleichzeitig auch Proteine mit potenziell schützenden Effekten gegen oxidativen Stress signifikant und relevant verändert wurden. Diese Befunde zeigen, dass maternale Adipositas während der Schwangerschaft

komplexe Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion und den oxidativen Stress im Hippocampus der weiblichen Nachkommen hat.

## **5.2.2 Effekte von maternaler Metformintherapie während der Schwangerschaft auf das hippocampale Proteom weiblicher Nachkommen bei adipösen Muttertieren**

Um die Auswirkungen der mütterlichen Metforminbehandlung während der Schwangerschaft auf das hippocampale Proteom weiblicher Nachkommen adipöser Muttertiere zu bewerten, werden im Folgenden die Proteine diskutiert, die in den Vergleichen HFD vs. SD und HFD+MF vs. HFD überschneidend sowohl signifikant ( $q$ -Wert  $< 0,05$ ) als auch relevant (Fold Change  $\geq 1,5$ ) verändert waren. Zusätzlich werden auch die Proteine betrachtet, die nur im Vergleich HFD+MF vs. HFD signifikant und relevant verändert waren. Auch hier liegt der Schwerpunkt auf Proteinen, die in Zusammenhang mit neuronaler Plastizität, Gedächtnisleistung, mitochondrialer Funktion und oxidativem Stress stehen.

### **5.2.2.1 Neuronale Plastizität und Gedächtnis**

Während das Protein PRKCA-bindendes Protein (Pick1) in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe hochreguliert war, zeigte es in der HFD+MF-Gruppe eine 2,24-fache Runterregulation im Vergleich zur HFD-Gruppe. Eine Studie mit jungen (2 – 3 Wochen alt) und erwachsenen Mäusen (2 – 3 Monate alt) ergab, dass ein Pick1-Knockout bei den jungen Mäusen zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität im Hippocampus führte, während bei erwachsenen Mäusen sowohl die Langzeitpotenzierung als auch die Langzeitdepression beeinträchtigt wurden<sup>141</sup>. Ob die Hoch- und Runterregulation von Pick1 die synaptische Plastizität bei den Föten beeinflusst, ist daher nicht eindeutig, da die Studie Hinweise darauf gibt, dass der Einfluss von Pick1 auf die synaptische Plastizität altersabhängig ist und nicht alle Altersstufen gleichermaßen betrifft. Zudem ist zu beachten, dass durch die Runterregulation in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe das Pick1-Level in dieser Gruppe dem der SD-Gruppe ähnelt. Pick1 war in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe 2,20-fach hochreguliert und in der HFD+MF im Vergleich zur HFD-Gruppe 2,24-fach runterreguliert. Dies deutet darauf hin, dass Metformin das Pick1-Level eher auf das Niveau der SD-Gruppe zurückführt, anstatt es stark weiter zu senken. Ähnliches gilt für das Protein Podoplanin (Pdpn). Pdpn war in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe hochreguliert und in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe runterreguliert. Cicvaric et al. zeigten in einem Experiment mit männlichen Mäusen, dass ein Pdpn-Knockout das räumliche Lernen und Gedächtnis beeinträchtigte und zu einer selektiven Beeinträchtigung der langfristigen synaptischen Plastizität im Gyrus dentatus führte<sup>142</sup>. Die Runterregulation von Pdpn in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe könnte

daher potenziell kognitive Funktionen beeinträchtigen, insbesondere im Bereich des räumlichen Lernens, des räumlichen Gedächtnisses und der synaptischen Plastizität im Gyrus dentatus. Jedoch ist zu beachten, dass Pdpn in der HFD-Gruppe 2,57-fach im Vergleich zur SD-Gruppe hochreguliert war und Pdpn in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe 2,64-fach runterreguliert wurde. Das deutet darauf hin, dass Metformin das Pdpn-Level an das Niveau der SD-Gruppe heranführt. Somit ist fraglich, ob die Runterregulation in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe tatsächlich negative Auswirkungen für kognitive Funktion und die synaptische Plastizität hat. Ein weiteres Protein, Chromogranin-A (Chga), war in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe hochreguliert und wurde in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe runterreguliert. Ciesielski-Treska et al. stellten fest, dass Chga in Gegenwart von Mikrogliazellen zu neuronaler Schädigung und Degeneration beiträgt<sup>143</sup>. Zudem wurde gezeigt, dass ein Chga-Knockout bei adipösen Mäusen mit einer verbesserten Insulinsensitivität einhergeht<sup>144</sup>. Eine Runterregulation von Chga durch Metformin könnte daher potenziell nicht nur zu einer Verringerung der Neurodegeneration und somit zum Schutz des Gedächtnisses und neuronaler Strukturen führen, sondern auch zu einer erhöhten Insulinsensitivität beitragen. Das Protein Sphingosinkinase 2 (Sphk2) war in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert und wurde durch die maternale Metforminintervention in der HFD+MF-Gruppe hochreguliert, was möglicherweise Auswirkungen auf das räumliche Gedächtnis haben könnte. Während Hait et al. zeigten, dass männliche Mäuse mit Sphk2-Knockout Defizite im räumlichen Gedächtnis aufwiesen<sup>145</sup>, konnte dies in der Studie von Lei et al. nicht bestätigt werden<sup>146</sup>. Da die Studienlage derzeit widersprüchlich ist, sind weitere Studien notwendig, um zu beurteilen, ob eine Hochregulation von Sphk2 durch Metformin Einflüsse auf das räumliche Gedächtnis haben könnte.

Die Proteine Nuklearrezeptor-Co-Repressor 1 (Ncor1) und Nuklearrezeptor-Co-Repressor 2 (Ncor2), die in der HFD-Gruppe deutlich im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert waren (9,16-fach bzw. 3,96-fach), wurden durch Metformin in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe signifikant hochreguliert (20,87-fach bzw. 3,28-fach). In ihrer Studie konnten Zhou et al. erstmals eine bisher unbekannte monosynaptische Projektion zwischen GABAergen Neuronen im lateralen Hypothalamus und GABAergen Neuronen in der CA3-Region des Hippocampus nachweisen<sup>147</sup>. Sie fanden heraus, dass die Depletion von Ncor1 und Ncor2 in männlichen Mäusen zu Gedächtnisdefiziten führte und eine Runterregulation von Gabra2 in den GABAergen Neuronen des lateralen Hypothalamus verursachte. Diese Runterregulation von Gabra2 wiederum verursachte eine Hypererregbarkeit dieser Neuronen und beeinträchtigte die Langzeitpotenzierung im Hippocampus<sup>147</sup>. Während die Runterregulation von Ncor1 und Ncor2 in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD- und HFD+MF-Gruppe folglich negative Einflüsse auf das Gedächtnis und die Langzeitpotenzierung im Hippocampus haben könnte, könnte Metformin dazu beitragen, diese negativen Auswirkungen

zu mildern oder umzukehren, indem es die Hochregulation von Ncor1 und Ncor2 induziert. Interessant ist zudem, dass in der HFD-Gruppe Gabra2 im Bereich des Hippocampus trotz reduzierter Level von Ncor1 und Ncor2 im Vergleich zur SD-Gruppe hochreguliert war (s. Kapitel 5.2.1.1), während Zhou et al. beschreiben, dass eine Depletion von Ncor1 und Ncor2 zu einem Abfall an Gabra2 im lateralen Hypothalamus führt<sup>147</sup>. Dies könnte darauf hindeuten, dass Gabra2 in unterschiedlichen Hirnregionen verschieden reguliert wird.

Auch das Protein Phosphoserinphosphatase (Psph) war in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert und wurde durch die maternale Metforminintervention in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe hochreguliert. Eine Studie mit männlichen Mäusen, die an Diabetes mellitus Typ 2 litten, zeigte, dass eine Hochregulation von Psph in hippocampalen Astrozyten kognitive Defizite, die durch Diabetes mellitus Typ 2 verursacht wurden, verbessern konnte<sup>148</sup>. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Hochregulation von Psph durch Metformin möglicherweise positive Effekte auf das Gedächtnis haben könnte. Das Protein Kleines Ubiquitin-ähnliches Modifikator-Protein 2 (Sumo2) war in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert und durch Metformin in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe hochreguliert. In Versuchen mit männlichen und weiblichen Mäusen zeigte sich, dass eine Deletion von Sumo2 zu einer signifikant reduzierten Langzeitpotenzierung im Hippocampus führte und schwerwiegende Beeinträchtigungen im episodischen und räumlichen Gedächtnis verursachte<sup>149</sup>. Eine mögliche Beeinträchtigung des Gedächtnisses und der synaptischen Plastizität durch die Runterregulation von Sumo2 in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe könnte somit möglicherweise durch Metformin gemildert werden. Zwei weitere Proteine, die in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert und durch Metformin in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe hochreguliert wurden, sind die Proteine Proteinkinase C Delta-Typ (Prkcd) und Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II Delta-Untereinheit (Camk2d). Prkcd ist ein Isoenzym der Proteinkinase C, die unter anderem mit synaptischer Plastizität in Verbindung gebracht wird<sup>150,151</sup>. Colgan et al. zeigten, dass auch das Isoenzym Prkcd eine Rolle bei der synaptischen Plastizität in der CA1-Region des Hippocampus spielt. Es wird lokal bei der Plastizität einzelner dendritischer Dornfortsätze aktiviert, was strukturelle und funktionelle Veränderungen in diesen Dornfortsätzen ermöglicht<sup>152</sup>. Eine langanhaltende Aktivierung von Prkcd führte zur Regulation von CREB im Zellkern, was die langfristige Stabilisierung der Plastizität unterstützte<sup>152</sup>. In Versuchen mit männlichen Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Protein Camk2d im Hippocampus spezifisch für langanhaltende Gedächtnisformen erforderlich ist<sup>153</sup>. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die Hochregulation der Proteine Prkcd und Camk2d durch Metformin möglicherweise positive Effekte auf die synaptische Plastizität und Gedächtnisbildung haben könnte. Im Gegensatz dazu könnte die Runterregulation dieser

Proteine in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD- und HFD+MF-Gruppe zu einer verminderten synaptischen Plastizität und Gedächtnisdefiziten in der HFD-Gruppe führen.

In Experimenten mit männlichen und weiblichen Mäusen wurde gezeigt, dass eine Heterozygotie des Proteins Spaltungs- und Polyadenylierungsspezifitätsfaktor Untereinheit 5 (Nudt21) mit Lern- und Gedächtnisdefiziten in mehreren Bereichen, einschließlich des räumlichen Lernens, vergesellschaftet ist<sup>154</sup>. In der HFD-Gruppe wurde eine Runterregulation von Nudt21 im Vergleich zur SD-Gruppe festgestellt, die durch Metformin in der HFD+MF-Gruppe weiter verstärkt wurde. Da die Studie darauf hindeutet, dass eine Reduktion von Nudt21 die Lern- und Gedächtnisleistung beeinträchtigen könnte, könnte Metformin diesen Effekt möglicherweise weiter verstärken, indem es die Reduktion von Nudt21 weiter fördert. Die Proteine SH3 und multiple Ankyrin-Wiederholungsdomänen 3 (Shank3) und Hirnspezifischer Angiogenese-Inhibitor 1 (Bai1) sind in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe runterreguliert. Beide Proteine spielen eine Rolle beim Gedächtnis und bei der synaptischen Plastizität. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Shank3 zu einer reduzierten Langzeitpotenzierung in der CA1-Region des Hippocampus führte und Defizite im hippocampusabhängigen räumlichen Lernen und räumlichen Gedächtnis verursachte<sup>155,156</sup>. Ein Bai-Knockout führte bei Mäusen ebenfalls zu Defiziten im räumlichen Lernen und im räumlichen Gedächtnis, begleitet von verstärkter Langzeitpotenzierung und beeinträchtigter Langzeitdepression<sup>157</sup>. Die Runterregulation der Proteine Shank3 und Bai1 durch Metformin könnte folglich Auswirkungen auf die synaptische Plastizität und das Gedächtnis haben, die zu einer gestörten synaptischen Funktion und kognitiven Defiziten führen könnten.

Die Proteine Leucin-reiches Repeat-Protein 7 (Lrrc7), Adenosinkinase (Adk), Dystrophin (Dmd), Forkhead-Box-Protein G1 (Foxg1), RAC-gamma Serin/Threonin-Proteinkinase (Akt3) und Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (Camkk2) wurden durch Metformin in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe hochreguliert. Alle diese Proteine spielen eine wichtige Rolle beim Gedächtnis und bzw. oder der neuronalen Plastizität. Ein Mausmodell mit einer Nullmutation im Lrrc7-Gen zeigte signifikante Defizite im hippocampusabhängigen und hippocampusunabhängigen Kurzzeitgedächtnis sowie Beeinträchtigungen der Langzeitdepression im Hippocampus<sup>158</sup>. Sandau et al. konnten zeigen, dass eine Adk-Defizienz bei männlichen Mäusen zu Defiziten im hippocampusabhängigen Lernen und Gedächtnis führte<sup>159</sup>. Ein Mangel an Dmd führte ebenfalls zu Gedächtnisdefiziten und beeinträchtigte das Langzeitgedächtnis sowohl bei der Objektwiedererkennung als auch beim räumlichen Gedächtnis in Versuchen mit männlichen Mäusen<sup>160</sup>. Diese Gedächtnisauffälligkeiten bei Dmd-Mangel waren begleitet von einer abnormalen Langzeitpotenzierung in der CA1-Region des Hippocampus<sup>160</sup>. Yu et al. konnten zeigen, dass eine konditionale Deletion von Foxg1 in männlichen Mäusen zu Beeinträchtigungen des

räumlichen Lernens und Gedächtnisses führte<sup>161</sup>. Zudem stellten sie fest, dass diese konditionale Deletion von Foxg1 eine Reduktion der hippocampalen Langzeitpotenzierung zur Folge hatte und mit einer Verringerung der dendritischen Verzweigungen sowie Dornendichte der hippocampalen Pyramidenzellen einherging<sup>161</sup>. Auch das Protein Akt3 spielt eine Rolle bei der Neuroplastizität und dem räumlichen Gedächtnis<sup>162</sup>. Ein Akt3-Knockout führte bei männlichen Mäusen zur Beeinträchtigung des langfristigen räumlichen Gedächtnisses und der hippocampalen Langzeitpotenzierung<sup>162,163</sup>. Während eine Nullmutation von Camkk2 bei männlichen Mäusen zu einer beeinträchtigten hippocampalen Langzeitpotenzierung und einem beeinträchtigten Langzeitgedächtnis führte sowie die Bildung des räumlichen Gedächtnisses beeinträchtigte<sup>164,165</sup>, konnte dieser Effekt bei weiblichen Mäusen nicht bestätigt werden<sup>165</sup>. Inwieweit die Hochregulation von Camkk2 in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe einen Einfluss auf die neuronale Plastizität und das Gedächtnis der weiblichen Föten hat, ist somit unklar. Insgesamt sind jedoch alle genannten Proteine (Lrrc7, Adk, Dmd, Foxg1, Akt3, Camkk2) wichtig für die Neuroplastizität und bzw. oder das Gedächtnis. Die festgestellte Hochregulation dieser Proteine durch Metformin in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe könnte somit für die Neuroplastizität förderlich sein und die Gedächtnisfunktion der weiblichen Nachkommen der HFD+MF-Gruppe verbessern.

Zusammenfassend weisen diese Erkenntnisse darauf hin, dass eine Metforminintervention während der Schwangerschaft bei adipösen Muttertieren signifikante und relevante Veränderungen in einer Vielzahl von Proteinen im Hippocampus der weiblichen Nachkommen bewirkt, die mit Neuroplastizität und Gedächtnis in Zusammenhang stehen. Während einige dieser Proteine potenziell positive Auswirkungen auf die Neuroplastizität und das Gedächtnis haben könnten, besteht auch die Möglichkeit, dass die Regulation bestimmter Proteine durch Metformin negative Folgen für die Neuroplastizität und das Gedächtnis des Nachwuchses hat. Eine Metformingabe in der Schwangerschaft scheint in der Lage zu sein, mögliche negative Auswirkungen einer maternalen Adipositas auf den Hippocampus der weiblichen Nachkommen in Bezug auf Neuroplastizität und Gedächtnis teilweise auszugleichen.

### **5.2.2.2 Mitochondriale Funktion und oxidativer Stress**

Es ist bemerkenswert, dass die beiden Proteine Untereinheit 7 des Cytochrom b-c1-Komplexes (Uqcrcb) und Untereinheit 2 des Cytochrom-b-c1-Komplexes, mitochondrial (Uqcrc2), die Teil des Komplexes III der Atmungskette sind, in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe runterreguliert wurden und durch die Metforminintervention in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe noch weiter runterreguliert wurden. Dies könnte auf eine mögliche mitochondriale Dysfunktion in der HFD-Gruppe hindeuten, die wider Erwarten durch Metformin verstärkt werden könnte. Das Protein Acyl-Carrier-Protein, mitochondrial (Ndufab1),

welches Teil des Komplexes I der Atmungskette ist, ist hingegen in der HFD+MF im Vergleich zu der HFD-Gruppe hochreguliert. In einer Studie von Zhang et al. wurde festgestellt, dass eine Hochregulation von Ndufab1 in den Skelettmuskeln von Mäusen den mitochondrialen Stoffwechsel verbessert und dadurch vor Adipositas und Insulinresistenz schützt, wenn die Tiere einer Hochfettdiät ausgesetzt sind<sup>166</sup>. Dies deutet darauf hin, dass die Hochregulation von Ndufab1 in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe die mitochondriale Funktion verbessern und möglicherweise weitere positive Effekte auf den Stoffwechsel haben könnte, wie eine Steigerung der Insulinsensitivität. Das im Kapitel 5.2.2.1 bereits im Zusammenhang mit der synaptischen Plastizität diskutierte Protein Pick1 scheint ebenfalls eine Rolle im Zusammenhang mit oxidativem Stress zu spielen. In Pick1-Knockout-Mäusen wurde festgestellt, dass Neuronen aus dem Hippocampus anfälliger für Oxidantien sind und eine verminderte Fähigkeit haben, reaktive Sauerstoffspezies zu metabolisieren<sup>167</sup>. Dies führte zu erhöhtem oxidativen Stress in diesen Zellen<sup>167</sup>. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass Pick1 eine Schutzfunktion gegen oxidativen Stress besitzt. Die beobachtete Hochregulation von Pick1 in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD- und HFD+MF-Gruppe könnte als reaktive Antwort auf erhöhten oxidativen Stress interpretiert werden, während die Runterregulation in der SD- und HFD+MF-Gruppe auf eine reduzierte Belastung durch oxidativen Stress hinweisen könnte. Ein weiteres Protein, das in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe hochreguliert war, ist SLC-Transporter Familie 25 Mitglied 46 (Slc25a46). In Knockout-Mäusen zeigte das Fehlen von Slc25a46 im Hirngewebe eine Abnahme der Katalase-Aktivität und eine Zunahme der Malondialdehyd-Level, was auf erhöhten oxidativen Stress hinweist<sup>168</sup>. Daher könnte eine Hochregulation von Slc25a46 durch Metformin möglicherweise eine schützende Funktion gegen oxidativen Stress ausüben. Im Vergleich zur HFD-Gruppe war das antioxidative Protein Glutathion-S-Transferase A4 (Gsta4) in der Gruppe HFD+MF hochreguliert. Docrat et al. konnten bereits nachweisen, dass Metformin zu erhöhten Leveln von Gsta4 in Mäusehirnen führt und schlussfolgerten daraus, dass Metformin durch die Hochregulation von Gsta4 möglicherweise einen protektiven Effekt hat, indem es die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies reduziert und den antioxidativen Status stabilisiert<sup>169</sup>. Die Runterregulation des Proteins Jumonji-Domänen enthaltendes Protein 1C (Jmjd1c) in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe könnte ebenfalls potenziell vor oxidativem Stress schützen. In vitro-Experimente zeigten, dass eine Runterregulation von Jmjd1c mit einer erhöhten Expression antioxidativer Enzyme und einer Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies einherging<sup>170</sup>.

Es ist bemerkenswert, dass die Glutathionperoxidase 1 (Gpx1) in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe runterreguliert ist. Glutathionperoxidasen sind antioxidative Enzyme, die durch den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies vor oxidativem Stress schützen<sup>171</sup>. Eine Runterregulation von Gpx1 durch Metformin könnte darauf hindeuten, dass die

hippocampalen Zellen aufgrund der Runterregulation von Gpx1 weniger vor oxidativem Stress geschützt sind. Eine Hochregulation von Gpx1 in der HFD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe konnte nicht nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass eine reaktive Hochregulation von Gpx1 in der HFD-Gruppe als Antwort auf oxidativen Stress eher unwahrscheinlich ist. Um die Ursachen und Auswirkungen der Runterregulation von Gpx1 in der HFD+MF-Gruppe beurteilen zu können, ist weitere Forschung erforderlich.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Metformin einer mitochondrialen Dysfunktion entgegenwirken könnte, die möglicherweise durch eine maternale Adipositas während der Schwangerschaft ausgelöst wird. Allerdings wurden auch Proteine identifiziert, deren Veränderungen auf eine mögliche Verstärkung der mitochondrialen Dysfunktion durch Metformin hindeuten. Es gibt Hinweise darauf, dass Metformin in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe zu einer Verringerung des oxidativen Stresses führen könnte. Gleichzeitig deuten jedoch einige durch Metformin hervorgerufene Veränderungen im Proteom der HFD+MF-Gruppe auf erhöhten oxidativen Stress hin. Daher sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die genauen Auswirkungen einer maternalen Metforminintervention bei adipösen Muttertieren auf die mitochondriale Funktion und oxidativen Stress im Hippocampus weiblicher Nachkommen zu klären.

### **5.2.3 Effekte von maternaler Metformintherapie während der Schwangerschaft auf das hippocampale Proteom weiblicher Nachkommen unabhängig vom Körpergewicht der Muttertiere**

In diesem Abschnitt werden Proteine diskutiert, die in den Gruppen SD+MF und HFD+MF sowohl signifikant ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ) als auch relevant (Fold change  $\geq 1,5$ ) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen SD bzw. HFD verändert waren. Berücksichtigt wurden dabei nur Proteine, die in beiden Gruppen, SD+MF und HFD+MF, in dieselbe Richtung reguliert waren. Diese gleichgerichtete Regulation legt nahe, dass sie durch Metformin bedingt ist, da sie unabhängig von der Diät und dem Körpergewicht der Muttertiere auftrat. In der Literatur finden sich vor allem interessante Bezüge zu oxidativem Stress, während nur begrenzt Hinweise auf eine Beteiligung dieser Proteine an hippocampaler Neuroplastizität, Gedächtnisleistung oder mitochondrialer Funktion vorliegen.

Eine in der Literatur beschriebene Assoziation mit Metformin wurde ebenfalls überprüft und konnte für die Proteine Becn1 und Deoxycytidinkinase (Dck) bestätigt werden. Sowohl in der HFD+MF-Gruppe als auch in der SD+MF-Gruppe wurde das Protein Becn1, welches eine Rolle in der Regulation der Autophagie spielt und die Autophagie fördert, runterreguliert<sup>172,173</sup>. Eine Reduktion von Becn1 in weiblichen transgenen Mäusen, die das menschliche Amyloid-Precursor-Protein exprimierten, führte zu einer verstärkten Neurodegeneration im Bereich des

Hippocampus<sup>174</sup>. Gleichzeitig ist, wie bereits in Kapitel 5.2.1.1 erwähnt, eine Hochregulation von Becn1 mit einer beeinträchtigten Gedächtnisleistung durch gesteigerte Autophagie assoziiert worden<sup>112</sup>. In Studien mit Kardiomyozyten von Mäusen, Magenkarzinom-Zelllinien und Melanom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Metformin zu gesteigerten Levels von Becn1 führte<sup>175-177</sup>. Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss von Metformin auf Becn1 gewebespezifisch sein könnte und Metformin nicht grundsätzlich zu einer Runterregulation von Becn1 führt. Insgesamt scheint die Bewertung möglicher Auswirkungen einer Runterregulation von Becn1 in den beiden Gruppen HFD+MF und SD+MF also komplex zu sein. Während eine Reduktion von Becn1 zu neurodegenerativen Prozessen verstärken könnte, könnte die Runterregulation möglicherweise auch protektiv wirken, indem übermäßige Autophagie verhindert wird. Das Protein Dck ist in beiden Gruppen hochreguliert. Studien mit menschlichen Pankreaskarzinom-Zelllinien haben gezeigt, dass eine Inaktivierung von Dck zu einer verminderten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und zu einer erhöhten Transkription antioxidativer Gene führte<sup>178,179</sup>. Auf Grundlage dieser Studien könnte eine Hochregulation von Dck zu erhöhtem oxidativen Stress führen, wobei unklar bleibt, ob die Ergebnisse aus Untersuchungen mit Pankreaskarzinom-Zelllinien auf den Hippocampus übertragbar sind. In Ösophagus-Plattenepithelkarzinom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Metformin zu erhöhten Levels von Dck führte<sup>180</sup>, passend zu unserem Ergebnis.

Das Protein Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Kerntranslokator 2 (Arnt2) ist in beiden Gruppen hochreguliert. Rahim et al. zeigten, dass die Menge von Arnt2 in kortikalen Neuronen durch oxidativen Stress reguliert wird<sup>181</sup>. Dazu wurde oxidativer Stress durch Wasserstoffperoxid imitiert<sup>181</sup>. Bei niedrigen Dosen von Wasserstoffperoxid stieg die Arnt2-Proteinmenge schnell an, kehrte aber innerhalb von 3 - 4 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau zurück<sup>181</sup>. Bei höheren Dosen von Wasserstoffperoxid nahm die Arnt2-Menge jedoch unter das Ausgangsniveau ab<sup>181</sup>. Zudem konnte in einer weiteren in-vitro Studie gezeigt werden, dass die Arnt2-Menge bei oxidativem Stress deutlich supprimiert wird und diese Suppression mit einer Apoptose assoziiert ist<sup>182</sup>. Diese Erkenntnisse deuten auf einen komplexen Zusammenhang zwischen Arnt2 und oxidativem Stress hin. Eine möglicherweise durch Metformin verursachte Hochregulation in den Gruppen HFD+MF und SD+MF könnte dabei die Zellen vor Apoptose schützen. Weitere Forschung ist jedoch erforderlich, um den genauen Mechanismus und die Auswirkungen dieser Hochregulation zu verstehen. Auch das Protein SLAIN Motiv-enhaltendes Protein 1 (Slain1) war in den Gruppen HFD+MF und SD+MF hochreguliert. In einer Studie mit primären Hippocampusneuronenkulturen von Ratten wurde gezeigt, dass Slain1 an der Regulation des Mikrotubulus- und Axonwachstums beteiligt ist<sup>183</sup>. Da das Mikrotubuluswachstum entscheidend für die Struktur und Funktion von Neuronen ist<sup>184</sup>, könnte die Hochregulation in den beiden Metformin-Gruppen Auswirkungen auf die Neuroplastizität haben. Um die genauen Folgen einer solchen Hochregulation besser

einschätzen zu können, ist jedoch weitere Forschung erforderlich. Auch die Proteine G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase 6 (Grk6) und Nucleoredoxin (Nxn) waren in den beiden Gruppen hochreguliert. In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass ein Grk6-Knockout zu erhöhten Leveln reaktiver Sauerstoffspezies führte, was auf erhöhten oxidativen Stress hinweist<sup>185</sup>. Eine Hochregulation von Grk6 in den beiden Gruppen könnte daher potenziell zu einer Verringerung der reaktiven Sauerstoffspezies führen und somit den oxidativen Stress reduzieren. Nxn gehört zur Familie der Thioredoxine<sup>186</sup> und fungiert als Regulator der zellulären Redox-Homöostase<sup>187</sup>. So konnte in einer Studie mit pflanzlichen Zellen gezeigt werden, dass Nxn antioxidative Enzyme wie Katalase vor durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöster Oxidation schützt, wodurch die antioxidative Kapazität von Katalase gesteigert und die Zellen vor oxidativem Stress geschützt wurden<sup>188</sup>. Es ist daher möglich, dass die Hochregulation von Nxn in den beiden Gruppen HFD+MF und SD+HF die hippocampalen Zellen vor oxidativem Stress schützt.

Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass Metformin in der Lage sein könnte, den oxidativen Stress in den Gruppen HFD+MF und SD+MF zu reduzieren, was den bestehenden Erkenntnissen in der Literatur zur Eigenschaft von Metformin, oxidativen Stress zu mindern, entspricht (s. Kapitel 2.3.2). Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Metformin potenzielle Auswirkungen auf neurodegenerative Prozesse, die Autophagie und die Neuroplastizität haben könnte.

### **5.3 Zusammenfassung, Limitation und Ausblick**

Diese Arbeit zeigt, dass maternale Adipositas sowie eine maternale Metformintherapie während der Schwangerschaft zu zahlreichen Veränderungen im hippocampalen Proteom weiblicher Nachkommen führen. In der HFD-Gruppe waren im Vergleich zur SD-Gruppe und der HFD+MF-Gruppe signifikante und relevante Veränderungen bei Proteinen beobachtet, die potenziell negative Auswirkungen auf die Gedächtnisleistung und Neuroplastizität in der HFD-Gruppe haben könnten. Gleichzeitig wurden auch Proteine in der HFD-Gruppe identifiziert, die potenziell positive Effekte auf diese Funktionen haben könnten. Eine Metforminintervention während der Schwangerschaft bei Muttertieren, die mit HFD ernährt wurden, scheint das Potenzial zu haben, den negativen Effekten einer nahrungsinduzierten maternalen Adipositas auf die Gedächtnisleistung und Neuroplastizität der weiblichen Nachkommen teilweise entgegenzuwirken. Jedoch ist zu beachten, dass in der HFD+MF-Gruppe auch Proteine verändert waren, die potenziell negative Auswirkungen auf die Neuroplastizität und das Gedächtnis haben könnten.

Auch in Bezug auf die mitochondriale Funktion und den oxidativen Stress zeigen sich ähnliche Erkenntnisse. Während in der HFD-Gruppe Hinweise auf mitochondriale Dysfunktion und erhöhten oxidativen Stress gefunden wurden, konnten auch Hinweise darauf gefunden werden, dass in dieser Gruppe, möglicherweise reaktiv, Proteine verändert waren, die vor oxidativem Stress schützen. Metformin scheint teilweise, unabhängig von der Diät, vor oxidativem Stress zu schützen. Dennoch zeigen sich in der HFD+MF-Gruppe auch Veränderungen bei Proteinen, die potenziell auf erhöhten oxidativen Stress im Vergleich zur HFD-Gruppe hindeuten. Die mitochondriale Funktion scheint in der HFD+MF-Gruppe im Vergleich zur HFD-Gruppe teilweise verbessert zu sein. Es ist jedoch anzumerken, dass auch in der HFD+MF-Gruppe Proteine verändert waren, die auf eine mitochondriale Dysfunktion hinweisen und darauf hindeuten könnten, dass die mitochondriale Dysfunktion durch Metformin sogar verstärkt werden könnte.

Insgesamt sollten die Ergebnisse dieser Arbeit vor dem Hintergrund einiger Limitationen betrachtet werden. Die Experimente wurden an einem Mausmodell durchgeführt, weshalb die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen eingeschränkt ist. Zudem wurden in dieser Arbeit ausschließlich die Hippocampi weiblicher Föten analysiert. In der zitierten Literatur hingegen wurden häufig Experimente mit männlichen Tieren durchgeführt, was zu einer eingeschränkten Übertragbarkeit der Ergebnisse führen könnte, da mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede nicht berücksichtigt wurden. Des Weiteren wurden nicht alle im proteomischen Screening detektierten Proteine weiter diskutiert; es wurden nur bestimmte Proteine herausgefiltert, die weiter diskutiert wurden. Diese selektive Analyse könnte dazu führen, dass potenziell relevante Proteine übersehen wurden, was die Vollständigkeit der Ergebnisse einschränkt. Zusätzlich wurde in der zitierten Literatur häufig mit Knockout-Modellen gearbeitet, während in dieser Arbeit die Hoch- bzw. Runterregulation von Proteinen untersucht wurde. Ein Knockout eines Proteins ist nicht direkt mit einer Hoch- bzw. Runterregulation eines Proteins vergleichbar, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit nicht direkt mit den Erkenntnissen aus Knockout-Studien vergleichbar sind. Schließlich bleibt unklar, welche Langzeitfolgen die beobachteten Veränderungen haben könnten, da die Untersuchung das hippocampale Proteom weiblicher Föten am G18,5 darstellt. Langfristige Auswirkungen auf die Entwicklung und Funktion des Hippocampus können daher anhand dieser Ergebnisse nicht beurteilt werden.

Für zukünftige Arbeiten wäre es spannend, als Ergänzung zu den bisherigen Proteomic-Ergebnissen weitere Experimente durchzuführen, um die Auswirkungen von maternaler Adipositas und maternaler Metformintherapie während der Schwangerschaft auf die Neuroplastizität, die Gedächtnisleistung, den oxidativen Stress und die Funktion der Mitochondrien im Hippocampus der Nachkommen zu erforschen. Eine sinnvolle Ergänzung könnte darin bestehen, auch männliche Tiere in die Untersuchungen einzubeziehen, um

mögliche Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren zu detektieren. Zur Untersuchung der Neuroplastizität wären beispielsweise Immunfluoreszenzfärbungen sinnvoll, wie sie bereits in dieser Arbeit angedacht waren. Zusätzlich könnten elektrophysiologische Untersuchungen eine wertvolle Ergänzung darstellen, um die synaptische Plastizität im Hippocampus direkt zu beurteilen. Zur Erforschung der Gedächtnisleistung könnten Verhaltensexperimente wie das Morris-Wasserlabyrinth durchgeführt werden. Biochemische Assays könnten verwendet werden, um Marker für oxidativen Stress zu messen und die mitochondriale Funktion zu bestimmen. Immunfluoreszenzfärbungen könnten ebenfalls nützlich sein, um den oxidativen Stress zu untersuchen, indem beispielsweise die Expression antioxidativer Enzyme wie Superoxiddismutase oder Katalase untersucht wird. Mikroskopische Untersuchungen könnten zur Beurteilung der Morphologie der Mitochondrien und zur Feststellung möglicher struktureller Veränderungen beitragen. Schließlich wäre es interessant zu untersuchen, wie sich maternale Adipositas und eine maternale Metformintherapie langfristig auf den Hippocampus der Nachkommen auswirken. Zukünftige Arbeiten könnten daher davon profitieren, die Nachkommen über einen längeren Zeitraum zu beobachten, um potenzielle langfristige Effekte zu erfassen und mögliche Unterschiede zwischen verschiedenen Altersklassen zu untersuchen. Durch weiterführende experimentelle Untersuchungen könnte ein tieferes Verständnis für die Nutzen und potenziellen Risiken der Metformintherapie bei adipösen schwangeren Mäusen gewonnen werden, um die potenzielle klinische Relevanz einer Metformintherapie bei adipösen Schwangeren besser bewerten zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (zuletzt abgerufen am 28.07.2024).
2. Pi-Sunyer X. The medical risks of obesity. *Postgrad Med* 2009; **121**(6): 21-33.
3. Djalalinia S, Qorbani M, Peykari N, Kelishadi R. Health impacts of Obesity. *Pak J Med Sci* 2015; **31**(1): 239-42.
4. Hruby A, Manson JE, Qi L, et al. Determinants and Consequences of Obesity. *Am J Public Health* 2016; **106**(9): 1656-62.
5. Effertz T, Engel S, Verheyen F, Linder R. The costs and consequences of obesity in Germany: a new approach from a prevalence and life-cycle perspective. *Eur J Health Econ* 2016; **17**(9): 1141-58.
6. Meng F, Nie P, Sousa-Poza A. The intangible costs of overweight and obesity in Germany. *Health Econ Rev* 2023; **13**(1): 14.
7. Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen (IQTIG). Bundesauswertung Perinatalmedizin: Geburtshilfe - Erfassungsjahr 2022. [https://iqtig.org/downloads/auswertung/2022/pmgebh/DeQS\\_PM-GEBH\\_2022\\_BUAW\\_Bund\\_2023-07-20.pdf](https://iqtig.org/downloads/auswertung/2022/pmgebh/DeQS_PM-GEBH_2022_BUAW_Bund_2023-07-20.pdf) (zuletzt abgerufen am 28.07.2024).
8. Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen (IQTIG). Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2015 - Geburtshilfe Qualitätsindikatoren. [https://iqtig.org/downloads/auswertung/2015/16n1gebh/QSKH\\_16n1-GEBH\\_2015\\_BUAW\\_V02\\_2016-07-07.pdf](https://iqtig.org/downloads/auswertung/2015/16n1gebh/QSKH_16n1-GEBH_2015_BUAW_V02_2016-07-07.pdf) (zuletzt abgerufen am 28.07.2024).
9. Gesink Law DC, Maclehose RF, Longnecker MP. Obesity and time to pregnancy. *Hum Reprod* 2007; **22**(2): 414-20.
10. Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. *Human Reproduction* 2004; **19**(7): 1644-6.
11. Chu SY, Callaghan WM, Kim SY, et al. Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007; **30**(8): 2070-6.
12. Wang Z, Wang P, Liu H, et al. Maternal adiposity as an independent risk factor for pre-eclampsia: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Obesity Reviews* 2013; **14**(6): 508-21.
13. Jacobsen AF, Skjeldestad FE, Sandset PM. Ante- and postnatal risk factors of venous thrombosis: a hospital-based case-control study. *J Thromb Haemost* 2008; **6**(6): 905-12.
14. Larsen TB, Sørensen HT, Gislum M, Johnsen SP. Maternal smoking, obesity, and risk of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium: a population-based nested case-control study. *Thromb Res* 2007; **120**(4): 505-9.
15. Vahratian A, Zhang J, Troendle JF, Savitz DA, Siega-Riz AM. Maternal Prepregnancy Overweight and Obesity and the Pattern of Labor Progression in Term Nulliparous Women. *Obstetrics & Gynecology* 2004; **104**(5 Part 1): 943-51.
16. Sebire NJ, Jolly M, Harris JP, et al. Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287,213 pregnancies in London. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; **25**(8): 1175-82.
17. Watkins ML, Rasmussen SA, Honein MA, Botto LD, Moore CA. Maternal obesity and risk for birth defects. *Pediatrics* 2003; **111**(5 Pt 2): 1152-8.
18. Cedergren MI, Källén BA. Maternal obesity and infant heart defects. *Obes Res* 2003; **11**(9): 1065-71.
19. Waller DK, Shaw GM, Rasmussen SA, et al. Prepregnancy obesity as a risk factor for structural birth defects. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; **161**(8): 745-50.
20. Jolly MC, Sebire NJ, Harris JP, Regan L, Robinson S. Risk factors for macrosomia and its clinical consequences: a study of 350,311 pregnancies. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2003; **111**(1): 9-14.
21. Callaway LK, Prins JB, Chang AM, McIntyre HD. The prevalence and impact of overweight and obesity in an Australian obstetric population. *Med J Aust* 2006; **184**(2): 56-9.
22. Yu Z, Han S, Zhu J, Sun X, Ji C, Guo X. Pre-Pregnancy Body Mass Index in Relation to Infant Birth Weight and Offspring Overweight/Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* 2013; **8**(4): e61627.

23. Gaillard R, Steegers EAP, Duijts L, et al. Childhood Cardiometabolic Outcomes of Maternal Obesity During Pregnancy. *Hypertension* 2014; **63**(4): 683-91.
24. Rooney BL, Mathiason MA, Schauberger CW. Predictors of Obesity in Childhood, Adolescence, and Adulthood in a Birth Cohort. *Maternal and Child Health Journal* 2011; **15**(8): 1166-75.
25. Reynolds RM, Allan KM, Raja EA, et al. Maternal obesity during pregnancy and premature mortality from cardiovascular event in adult offspring: follow-up of 1 323 275 person years. *BMJ : British Medical Journal* 2013; **347**: f4539.
26. Eriksson JG, Sandboge S, Salonen MK, Kajantie E, Osmond C. Long-term consequences of maternal overweight in pregnancy on offspring later health: Findings from the Helsinki Birth Cohort Study. *Annals of Medicine* 2014; **46**(6): 434-8.
27. Forsén T, Eriksson JG, Tuomilehto J, Teramo K, Osmond C, Barker DJP. Mother's weight in pregnancy and coronary heart disease in a cohort of finnish men: follow up study. *BMJ* 1997; **315**(7112): 837-40.
28. Dumas O, Varraso R, Gillman MW, Field AE, Camargo Jr CA. Longitudinal study of maternal body mass index, gestational weight gain, and offspring asthma. *Allergy* 2016; **71**(9): 1295-304.
29. Reichman NE, Nepomnyaschy L. Maternal Pre-Pregnancy Obesity and Diagnosis of Asthma in Offspring at Age 3 Years. *Maternal and Child Health Journal* 2008; **12**(6): 725-33.
30. Huang L, Yu X, Keim S, Li L, Zhang L, Zhang J. Maternal prepregnancy obesity and child neurodevelopment in the Collaborative Perinatal Project. *Int J Epidemiol* 2014; **43**(3): 783-92.
31. Zhuang K, Huang C, Leng L, et al. Neuron-Specific Menin Deletion Leads to Synaptic Dysfunction and Cognitive Impairment by Modulating p35 Expression. *Cell Rep* 2018; **24**(3): 701-12.
32. Getz KD, Anderka MT, Werler MM, Jick SS. Maternal Pre-pregnancy Body Mass Index and Autism Spectrum Disorder among Offspring: A Population-Based Case-Control Study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2016; **30**(5): 479-87.
33. Knierim JJ. The hippocampus. *Current Biology* 2015; **25**(23): R1116-R21.
34. Dekeyser S, De Kock I, Nikoubashman O, et al. "Unforgettable" – a pictorial essay on anatomy and pathology of the hippocampus. *Insights into Imaging* 2017; **8**(2): 199-212.
35. Lang M, Colby S, Ashby-Padial C, et al. An imaging review of the hippocampus and its common pathologies. *Journal of Neuroimaging* 2024; **34**(1): 5-25.
36. Duvernoy H, Cattin F, Risold P-Y. Structure, Functions, and Connections. In: Duvernoy HM, Cattin F, Risold P-Y, eds. *The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013: 5-38.
37. Huang CC, Rolls ET, Hsu CH, Feng J, Lin CP. Extensive Cortical Connectivity of the Human Hippocampal Memory System: Beyond the "What" and "Where" Dual Stream Model. *Cereb Cortex* 2021; **31**(10): 4652-69.
38. Terreros-Roncal J, Flor-García M, Moreno-Jiménez EP, et al. Methods to study adult hippocampal neurogenesis in humans and across the phylogeny. *Hippocampus* 2023; **33**(4): 271-306.
39. Weerasinghe-Mudiyanselage PDE, Ang MJ, Kang S, Kim JS, Moon C. Structural Plasticity of the Hippocampus in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 2022; **23**(6).
40. Rygvold TW, Hatlestad-Hall C, Elvsåshagen T, Moberget T, Andersson S. Long-Term Potentiation-Like Visual Synaptic Plasticity Is Negatively Associated With Self-Reported Symptoms of Depression and Stress in Healthy Adults. *Front Hum Neurosci* 2022; **16**: 867675.
41. Ko S, Zhuo M. Central plasticity and persistent pain. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2004; **1**(2): 101-6.
42. Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT. Long-term depression in the CNS. *Nature Reviews Neuroscience* 2010; **11**(7): 459-73.
43. Shiadeh SMJ, Goretta F, Svedin P, Jansson T, Mallard C, Ardalan M. Long-term impact of maternal obesity on the gliovascular unit and ephrin signaling in the hippocampus of adult offspring. *J Neuroinflammation* 2024; **21**(1): 39.
44. Geuze E, Vermetten E, Bremner JD. MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders. *Molecular Psychiatry* 2005; **10**(2): 160-84.

45. Tozuka Y, Kumon M, Wada E, Onodera M, Mochizuki H, Wada K. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochem Int* 2010; **57**(3): 235-47.
46. Bilbo SD, Tsang V. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *The FASEB Journal* 2010; **24**(6): 2104-15.
47. Teleanu DM, Niculescu AG, Lungu, II, et al. An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 2022; **23**(11).
48. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 1997; **82**(2): 291-5.
49. Verdile G, Keane KN, Cruzat VF, et al. Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease. *Mediators Inflamm* 2015; **2015**: 105828.
50. Edlow AG. Maternal obesity and neurodevelopmental and psychiatric disorders in offspring. *Prenat Diagn* 2017; **37**(1): 95-110.
51. Rivera HM, Christiansen KJ, Sullivan EL. The role of maternal obesity in the risk of neuropsychiatric disorders. *Front Neurosci* 2015; **9**: 194.
52. Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; **299**(3): R711-22.
53. 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.
54. Preiser J-C. Oxidative Stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2012; **36**(2): 147-54.
55. Gao W, Wang W, Zhang J, et al. Allicin ameliorates obesity comorbid depressive-like behaviors: involvement of the oxidative stress, mitochondrial function, autophagy, insulin resistance and NOX/Nrf2 imbalance in mice. *Metabolic Brain Disease* 2019; **34**(5): 1267-80.
56. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011; **12**(5): 3117-32.
57. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 2008; **118**(2): 789-800.
58. de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sciences* 2018; **192**: 26-32.
59. Ma W, Yuan L, Yu H, Xi Y, Xiao R. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the brain of diet-induced obese rats but not in diet-resistant rats. *Life Sciences* 2014; **110**(2): 53-60.
60. Olesen MA, Torres AK, Jara C, Murphy MP, Tapia-Rojas C. Premature synaptic mitochondrial dysfunction in the hippocampus during aging contributes to memory loss. *Redox Biol* 2020; **34**: 101558.
61. Mishra E, Thakur MK. Alterations in hippocampal mitochondrial dynamics are associated with neurodegeneration and recognition memory decline in old male mice. *Biogerontology* 2022; **23**(2): 251-71.
62. Schmitz L, Kuglin R, Bae-Gartz I, et al. Hippocampal insulin resistance links maternal obesity with impaired neuronal plasticity in adult offspring. *Psychoneuroendocrinology* 2018; **89**: 46-52.
63. Grillo CA, Piroli GG, Lawrence RC, et al. Hippocampal Insulin Resistance Impairs Spatial Learning and Synaptic Plasticity. *Diabetes* 2015; **64**(11): 3927-36.
64. Tozuka Y, Wada E, Wada K. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *Faseb j* 2009; **23**(6): 1920-34.
65. Corder ZA, Tamashiro KL. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiol Behav* 2015; **152**(Pt B): 363-71.
66. Li XL, Aou S, Oomura Y, Hori N, Fukunaga K, Hori T. Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 2002; **113**(3): 607-15.

67. Farr SA, Banks WA, Morley JE. Effects of leptin on memory processing. *Peptides* 2006; **27**(6): 1420-5.
68. Tozuka Y, Kumon M, Wada E, Onodera M, Mochizuki H, Wada K. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochemistry International* 2010; **57**(3): 235-47.
69. Lu B, Nagappan G, Guan X, Nathan PJ, Wren P. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 2013; **14**(6): 401-16.
70. Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(7): 2711-6.
71. Niculescu MD, Lupu DS. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* 2009; **27**(7): 627-33.
72. Marshall SM. 60 years of metformin use: a glance at the past and a look to the future. *Diabetologia* 2017; **60**(9): 1561-5.
73. Foretz M, Guigas B, Viollet B. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential. *Nature Reviews Endocrinology* 2023; **19**(8): 460-76.
74. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 2017; **60**(9): 1577-85.
75. McCreight LJ, Bailey CJ, Pearson ER. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia* 2016; **59**(3): 426-35.
76. Sritawan N, Suwannakot K, Naewla S, et al. Effect of metformin treatment on memory and hippocampal neurogenesis decline correlated with oxidative stress induced by methotrexate in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2021; **144**: 112280.
77. Alzoubi KH, Khabour OF, Al-Azzam SI, Tashtoush MH, Mhaidat NM. Metformin Eased Cognitive Impairment Induced by Chronic L-methionine Administration: Potential Role of Oxidative Stress. *Curr Neuropsychopharmacol* 2014; **12**(2): 186-92.
78. Gorgich EAC, Parsaie H, Yarmand S, Baharvand F, Sarbishegi M. Long-term administration of metformin ameliorates age-dependent oxidative stress and cognitive function in rats. *Behav Brain Res* 2021; **410**: 113343.
79. Pintana H, Apaijai N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. *Life Sciences* 2012; **91**(11): 409-14.
80. Oliveira WH, Nunes AK, França MER, et al. Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Research* 2016; **1644**: 149-60.
81. Muñoz-Arenas G, Pulido G, Treviño S, et al. Effects of metformin on recognition memory and hippocampal neuroplasticity in rats with metabolic syndrome. *Synapse* 2020; **74**(9): e22153.
82. Nguyen L, Chan S-Y, Teo AKK. Metformin from mother to unborn child – Are there unwarranted effects? *EBioMedicine* 2018; **35**: 394-404.
83. National Institute for Health and Care Excellence. Diabetes in pregnancy: management from preconception to the postnatal period. <https://www.nice.org.uk/guidance/ng3> (zuletzt abgerufen am 14.08.2024).
84. Schäfer-Graf UM, Gembruch U, Kainer F, et al. Gestational Diabetes Mellitus (GDM) - Diagnosis, Treatment and Follow-Up. Guideline of the DDG and DGGG (S3 Level, AWMF Registry Number 057/008, February 2018). *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2018; **78**(12): 1219-31.
85. Vanky E, Zahlsen K, Spigset O, Carlsen SM. Placental passage of metformin in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2005; **83**(5): 1575-8.
86. Butalia S, Gutierrez L, Lodha A, Aitken E, Zakariasen A, Donovan L. Short- and long-term outcomes of metformin compared with insulin alone in pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Diabet Med* 2017; **34**(1): 27-36.
87. Rowan JA, Rush EC, Obolonkin V, Battin M, Wouldes T, Hague WM. Metformin in gestational diabetes: the offspring follow-up (MiG TOFU): body composition at 2 years of age. *Diabetes Care* 2011; **34**(10): 2279-84.

88. Rowan JA, Rush EC, Plank LD, et al. Metformin in gestational diabetes: the offspring follow-up (MiG TOFU): body composition and metabolic outcomes at 7-9 years of age. *BMJ Open Diabetes Res Care* 2018; **6**(1): e000456.
89. Ijäs H, Vääräsmäki M, Saarela T, Keravuo R, Raudaskoski T. A follow-up of a randomised study of metformin and insulin in gestational diabetes mellitus: growth and development of the children at the age of 18 months. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2015; **122**(7): 994-1000.
90. Wouldes TA, Battin M, Coat S, Rush EC, Hague WM, Rowan JA. Neurodevelopmental outcome at 2 years in offspring of women randomised to metformin or insulin treatment for gestational diabetes. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 2016; **101**(6): F488.
91. Dodd JM, Louise J, Deussen AR, et al. Effect of metformin in addition to dietary and lifestyle advice for pregnant women who are overweight or obese: the GRoW randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2019; **7**(1): 15-24.
92. Deussen AR, Louise J, Dodd JM. Childhood follow-up of the GRoW randomized trial: Metformin in addition to dietary and lifestyle advice for pregnant women with overweight or obesity. *Pediatr Obes* 2023; **18**(1): e12974.
93. Nusken E, Turnwald EM, Fink G, et al. Maternal High Fat Diet and in-Utero Metformin Exposure Significantly Impact upon the Fetal Renal Proteome of Male Mice. *J Clin Med* 2019; **8**(5).
94. 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.
95. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res* 2023; **51**(D1): D638-d46.
96. The UniProt C. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research* 2023; **51**(D1): D523-D31.
97. 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).
98. Wang Z, Storm DR. Extraction of DNA from mouse tails. *BioTechniques* 2006; **41**(4): 410-2.
99. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; **239**(4839): 487-91.
100. Smith DR. Agarose Gel Electrophoresis. In: Murphy D, Carter DA, eds. *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 1993: 433-8.
101. Feldman AT, Wolfe D. Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In: Day CE, ed. *Histopathology: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2014: 31-43.
102. Richart RM. A clinical staining test for the in vivo delineation of dysplasia and carcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol* 1963; **86**: 703-12.
103. Hughes CS, Moggridge S, Muller T, Sorensen PH, Morin GB, Krijgsveld J. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat Protoc* 2019; **14**(1): 68-85.
104. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 1995; **57**(1): 289-300.
105. Margarone JE, Natiella JR, Vaughan CD. Artifacts in oral biopsy specimens. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1985; **43**(3): 163-72.
106. Rosene DL, Roy NJ, Davis BJ. A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. *J Histochem Cytochem* 1986; **34**(10): 1301-15.
107. Rosene DL, Rhodes KJ. [21] - Cryoprotection and Freezing Methods to Control Ice Crystal Artifact in Frozen Sections of Fixed and Unfixed Brain Tissue. In: Conn PM, ed. *Methods in Neurosciences*: Academic Press; 1990: 360-85.

108. Graham GG, Punt J, Arora M, et al. Clinical Pharmacokinetics of Metformin. *Clinical Pharmacokinetics* 2011; **50**(2): 81-98.
109. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and Genomics* 2012; **22**(11): 820-7.
110. Kovesdy CP, Furth S, Zoccali C. Obesity and kidney disease: Hidden consequences of the epidemic. *Indian J Nephrol* 2017; **27**(2): 85-92.
111. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(31): 11070-5.
112. Zhu J, Chen X, Song Y, Zhang Y, Zhou L, Wan L. Deficit of RACK1 contributes to the spatial memory impairment via upregulating BECLIN1 to induce autophagy. *Life Sciences* 2016; **151**: 115-21.
113. Yang H, Yang C, Zhu Q, et al. Rack1 Controls Parallel Fiber-Purkinje Cell Synaptogenesis and Synaptic Transmission. *Front Cell Neurosci* 2019; **13**: 539.
114. Zhou Y, Dhaher R, Parent M, et al. Selective deletion of glutamine synthetase in the mouse cerebral cortex induces glial dysfunction and vascular impairment that precede epilepsy and neurodegeneration. *Neurochem Int* 2019; **123**: 22-33.
115. Kadoyama K, Matsuura K, Takano M, Maekura K, Inoue Y, Matsuyama S. Changes in the expression of prefoldin subunit 5 depending on synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *Neuroscience Letters* 2019; **712**: 134484.
116. Gibson HE, Reim K, Brose N, Morton AJ, Jones S. A similar impairment in CA3 mossy fibre LTP in the R6/2 mouse model of Huntington's disease and in the complexin II knockout mouse. *Eur J Neurosci* 2005; **22**(7): 1701-12.
117. Glynn D, Bortnick RA, Morton AJ. Complexin II is essential for normal neurological function in mice. *Hum Mol Genet* 2003; **12**(19): 2431-48.
118. Ulfat AK, Batool S, Iqbal F, Syed NI. Selective Menin Deletion in the Hippocampal CA1 Region Leads to Disruption of Contextual Memory in the MEN1 Conditional Knockout Mouse: Behavioral Restoration and Gain of Function following the Reintroduction of MEN1 Gene. *Cells* 2022; **11**(24).
119. Hoyk Z, Tóth ME, Lénárt N, et al. Cerebrovascular Pathology in Hypertriglyceridemic APOB-100 Transgenic Mice. *Front Cell Neurosci* 2018; **12**: 380.
120. Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, et al. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* 2015; **85**(2): 296-302.
121. Lénárt N, Szegedi V, Juhász G, et al. Increased tau phosphorylation and impaired presynaptic function in hypertriglyceridemic ApoB-100 transgenic mice. *PLoS One* 2012; **7**(9): e46007.
122. Yang C, Tang J, Liang X, et al. Anti-LINGO-1 antibody treatment improves chronic stress-induced spatial memory impairments and oligodendrocyte loss in the hippocampus. *Behavioural Brain Research* 2020; **393**: 112765.
123. Yang H, Jiang L, Zhang Y, et al. Anti-LINGO-1 antibody treatment alleviates cognitive deficits and promotes maturation of oligodendrocytes in the hippocampus of APP/PS1 mice. *J Comp Neurol* 2022; **530**(10): 1606-21.
124. Xie Y-h, Jiang L, Zhang Y, et al. Antagonizing LINGO-1 reduces activated microglia and alleviates dendritic spine loss in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience Letters* 2024; **820**: 137612.
125. Akaneya Y, Sohya K, Kitamura A, et al. Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development. *PLoS One* 2010; **5**(8): e12486.
126. Gao WQ, Shinsky N, Armanini MP, et al. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by the tyrosine kinase receptor, REK7/EphA5, and its ligand, AL-1/Ephrin-A5. *Mol Cell Neurosci* 1998; **11**(5-6): 247-59.
127. Stottmann RW, Driver A, Gutierrez A, et al. A heterozygous mutation in tubulin, beta 2B ( Tubb2b ) causes cognitive deficits and hippocampal disorganization. *Genes Brain Behav* 2017; **16**(2): 250-9.
128. Duveau V, Laustela S, Barth L, et al. Spatiotemporal specificity of GABAA receptor-mediated regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 2011; **34**(3): 362-73.

129. Tatarkova Z, Kovalska M, Timkova V, Racay P, Lehotsky J, Kaplan P. The Effect of Aging on Mitochondrial Complex I and the Extent of Oxidative Stress in the Rat Brain Cortex. *Neurochem Res* 2016; **41**(8): 2160-72.
130. Grad LI, Lemire BD. Mitochondrial complex I mutations in *Caenorhabditis elegans* produce cytochrome c oxidase deficiency, oxidative stress and vitamin-responsive lactic acidosis. *Hum Mol Genet* 2004; **13**(3): 303-14.
131. Chen J-J, Tao J, Zhang X-L, et al. Inhibition of the ox-LDL-Induced Pyroptosis by FGF21 of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Through the TET2-UQCRC1-ROS Pathway. *DNA and Cell Biology* 2020; **39**(4): 661-70.
132. Shibanuma M, Inoue A, Ushida K, et al. Importance of mitochondrial dysfunction in oxidative stress response: A comparative study of gene expression profiles. *Free Radical Research* 2011; **45**(6): 672-80.
133. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999; **13**(1): 76-86.
134. Canning P, Sorrell FJ, Bullock AN. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radic Biol Med* 2015; **88**(Pt B): 101-7.
135. Ebrahimnezhad N, Nayebifar S, Soltani Z, Khoramipour K. High-intensity interval training reduced oxidative stress and apoptosis in the hippocampus of male rats with type 2 diabetes: The role of the PGC1 $\alpha$ -Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Iran J Basic Med Sci* 2023; **26**(11): 1313-9.
136. Zhou Y, Li SF, Deng LS, Ma YK, Lei G, Dang YH. HINT1 deficiency in aged mice reduces anxiety-like and depression-like behaviours and enhances cognitive performances. *Exp Gerontol* 2022; **159**: 111683.
137. Hei Y, Chen R, Yi X, Long Q, Gao D, Liu W. HMGB1 Neutralization Attenuates Hippocampal Neuronal Death and Cognitive Impairment in Rats with Chronic Cerebral Hypoperfusion via Suppressing Inflammatory Responses and Oxidative Stress. *Neuroscience* 2018; **383**: 150-9.
138. Liu H, Yang J, Wang K, Niu T, Huang D. Moderate- and Low-Dose of Atorvastatin Alleviate Cognition Impairment Induced by High-Fat Diet via Sirt1 Activation. *Neurochemical Research* 2019; **44**(5): 1065-78.
139. Yu M, Huang H, Dong S, Sha H, Wei W, Liu C. High mobility group box-1 mediates hippocampal inflammation and contributes to cognitive deficits in high-fat high-fructose diet-induced obese rats. *Brain Behav Immun* 2019; **82**: 167-77.
140. Sobesky JL, D'Angelo HM, Weber MD, et al. Glucocorticoids Mediate Short-Term High-Fat Diet Induction of Neuroinflammatory Priming, the NLRP3 Inflammasome, and the Danger Signal HMGB1. *eNeuro* 2016; **3**(4).
141. Volk L, Kim CH, Takamiya K, Yu Y, Huganir RL. Developmental regulation of protein interacting with C kinase 1 (PICK1) function in hippocampal synaptic plasticity and learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**(50): 21784-9.
142. Cicvaric A, Yang J, Krieger S, et al. The brain-tumor related protein podoplanin regulates synaptic plasticity and hippocampus-dependent learning and memory. *Ann Med* 2016; **48**(8): 652-68.
143. Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Taupenot L, et al. Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J Biol Chem* 1998; **273**(23): 14339-46.
144. Bandyopadhyay GK, Lu M, Avolio E, et al. Pancreastatin-dependent inflammatory signaling mediates obesity-induced insulin resistance. *Diabetes* 2015; **64**(1): 104-16.
145. Hait NC, Wise LE, Allegood JC, et al. Active, phosphorylated fingolimod inhibits histone deacetylases and facilitates fear extinction memory. *Nat Neurosci* 2014; **17**(7): 971-80.
146. Lei M, Shafique A, Shang K, et al. Contextual fear conditioning is enhanced in mice lacking functional sphingosine kinase 2. *Behavioural Brain Research* 2017; **333**: 9-16.
147. Zhou W, He Y, Rehman AU, et al. Loss of function of NCOR1 and NCOR2 impairs memory through a novel GABAergic hypothalamus-CA3 projection. *Nat Neurosci* 2019; **22**(2): 205-17.
148. Ma H, He S, Li Y, et al. Augmented Mitochondrial Transfer Involved in Astrocytic PSPH Attenuates Cognitive Dysfunction in db/db Mice. *Molecular Neurobiology* 2024.

149. Yu S, Galeffi F, Rodriguiz RM, et al. Small ubiquitin-like modifier 2 (SUMO2) is critical for memory processes in mice. *Faseb j* 2020; **34**(11): 14750-67.
150. Hu GY, Hvalby O, Walaas SI, et al. Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation. *Nature* 1987; **328**(6129): 426-9.
151. Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA. Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 1986; **321**(6066): 175-7.
152. Colgan LA, Parra-Bueno P, Holman HL, et al. Dual Regulation of Spine-Specific and Synapse-to-Nucleus Signaling by PKC $\delta$  during Plasticity. *J Neurosci* 2023; **43**(30): 5432-47.
153. Zalcman G, Federman N, Fiszbein A, et al. Sustained CaMKII Delta Gene Expression Is Specifically Required for Long-Lasting Memories in Mice. *Mol Neurobiol* 2019; **56**(2): 1437-50.
154. Alcott CE, Yalamanchili HK, Ji P, et al. Partial loss of CFIm25 causes learning deficits and aberrant neuronal alternative polyadenylation. *Elife* 2020; **9**.
155. Kouser M, Speed HE, Dewey CM, et al. Loss of predominant Shank3 isoforms results in hippocampus-dependent impairments in behavior and synaptic transmission. *J Neurosci* 2013; **33**(47): 18448-68.
156. Wang X, McCoy PA, Rodriguiz RM, et al. Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Hum Mol Genet* 2011; **20**(15): 3093-108.
157. Zhu D, Li C, Swanson AM, et al. BAI1 regulates spatial learning and synaptic plasticity in the hippocampus. *J Clin Invest* 2015; **125**(4): 1497-508.
158. Carlisle HJ, Luong TN, Medina-Marino A, et al. Deletion of densin-180 results in abnormal behaviors associated with mental illness and reduces mGluR5 and DISC1 in the postsynaptic density fraction. *J Neurosci* 2011; **31**(45): 16194-207.
159. Sandau US, Colino-Oliveira M, Jones A, et al. Adenosine Kinase Deficiency in the Brain Results in Maladaptive Synaptic Plasticity. *J Neurosci* 2016; **36**(48): 12117-28.
160. Vaillend C, Billard J-M, Laroche S. Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmdmdx mouse. *Neurobiology of Disease* 2004; **17**(1): 10-20.
161. Yu B, Liu J, Su M, Wang C, Chen H, Zhao C. Disruption of Foxg1 impairs neural plasticity leading to social and cognitive behavioral defects. *Mol Brain* 2019; **12**(1): 63.
162. Zhang T, Shi Z, Wang Y, et al. Akt3 deletion in mice impairs spatial cognition and hippocampal CA1 long long-term potentiation through downregulation of mTOR. *Acta Physiol (Oxf)* 2019; **225**(1): e13167.
163. Howell KR, Floyd K, Law AJ. PKBy/AKT3 loss-of-function causes learning and memory deficits and deregulation of AKT/mTORC2 signaling: Relevance for schizophrenia. *PLoS One* 2017; **12**(5): e0175993.
164. Peters M, Mizuno K, Ris L, Angelo M, Godaux E, Giese KP. Loss of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase kinase beta affects the formation of some, but not all, types of hippocampus-dependent long-term memory. *J Neurosci* 2003; **23**(30): 9752-60.
165. Mizuno K, Antunes-Martins A, Ris L, Peters M, Godaux E, Giese KP. Calcium/calmodulin kinase kinase  $\beta$  has a male-specific role in memory formation. *Neuroscience* 2007; **145**(2): 393-402.
166. Zhang R, Hou T, Cheng H, Wang X. NDUFB1 protects against obesity and insulin resistance by enhancing mitochondrial metabolism. *Faseb j* 2019; **33**(12): 13310-22.
167. Wang YN, Zhou L, Li YH, et al. Protein Interacting with C-Kinase 1 Deficiency Impairs Glutathione Synthesis and Increases Oxidative Stress via Reduction of Surface Excitatory Amino Acid Carrier 1. *J Neurosci* 2015; **35**(16): 6429-43.
168. Gao L, Wang M, Liao L, et al. A Slc25a46 Mouse Model Simulating Age-Associated Motor Deficit, Redox Imbalance, and Mitochondria Dysfunction. *The Journals of Gerontology: Series A* 2021; **76**(3): 440-7.
169. Docrat TF, Nagiah S, Naicker N, Baijnath S, Singh S, Chuturgoon AA. The protective effect of metformin on mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in diabetic mice brain. *Eur J Pharmacol* 2020; **875**: 173059.
170. Wang J, Le T, Wei R, Jiao Y. Knockdown of JMJD1C, a target gene of hsa-miR-590-3p, inhibits mitochondrial dysfunction and oxidative stress in MPP<sup>+</sup>-treated MES23.5 and SH-SY5Y cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2016; **62**(3): 39-45.

171. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 2018; **54**(4): 287-93.
172. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; **402**(6762): 672-6.
173. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**(25): 15077-82.
174. Pickford F, Masliah E, Britschgi M, et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* 2008; **118**(6): 2190-9.
175. Xie Z, Lau K, Eby B, et al. Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice. *Diabetes* 2011; **60**(6): 1770-8.
176. Liu S, Yue C, Chen H, Chen Y, Li G. Metformin Promotes Beclin1-Dependent Autophagy to Inhibit the Progression of Gastric Cancer. *Onco Targets Ther* 2020; **13**: 4445-55.
177. Tomic T, Botton T, Cerezo M, et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death & Disease* 2011; **2**(9): e199-e.
178. Hu Q, Qin Y, Xiang J, et al. dCK negatively regulates the NRF2/ARE axis and ROS production in pancreatic cancer. *Cell Prolif* 2018; **51**(4): e12456.
179. Dash S, Ueda T, Komuro A, Honda M, Sugisawa R, Okada H. Deoxycytidine kinase inactivation enhances gemcitabine resistance and sensitizes mitochondrial metabolism interference in pancreatic cancer. *Cell Death & Disease* 2024; **15**(2): 131.
180. Mynhardt C, Damelin LH, Jivan R, et al. Metformin-induced alterations in nucleotide metabolism cause 5-fluorouracil resistance but gemcitabine susceptibility in oesophageal squamous cell carcinoma. *J Cell Biochem* 2018; **119**(1): 1193-203.
181. Rahim T, Becquart P, Baeva ME, Quandt J. Expression of the neuroprotective protein aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 correlates with neuronal stress and disability in models of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2018; **15**(1): 270.
182. Drutel G, Héron A, Kathmann M, et al. ARNT2, a transcription factor for brain neuron survival? *Eur J Neurosci* 1999; **11**(5): 1545-53.
183. van der Vaart B, Franker MA, Kuijpers M, et al. Microtubule plus-end tracking proteins SLAIN1/2 and ch-TOG promote axonal development. *J Neurosci* 2012; **32**(42): 14722-8.
184. Baas PW, Rao AN, Matamoros AJ, Leo L. Stability properties of neuronal microtubules. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2016; **73**(9): 442-60.
185. Le Q, Yao W, Chen Y, et al. GRK6 regulates ROS response and maintains hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Death Dis* 2016; **7**(11): e2478.
186. Funato Y, Miki H. Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. *Antioxid Redox Signal* 2007; **9**(8): 1035-57.
187. Idelfonso-García OG, Alarcón-Sánchez BR, Vásquez-Garzón VR, et al. Is Nucleoredoxin a Master Regulator of Cellular Redox Homeostasis? Its Implication in Different Pathologies. *Antioxidants (Basel)* 2022; **11**(4).
188. Kneeshaw S, Keyani R, Delorme-Hinoux V, et al. Nucleoredoxin guards against oxidative stress by protecting antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; **114**(31): 8414-9.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....  | 33 |
| Abb. 2: Exemplarische Darstellung der Lasermikrodissektion.....  | 38 |
| Abb. 3: Exemplarische Aufnahmen aller durchgeführten immunhistochemischen Färbungen<br>.....             | 44 |
| Abb. 4: Hauptkomponentenanalyse aller detektierten Proteine.....   | 45 |
| Abb. 5: Volcano Plots aller detektierten Proteine in den jeweiligen Gruppenvergleichen .....             | 46 |
| Abb. 6: Venn-Diagramm der signifikant und relevant veränderten Proteine aller<br>Gruppenvergleiche ..... | 68 |
| Abb. 7: STRING-Analyse signifikant und relevant veränderter Proteine im Vergleich HFD vs.<br>SD.....     | 75 |
| Abb. 8: STRING-Analyse signifikant und relevant veränderter Proteine im Vergleich HFD+MF<br>vs. HFD..... | 78 |
| Abb. 9: STRING-Analyse signifikant und relevant veränderter Proteine im Vergleich SD+MF vs.<br>SD.....   | 80 |

### 7.2 Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Chemikalien und Enzyme .....  | 27 |
| Tabelle 2: Stammlösungen und Puffer.....   | 27 |
| Tabelle 3: Primer.....   | 28 |
| Tabelle 4: Primärantikörper .....  | 28 |
| Tabelle 5: Sekundärantikörper.....   | 29 |
| Tabelle 6: Geräte.....   | 30 |
| Tabelle 7: Arbeits- und Verbrauchsmaterialien .....  | 31 |
| Tabelle 8: Software und Datenbanken.....   | 31 |
| Tabelle 9: Vergleichende Darstellung der Zusammensetzung der SD und HFD <sup>97</sup> .....      | 32 |
| Tabelle 10: Signifikant hochregulierte Proteine HFD vs. SD .....                                 | 49 |
| Tabelle 11: Signifikant runterregulierte Proteine HFD vs. SD.....                                | 54 |
| Tabelle 12: Signifikant hochregulierte Proteine HFD+MF vs. HFD.....                              | 58 |
| Tabelle 13: Signifikant runterregulierte Proteine HFD+MF vs. HFD .....                           | 64 |
| Tabelle 14: Signifikant hochregulierte Proteine SD+MF vs. SD .....                               | 65 |
| Tabelle 15: Signifikant runterregulierte Proteine SD+MF vs. SD.....                              | 66 |
| Tabelle 16: Signifikant und relevant veränderte Proteine HFD vs. SD und HFD+MF vs. HFD<br>.....  | 71 |
| Tabelle 17: Signifikant und relevant veränderte Proteine SD+MF vs. SD und HFD+MF vs.<br>HFD..... | 72 |

Tabelle 18: Signifikant und relevant veränderte Proteine HFD vs. SD und SD+MF vs. SD ...73