Aus der Abteilung für Versuchstierkunde
(Leiterin Univ. - Prof. Dr. Dr. Ingrid Klöting)
dem Institut für Pathophysiologie
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. Heinrich Brinkmeier)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema: **Identifikation von Genen für Facetten des Metabolischen Syndroms bei WOKW-Ratten und ihren kongenen Derivaten**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Naturwissenschaften in der Medizin
(Dr. rer. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2010

vorgelegt von: Romy Baguhl
geb. am: 31.07. 1980
in: Güstrow

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
1. Gutachter:	Prof. Dr. agr. habil. Dr. rer. med. habil. I. Klöting
2. Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. W. Weitschies
(3. Gutachter:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Gardemann)
Tag der Disputation:	04.10.2010
Ort, Raum:	Institut für Urologie, Hörsaal

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis i

II Abbildungsverzeichnis iii

III Tabellenverzeichnis v

IV Abkürzungen und Einheiten vi

1. Einleitung 1

1.1. Das Metabolische Syndrom 1
1.1.1. Definition, Diagnose und Prävalenz 1
1.1.2. Pathogenese 3
1.1.3. Kandidatengene für die Entstehung des MetS 6
1.1.3.1. *Repin1* als mögliches Kandidatengen 10
1.1.4. Metabolisches Imprinting und epigenetische Faktoren 10
1.1.5. Die WOKW-Ratte als Modelltier für das Metabolische Syndrom 13
1.1.6. Kongene BB-Ratten als Modelle für das Metabolische Syndrom 15

1.2. Zielstellung 16

2. Material und Methoden 17

2.1. Materialien 17
2.1.1. Rattenstämme 17
2.1.2. Chemikalien und Enzyme 18
2.1.3. Oligonukleotid-Sequenzen 18
2.1.3.1. Primer für die Kartierung 18
2.1.3.2. Primer für die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) 19
2.1.3.3. Primer für die Sequenzierung 20
2.1.4. Antikörper 21
2.1.5. Größenstandards 21
2.1.6. Bioinformatik-Software und Datenbanken 21

2.2. Methoden 22
2.2.1. Generierung kongener DA.WOKW-Ratten 22
2.2.2. Phänotypische Charakterisierung kongener DA.WOKW- sowie DA- und WOKW-Ratten 22
2.2.3. Genotypisierung kongener DA.WOKW-Ratten 23
2.2.4. RNA-Analyse und cDNA-Synthese 23
2.2.5. Quantitative Real-Time-PCR 24
2.2.6. DNA-Sequenzierung 25
2.2.7. Isolierung von Proteinen aus Fettgewebe und Bestimmung der Gesamtprotein-konzentration 26
2.2.8. Trennung von Proteinen in der SDS-PAGE und Detektion mit Antikörpern 26
2.2.9. Statistischen Datenanalyse 27

3. Ergebnisse 28

3.1. Genotypisierung der Chromosomen 3, 5, 10 und 16 der kongenen DA.WOKW- Ratten 28

3.2. Charakterisierung des Phänotyps der kongenen DA.WOKW-Ratten 32
3.2.1. Bestimmung der Körpermasse 32
3.2.2. Adipositas Index, Serumleptin und Seruminsulin 33
3.2.3. Bestimmung der Serumlipidwerte 36

3.3. Genexpression in DA, WOKW und den kongenen Linien im Fettgewebe 39
3.3.1. Genexpression von Adipokinen 39
3.3.2. Expression von *Glut4* 42
3.3.3. Expression von *Fasn* 43

3.3.4. Expression von *Lpl* ... 44
3.3.5. Expression von Kandidatengenen des distalen Bereichs von Chromosom 3 ... 45
3.3.6. Expression von Kandidatengenen auf Chromosom 10 ... 49
3.3.7. Expression von *Cip98* in WOKW, DA und DA.5W ... 50

3.4. Genexpression in DA, WOKW und DA.3aW im Hypothalamus ... **51**

3.5. Genexpression in DA, WOKW und DA.3aW in der Leber ... **53**

3.6. Expression von *Pck1* in der Niere ... **55**

3.7. Detektion von Dlk1 im subkutanen Fett von DA, WOKW und DA.3aW ... **56**

3.8. Sequenzierung möglicher Kandidatengene ... **57**

3.9. Untersuchung von *Repin1* als mögliches Kandidatengen ... **60**
3.9.1. Altersabhängigkeit der Repin1-Proteinkonzentration ... 60
3.9.2. Repin1 in DA, WOKW und DA.3aW ... 63

4. Diskussion ... **68**

4.1. Gene auf den Chromosomen 3, 5, 10 und 16 der Ratte sind in der Entwicklung von Facetten des MetS beteiligt ... **69**

4.2. Gene auf dem Chromosom 5 beeinflussen die Expression von *Pparg* und *Adipoq* im Fettgewebe ... **72**

4.3. Gene auf den Chromosomen 5 und 16 könnten in der Regulation der *Glut4-*, *Lpl-* und *Fasn*-Expression im Fettgewebe involviert sein und somit die Insulinsensitivität beeinflussen ... **74**

4.4. Kandidatengene in der kongenen Region auf dem distalen Chromosom 3 ... **77**
4.4.1. *Pck1* als mögliches Kandidatengen ... 79

4.5. Kandidatengene auf dem Chromosom 10 ... **81**

4.6. Die Repin1-Proteinkonzentration ist abhängig von den TTT-Repeats in der 3'UTR ... **83**

5. Zusammenfassung ... **86**

6. Literatur ... **88**

Eidesstattliche Erklärung ... **102**

Lebenslauf ... **103**

Danksagung ... **105**

Anlage Baguhl et al.

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Folgen der Insulinresistenz in Muskel, Fettgewebe und Leber	4
Abbildung 2:	Genotypische Merkmale der kongenen Chromosomen 3, 5, 10 und 16	28
Abbildung 3:	Körpermasse der DA-Ratten sowie der kongenen Linien in Abhängigkeit vom Alter	33
Abbildung 4:	AI, Leptin- und Insulinwerte	35
Abbildung 5:	Triglycerid- und Cholesterolwerte in Abhängigkeit vom Alter	36
Abbildung 6:	Lipoproteinwerte in Abhängigkeit vom Alter	38
Abbildung 7:	Expression von Adipokinen im subkutanen und epididymalen Fettgewebe	40
Abbildung 8:	Expression von *Tnfa* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe	41
Abbildung 9:	Expression von *Glut4* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe	42
Abbildung 10:	Expression von *Fasn* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe	43
Abbildung 11:	Expression von *Lpl* im subkutanen Fettgewebe	44
Abbildung 12:	Expression von *Pltp* und *Acss2* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe von WOKW, DA.3aW und DA	45
Abbildung 13:	Expression von *Pla2g4b* und *Plcg1* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe von WOKW, DA.3aW und DA	46
Abbildung 14:	Expression von *Foxa2* und *Hnf4α* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe von WOKW, DA.3aW und DA	47
Abbildung 15:	Expression von *Dlgap4*, *Snta1* und *Pofut1* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe von WOKW, DA.3aW und DA	48
Abbildung 16:	Expression von Kandidatengenen des Chromosoms 10 im subkutanen und epididymalen Fettgewebe	49
Abbildung 17:	Expression von *Cip98* im Fettgewebe von DA, WOKW und DA.5W	51
Abbildung 18:	Expression von Kandidatengenen im Hypothalamus von DA, WOKW und DA.3aW	52
Abbildung 19:	Expression von Kandidatengenen in der Leber von DA, WOKW und DA.3aW	53
Abbildung 20:	Expression von Kandidatengenen in der Leber von DA, WOKW und DA.3aW	54
Abbildung 21:	Expression von *Pck1* in der Niere von WOKW, DA und DA.3aW	55
Abbildung 22:	Nachweis von Dlk1 im subkutanen Fettgewebe von DA, WOKW und DA.3aW	56
Abbildung 23:	Der SNP in *Pck1* führt zu dem Verlust einer NIP-Bindestelle in WOKW und DA.3aW	59
Abbildung 24:	Altersabhängigkeit der Repin1-Konzentration in BB.4S	61
Abbildung 25:	Altersabhängigkeit der Repin1-Konzentration in BB.4W	62
Abbildung 26:	Altersabhängigkeit der Repin1-Konzentration in DA-Ratten	63
Abbildung 27:	Repin1 im subkutanen Fettgewebe von DA und DA.3aW	64
Abbildung 28:	Repin1 im epididymalen Fettgewebe von DA und DA.3aW	65

Abbildung 29: Repin1 im subkutanen Fettgewebe von WOKW und DA 66
Abbildung 30: Repin1 im epididymalen Fettgewebe von WOKW und DA 67

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammenfassung der allgemeinen Definitionen des MetS nach Huang et al. [7]	2
Tabelle 2:	Kartierung der Chromosomen 3 und 5 in kongenen DA.3aW, DA.3bW bzw. DA.5W	30
Tabelle 3:	Kartierung der Chromosomen 10 und 16 in kongenen DA.10W bzw. DA.16W	31
Tabelle 4:	Sequenzierung von *Pck1*	58

IV Abkürzungen und Einheiten

µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AI	Adipositas Index
AS	Aminosäure
BB/OK	Bio Breeding Ottawa Karlsburg
BMI	Body Mass Index
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Chr.	Chromosom
DA	Dark Agouti
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Epi	epididymales Fettgewebe
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
IR	Insulinresistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
MetS	Metabolisches Syndrom
Min	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
ng	Nanogramm
P	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
QTL	Quantitative Trait Loci
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
SD	Standardabweichung
Sek	Sekunde
SHR	Spontan Hypertensive Ratte
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Sub	subkutanes Fettgewebe
T	Thymin
Tab.	Tabelle
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TG	Triglyceride
U/Min	Umdrehung pro Minute
UTR	Untranslated Region
V	Volt
WOKW	Wistar Ottawa Karlsburg W

1. Einleitung

1.1. Das Metabolische Syndrom

1.1.1. Definition, Diagnose und Prävalenz

Das Metabolische Syndrom (MetS) ist auch unter den Begriffen Syndrom X oder tödliches Quartett bekannt [1], da es sich aus mehreren Facetten zusammensetzt. Eine einheitliche Definition ist bis heute noch nicht festgelegt. Die International Diabetes Federation (IDF) hat in den Mittelpunkt ihrer Kriterien das Vorhandensein einer Adipositas gestellt, insbesondere einer bauchbetonten Adipositas. Als Marker dient dabei ein Taillenumfang von > 94 cm bei Männern und von > 80 cm bei Frauen. Kommen zum Risikofaktor Adipositas noch zwei der im Folgenden aufgeführten Faktoren hinzu, dann liegt das Metabolische Syndrom vor. Zu den Weiteren Risikofaktoren zählen erhöhte Nüchternblutzuckerwerte von > 5,6 mmol/l (bzw. > 100 mg/dL) oder ein bereits diagnostizierter Diabetes mellitus Typ 2, eine Fettstoffwechsel-störung mit erhöhten Triglyceridwerten von > 1,7 mmol/l und verminderten HDL-Cholesterolwerten von < 1,1 mmol/l bei Männern und < 1,3 mmol/l bei Frauen sowie Bluthochdruck (ab > 130 mmHg systolisch und > 85 mmHG diastolisch) [2].
Außerdem existieren u.a. auch die häufig zitierte Definition der World Health Organisation (WHO) und der Bericht des National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel (NCEP-ATP III) [3, 4]. Differenzen in den Definitionen findet man hauptsächlich hinsichtlich der Grenzwerte für Adipositas und Hyperglykämie.
Nach den Kriterien des NCEP-ATP III müssen drei der oben genannten typischen Merkmale zusammen auftreten, um ein Metabolisches Syndrom zu diagnostizieren. Im Unterschied zur IDF-Definition, rückt eine Adipositas aber nicht in den Mittelpunkt der NCEP-Kriterien. Für die WHO ist eine Insulinresistenz Voraussetzung für das MetS. Als Marker für die Insulinresistenz zählen ein manifestierter Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM), ein erhöhter Nüchternglukosespiegel oder eine gestörte Glukosetoleranz. Zu den weiteren Risikofaktoren zählt die WHO auch eine Mikroalbuminurie. Außerdem betrachtet die WHO, im Unterschied zu der IDF und des NCEP-ATP III, einen erhöhten Body Mass Index (BMI) und das Taillen-Hüfte-Verhältnis als Kriterium für eine Adipositas (Tab. 1).

Tab. 1 Zusammenfassung der allgemeinen Definitionen des MetS nach Huang et al. [7]

Definition	Diagnose MetS	Glukose [mg/dL]	Adipositas
NCEP-ATP III	mindestens 3 Risikofaktoren	Nüchternglukose ≥ 100	Taillenumfang > 102 cm (♂), > 88 cm (♀)
WHO	gestörte Glukosetoleranz/ Diabetes/ Insulinresistenz und 2 weitere Faktoren	Nüchternglukose ≥ 110 oder Diabetes	BMI ≥ 30 kg/m² oder Taille/ Hüfte > 0,90 (♂), > 0,85 (♀)
IDF	Adipositas und 2 weitere Faktoren	Nüchternglukose ≥ 100 oder Diabetes	Taillenumfang > 94 cm (♂), > 80 cm (♀)

NCEP-ATP III, National Cholesterol Eductation Program-Adult Treatment Panel III; WHO, World Health Organization; IDF, International Diabetes Federation; BMI, Body Mass Index.
Dargestellt sind die Kriterien des NCEP-ATP III, der WHO und der IDF für die Diagnose MetS und die Grenzwerte einer Hyperglykämie sowie einer Adipositas.

In den letzten Jahrzehnten ist die Anzahl der an dem MetS Erkrankten weltweit angestiegen. Je nachdem welche Definition als Diagnose der Krankheit MetS angewandt wird, kann die Häufigkeit der Krankheitsfälle variieren. Nach den NCEP-ATP III-Kriterien entwickeln 25-30% der Deutschen über 50 Jahre ein Metabolisches Syndrom. Zieht man die Kriterien der IDF heran, deren Grenzwerte für den Taillenumfang und Nüchternglukose niedriger sind (Tab. 1), dann sind über 40% der Bevölkerung im mittleren und höheren Alter in Deutschland von der Krankheit betroffen [5].

In Amerika entwickeln nach NCEP-ATP III-Kriterien in der Gruppe der über 20-jährigen US-Amerikaner ca. 23,7% ein MetS. Die Krankheitsfälle steigen mit zunehmendem Alter an und erreichen 43,5% in der Gruppe der 60-69 Jährigen [6].

Besonders alarmierend ist die Tatsache, dass auch immer mehr Kinder und Jugendliche ein derartiges Krankheitsbild zeigen [7]. Die Ursachen für die Entstehung des Metabolischen Syndroms liegen in einem ungesunden Lebensstil, verbunden mit Bewegungsmangel und einer kalorienreichen Ernährung. Aber auch die genetische Prädisposition hat einen entscheidenden Einfluss.

Nicht zu unterschätzen sind auch die Folgeerkrankungen des MetS. So ist das Risiko, an kardiovaskulären Beschwerden zu erkranken, um das 2-Fache erhöht bei Patienten mit MetS. Das Risiko für T2DM ist sogar um das 5-Fache erhöht [5].

Um einer Erkrankung vorzubeugen oder ein bereits bestehendes MetS zu behandeln, steht an erster Stelle die Reduktion des Übergewichts in Form einer Kombination aus

Ernährungstherapie und Bewegung. Schon dadurch lassen sich der Blutzuckerspiegel senken und der Blutdruck sowie die Fettwerte normalisieren. Erst wenn diese Therapie nicht anschlägt, wird eine medikamentöse Behandlung angewandt [5].

1.1.2. Pathogenese

Die Aufklärung der Pathogenese des MetS wird durch die vielen Einflüsse, wie Umweltfaktoren und den genetischen sowie epigenetischen Faktoren erschwert. Dabei wird hauptsächlich einer Insulinresistenz oder einer viszeralen Adipositas die zentrale Rolle für die Entstehung des MetS eingeräumt. Aber es werden auch andere Krankheitsmodelle diskutiert, die über (i) ektopische Fettakkumulation z.B. in Leber, Skelettmuskel und auch Pankreas zu einer Lipotoxizität führen und die Insulinsensitivität beeinträchtigen und über (ii) eine veränderte Adipokinsekretion die Insulinresistenz beeinflussen [1, 8].

Insulinresistenz

Unter einer Insulinresistenz (IR) versteht man das verminderte Ansprechen der Zielzellen auf Insulin, was eine verminderte Insulinsensitivität mit reduzierter Glukoseaufnahme zur Folge hat. Um die verringerte Insulinsensitivität zu kompensieren, kommt es zu einer Hyperinsulinämie.

Die IR kann Leber, Muskel und Fettgewebe betreffen mit Folgen für den Energiestoffwechsel sowie der Lipoproteinsynthese (Abb. 1). Im Muskel kommt es zu einer verminderten Glukoseaufnahme durch die Membran. Da die Skelettmuskulatur 80% der postprandialen Glukose in die Myozyten aufnehmen und in der Glykolyse oxidieren muss oder als Glykogen speichert, trägt eine IR in diesem Organ zum größten Teil zu einer Hyperglykämie bei. In der Leber führt die IR zu einer Erhöhung der Glukoneogeneserate mit oder ohne unterdrückter Glykolyse und reduzierter Glukoseaufnahme [9, 10]. Im Fettgewebe ist die insulinvermittelte Glukoseaufnahme im Vergleich zum Muskel sehr gering, die aber auch im Fett bei einer IR sinkt. Im Fettgewebe reguliert das Insulin die Lipolyse, die Hydrolyse von Triglyceriden (TGs) zu Glycerol und freien Fettsäuren. Glycerol und die freien Fettsäuren werden aus den Adipozyten transportiert und gelangen in die Blutbahn.

Während einer Insulinresistenz steigt die Konzentration von zirkulierenden freien Fettsäuren durch eine uneingeschränkte Lipolyse und verminderte Aufnahme von freien

Fettsäuren in die Zellen an. Außerdem verstärkt die Konzentrationserhöhung der freien Fettsäuren die IR im Skelettmuskel [10]. In der Leber werden die freien Fettsäuren oxidiert und dienen als Substrat für eine gesteigerte Glukoneogenese sowie für eine übermäßige Triglyceridsynthese. Des Weiteren konkurrieren die freien Fettsäuren in den peripheren Geweben mit der Glukoseaufnahme und oxidativen Abbau, was eine reduzierte Glukoseaufnahme in die Zellen zur Folge hat. Diese Veränderungen führen zur ektopischen Fettakkumulation, einer Abnahme der HDL-Cholesterolkonzentration sowie einer Erhöhung der LDL-Cholesterolkonzentration. Diese Fakten zeigen, dass die IR einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der Dyslipidämie hat, einer Facette des Metabolischen Syndroms [9].

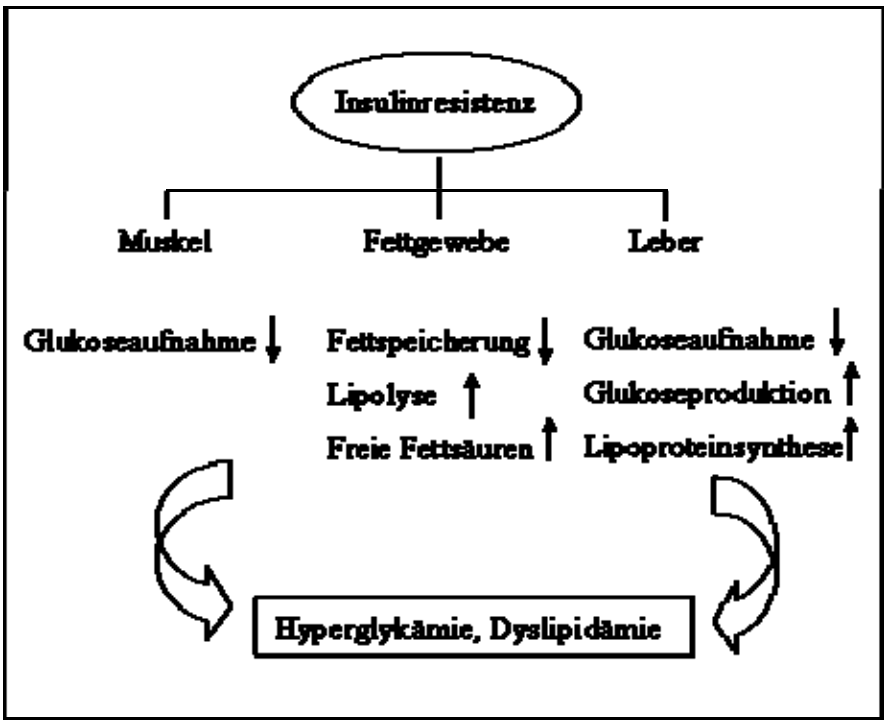

Abb. 1 Folgen der Insulinresistenz in Muskel, Fettgewebe und Leber
Die Insulinresistenz beeinflusst den Glukose- und Fettstoffwechsel sowie die Lipoproteinsynthese. Diese Veränderungen führen zu einer Hyperglykämie und Dyslipidämie.

Das Fettgewebe im Metabolischen Syndrom

Das Fettgewebe ist nicht nur Energie- und Wärmespeicher, sondern nimmt eine entscheidende Rolle als endokrines Organ ein. Die Fettzellen produzieren und sezernieren Hormone, Cytokine und Adipokine sowie andere bioaktive Substanzen wie freie

Fettsäuren. Viele dieser Stoffe sind wichtige Biomarker für Facetten des MetS. Zu diesen Biomarkern zählen Leptin, Adiponectin, Resistin, Retinol-binding Protein 4, Fatty-Acid Binding Protein und freie Fettsäuren wie auch die Lipase-Aktivität. Durch eine Adipositas wird die Produktion und Sekretion dieser Substanzen verändert, was die Entstehung des MetS zu begünstigen scheint [1]. So ist bekannt, dass die Plasmakonzentration von Adiponectin in Adipösen geringer ist, während die Plasmaresistinkonzentration in fettleibigen Menschen erhöht ist [11-13]. Adiponectin gehört zu den wichtigsten Adipokinen. Adiponectin erhöht die Oxidation von freien Fettsäuren im Skelettmuskel und reduziert die Glukoseproduktion in der Leber und hat somit einen positiven Effekt auf die Insulinsensitivität. Geringe Adiponectinspiegel sind mit IR und übermäßigen viszeralen Fettgewebe verbunden [8, 9].

Weiterhin spielen das Fettverteilungsmuster und die Menge des Fettgewebes eine wichtige Rolle. Vergrößerte Adipozyten scheinen ihre Fähigkeit, die Lagerung von Fett zu verlieren, aber bewirken eine steigende Konzentration von zirkulierenden freien Fettsäuren. Im viszeralen Fettgewebe ist die Konzentration von adrenergen Rezeptoren erhöht. Deshalb werden aus dem viszeralen Fettgewebe unter dem Einfluss von Katecholaminen (Adrenalin, Noradrenalin) sehr viel schneller Fettsäuren freigesetzt als aus dem subkutanen Fettgewebe [14]. Außerdem gelangen die freien Fettsäuren über die Pfortader direkt vom viszeralen Fettgewebe zur Leber und beeinflussen so den Lipoprotein- und Lipidmetabolismus sowie die Insulinwirkung [9].

Eine übermäßige viszerale Fettmasse und eine Zunahme der Fettzellgröße fördert die Produktion von inflammatorischen Adipokinen und Chemokinen (u.a. Tumor-Nekrose-Faktor alpha; TNFA, Interleukin 6; IL-6). Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von TNFA in Menschen mit einer viszeralen Adipositas im Fettgewebe sowie im Muskel erhöht ist. TNFA beeinflusst die Expression von Adipokinen, indem es die Expression von Leptin und IL-6 erhöht und die Adiponectin-Expression inhibiert. Außerdem stimuliert TNFA die Lipolyse und begünstigt so die Entwicklung einer IR und Hyperinsulinämie [9]. Diese Merkmale offenbaren eine sehr enge Vernetzung zwischen dem viszeralen Fettgewebe und dem MetS.

Es muss aber auch erwähnt werden, dass es Meinungen gibt, die dem viszeralen Fettgewebe keine zentrale Rolle für die Entstehung des MetS beimessen. Diese Studien besagen, dass auch das subkutane Fett die gleichen Effekte auf metabolische Veränderungen hat [1].

Wie Després und Lemieux vermuten, kann übermäßig viel viszerales Fettgewebe anzeigen, dass das subkutane Fettgewebe den Energieüberschuss von Individuen mit erhöhter Kalorienaufnahme und / oder Bewegungsmangel nicht mehr abpuffern kann [15]. Diese Dysfunktion des Fettgewebes, einhergehend mit einem veränderten Fettmetabolismus und veränderter Adiponectinfreisetzung aus dem viszeralen Fettgewebe, resultiert in einer ektopischen Fettakkumulation in Muskel, Herz und Leber sowie in den β-Zellen des Pankreas. Kann der Energieüberschuss aber weiterhin im subkutanen Fettgewebe gespeichert werden, dann schützt es diese Individuen vor der Entstehung des MetS.

Bei Adipositas produzieren akkumulierte Monozyten und Makrophagen im Fettgewebe proinflammatorische Proteine (Entzündungsmarker). Es wurden erhöhte Konzentrationen von Entzündungsmarkern wie C-reaktives Protein (CRP), TNFA oder IL-6 in Personen mit MetS oder mit einzelnen Facetten wie IR oder Adipositas gemessen. Deshalb wird diskutiert, ob eine chronische Entzündung der Grund für die Fettleibigkeit ist [9].
Diese Fakten untermauern, dass eine zu große Fettmasse eine wesentliche Ursache für die Entstehung metabolischer Veränderungen ist, die mit dem MetS assoziiert sind.

1.1.3. Kandidatengene für die Entstehung des MetS

Es ist bekannt, dass eine Wechselwirkung von Umweltfaktoren und genetischen Faktoren eine entscheidende Rolle in der Entstehung des MetS spielt. Die Erblichkeit des MetS liegt nach NCEP-Kriterien bei rund 30% [1]. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass es auch monogenetische Adipositaserkrankungen und Lipodystrophien gibt, die Hinweise auf mögliche Kandidatengene geben. Auf diese Erkrankungen wird in dieser Arbeit aber nicht näher eingegangen.
Vermutet wird, dass so genannte „Thrifty genes“ Risikogene für das MetS sind. Die „Thrifty Gene Hypothese“ besagt, dass Individuen einen Überlebensvorteil haben, deren Gene eine effiziente Energiespeicherung gewährleisten. In einer Umwelt mit Nahrungsknappheit haben diese Menschen einen Selektionsvorteil. Wenn sich der Nahrungsmangel aber in Nahrungsreichtum wandelt, dann ist dieser Selektionsvorteil nicht mehr positiv sondern schädlich, sie werden fett [16].
Momentan gibt es sehr viele Studien, die sich mit der Suche nach Kandidatengenen beschäftigt haben und weiterhin befassen. Die Ergebnisse dieser Studien sind oft

widersprüchlich, was darauf hinweist, dass sowohl Umweltfaktoren als auch epigenetische Faktoren den Einfluss der Polymorphismen modulieren können. Bis heute wurden keine Risikogene für das MetS identifiziert, aber für die einzelnen Facetten sind einige bekannt.

Adiponectin spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation von metabolischen und inflammatorischen Prozessen [9]. Adiponectin kartiert auf dem humanen Chromosomenabschnitt 3q27. Dieser Bereich enthält einen Locus für T2DM und MetS. Ein Aminosäureaustausch von Isoleucin mit Threonin an Position 164 (Ile164→Thr) wurde in Japanern mit T2DM oder koronaren Gefäßerkrankungen gefunden. Probanden mit diesem Austausch hatten unabhängig vom BMI signifikant geringere Plasma-adiponectinspiegel als Personen ohne die Aminosäure (AS)-Substitution [12]. Kyriakou et al. untersuchten den Einfluss von Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) im Adiponectin-Gen (*Adipoq*) und Promotor auf die Serumadiponectinkonzentration in zwei unabhängigen Gruppen von gesunden, kaukasischen Frauen (Chingford Study, Twins UK). In dieser Studie wurden vier SNPs gefunden, die mit dem Serumadiponectinspiegel assoziiert sind: -11391 G/A im Promotor, -10066 G/A und -7734 C/A im Intron 1 sowie +276 G/T im Intron 2 [17]. Bouatia-Naji et al. und Vasseur et al. konnten schon früher belegen, dass die beiden Promotor-SNPs an den Positionen -11391 G/A sowie -11377 C/G mit der Serumadiponectinkonzentration korrelieren [18, 19]. Wie Kyriakou et al. zeigen, haben die beiden SNPs im Promotor aber keinen Einfluss auf die Promotoraktivität [17]. Mehreren Studien belegen, dass die SNPs T/G im Exon 2 an Position +45 und G/T im Intron 2 an Position + 276 mit Serumadiponectin, Adipositas, Insulinsensitivität und T2DM assoziiert sind [12, 18, 20], was hingegen in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden konnte [21, 22].

Weiterhin ist die Expression der beiden Adiponectin-Rezeptoren (*Adipor1*, *Adipor2*) in adipösen Menschen erniedrigt, sowie in Menschen mit einer normalen Glukosetoleranz, die aber familiär mit T2DM vorbelastet sind. In verschiedenen Studien wurden Sequenzveränderungen in oder in der Nähe beider *Adipor*-Gene gefunden, die mit Faktoren des MetS assoziiert sind. Aber auch diese Ergebnisse werden kontrovers diskutiert [1]. Trotz aller nicht eindeutigen Studien, scheinen *Adipoq*- und *Adipor*-Varianten einen Einfluss auf die Entstehung des MetS zu haben.

Weiterhin wurde versucht, Leptin (*Lep*)-Genvarianten zu finden, die mit dem MetS assoziiert sind, da die physiologische Rolle dieses Proteins auf eine Verknüpfung in der Entstehung von Adipositas und dem MetS hinweist. Leptin wird von den Adipozyten

sezerniert, wobei die zirkulierende Leptinmenge positiv mit der Körperfettmasse korreliert und gelangt über die Blutbahn an Trägerproteine gebunden in das Gehirn, wo es an hypothalamische Rezeptoren bindet. Über die Regulation von orexigenen Neuropeptiden wird dann das Hungergefühl gebremst. Bis jetzt konnten nur wenige Mutationen in *Lep* oder im Leptinrezeptor (*Lepr*)-Gen identifiziert werden, die funktionell zulässig sind [1]. Oksanen et al. entdeckten in einer Studie mit 249 adipösen und 141 dünnen (BMI ≤ 25 kg/m²) Probanden einen C/A-Polymorphismus in der *Lep*- Promotorregion an der Position -188. Des Weiteren existieren auch die selten vorkommenden Mutationen im Codon 17 und Codon 110 [23].

Ein weiteres Kandidatengen ist der Perixosome proliferator-activated receptor γ (*Pparg*). *Pparg* codiert für die beiden Isoformen PPARγ1 und PPARγ2, die zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren gehören. PPARγ2 scheint spezifisch für das Fettgewebe zu sein. PPARγ beeinflusst die Adipozytendifferenzierung, unterstützt die Fettspeicherung und reguliert die Transkription von fettspezifischen Genen. Weit verbreitet in der kaukasischen Population ist der Pro12→Ala Polymorphismus, der auf einer Prolin→Alanin Substitution auf dem Codon 12 beruht. Auch die phänotypischen Auswirkungen dieser AS-Substitution werden widersprüchlich diskutiert. Die Ergebnisse von Ek et al. oder Sanchez et al. geben Hinweise auf eine Assoziation mit einem hohen BMI, Adipositas und IR [1, 16]. Aber in einer Studie von Deeb et al. ist dieser Polymorphismus mit einem niedrigen BMI und einer verbesserten Insulinsensitivität verbunden [16].

Ferner wurden im Resistin-Gen (*Retn*) verschiedene SNPs in mehreren Studien (u. a. Azuma et al., Ma et al., Osawa et al.) beschrieben, die mit Adipositas, IR und T2DM verknüpft sind. Auch Engert et al. konnten zwei SNPs (-537A→C, -420C→G) im *Retn*-Promotor identifizieren, die mit einem hohen BMI assoziiert sind. *Retn* wird hauptsächlich in Makrophagen expremiert, die in adipöses Fettgewebe einwandern und wird mit einer IR in Verbindung gebracht [1].

Tnfa-Genvarianten könnten auch die Entwicklung des MetS beeinflussen. Dabei liegt der Fokus der Studien auf zwei SNPs im *Tnfa*-Promotor (-308G→A, -238G→A). Einige Arbeiten bestätigen, dass diese SNPs in der Entstehung von IR, Adipositas und T2DM involviert sind [1].

Ein SNP im adrenergen Rezeptor β_3-Gen (*Adrb3*) der zum AS-Austausch von Tryptophan mit Arginin an der Position 64 (Trp64→Arg) führt, könnte in der Entstehung von Facetten des MetS beteiligt sein. Probanden mit dieser Mutation hatten mehr abdominales Fett,

höhere Insulinkonzentrationen und einen höheren Blutdruck als Probanden, die homozygot für den Wildtyp waren (Tryp64Trp). Viele Studien belegen, dass die Korrelation der Substitution mit phänotypischen Merkmalen des MetS populationsabhängig ist [1, 16].

Die Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 (ENPP1) inhibiert die Tyrosin Kinase-Aktivität des Insulinrezeptors. Ein SNP in *Enpp1* der zu einer AS-Substitution von Lysin mit Glutamin an Position 121 (Lys121→Gln) führt, wird in einer Studie von Pizzuti et al. mit IR in Verbindung gebracht. Außerdem ist dieser SNP sowohl in Diabetikern als auch in gesunden Menschen mit höheren Nüchternglukosewerten sowie höheren Insulinkonzentrationen und einem höheren systolischen Blutdruck assoziiert [1].

Weiterhin wird der Einfluss einer Missense-Mutation im Lipoprotein Lipase (*Lpl*) -Gen auf die Entstehung des MetS diskutiert, die zum Austausch von Asparagin mit Serin führt (Asn291→Ser). LPL hydrolisiert TGs von Lipoproteinen zu freien Fettsäuren und Glycerol. Dieses Enzym wird in Fettzellen, Muskelzellen und Makrophagen synthetisiert. Die Asn291→Ser Substitution ist mit einer Dyslipidämie assoziiert, die durch eine Hypertriglyceridämie sowie niedrigen HDL-Cholesterol- und niedrigen LDL-Cholesterolwerten gekennzeichnet ist [24]. Außerdem haben Träger dieser Substitution ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten [16].

Auch im Glukokortikoidrezeptor-Gen (*Nr3c1*) wurden verschiedene Polymorphismen identifiziert, die die Entwicklung von metabolen Abweichungen beeinflussen könnten. Der *Bcl*I-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus im Intron 2, hervorgerufen durch einen C→G Nukleotidaustausch, führt zu zwei verschiedenen Allelen der Größen 4,5 kb und 2,3 kb. Zahlreiche Studien belegen, dass dieser Polymorphismus mit verschiedenen phänotypischen Merkmalen des MetS wie viszeraler Adipositas, Bluthochdruck und IR verbunden ist [1, 25]. Ein Asn363→Ser Polymorphismus ist mit Bluthochdruck und Adipositas assoziiert. Wobei es aber eine Vielzahl von Studien gibt, die das nicht belegen. Der ER22/23EK-Polymorphismus beschreibt einen neutralen Nukleotidaustausch im Codon 22, der nicht zur Substitution von Glutamat (E) führt und einen Nukleotidaustausch im Codon 23 der in einer AS-Substitution von Arginin (R) zu Lysin (K) resultiert. Träger dieses Polymorphismus hatten niedrigere Gesamtcholesterol- und LDL-Cholesterolwerte sowie niedrigere Nüchterninsulinspiegel und eine verbesserte Insulinsensitivität im Vergleich mit Probanden, die diesen Polymorphismus nicht tragen. ER22/23EK-Träger scheinen ein gesünderes metaboles Profil zu haben. Männliche Träger sind größer, stärker und haben eine größere Muskelmasse. Frauen mit dem ER22/23EK-Polymorphismus

tendieren zu einem geringeren Taillen- und Hüftumfang sowie einer geringere Körpermasse [1].

1.1.3.1. *Repin1* als mögliches Kandidatengen

Repin1 (Replication initiator 1), auch bekannt als RIP60, ist ein Zinkfinger Protein mit DNA-Bindeaktivität und geringer Replikations-Enhancer-Aktivität. [26]. *Repin1* befindet sich an Position 76,7 Mb auf dem Chromosom 4 der Ratte in einem Bereich, in dem ein QTL (quantitative trait loci) für Serumtriglyceride, Gesamtcholesterol und Körpergewicht liegt [27, 28]. Sequenzanalysen von *Repin1* in mehreren Rattenstämmen (u.a. DA, WOKW, BB/OK, SHR, hHTG, Wilde Ratten) dokumentieren einen SNP an Position 449 (449T→C) in der codierenden Sequenz und ein Triplet Repeat (TTT) in der 3'-Untranslated Region (3'UTR). Die Anzahl der Triplet Repeats variiert von 5 bis 11. Wilde Ratten sind heterozygot für den SNP (T/C) und drei der vier untersuchten Wilden Ratten sind heterozygot für eine Repeatanzahl von 7 und 9. Die vierte Wilde Ratte ist homozygot für eine Repeatlänge von 7. Sieht man deshalb die Repeatlängen von 7 und 9 als Wild Typ an, dann sind die 5 TTT Repeats in SHR sowie die 11 Repeats in WOKW und hHTG Mutantenallele. Es ist vorstellbar, dass die TTT Repeats als cis-acting Elements die *Repin1*-Transkription in Abhängigkeit von der Repeatlänge beeinflussen, da die *Repin1*-Expression in der Leber mit der Repeatlänge korreliert.
Die Anzahl der Repeats ist in WOKW- und hHTG (Hypertryglezeridemischen)-Ratten am größten, zwei Rattenstämmen mit metabolischen Abweichungen. Interessanterweise korrelieren die Werte für phänotypische Merkmale wie das Körpergewicht, Serumlipide und Serum- insulin sowie Serumleptin positiv mit der Repeatlänge [29]. Diese Ergebnisse machen *Repin1* als mögliches Kandidatengen für die Entstehung der einzelnen Facetten des MetS interessant.

1.1.4. Metabolisches Imprinting und epigenetische Faktoren

Der Begriff metabolisches Imprinting oder metabolische Prägung beschreibt eine bleibende Prägung von Stoffwechselvorgängen durch Einflüsse während sensibler Phasen der Entwicklung, z.B. während der intrauterinen Wachstumsphase.
Die genetische Prädisposition des Fötus und insbesondere die maternale Ernährung haben einen entscheidenden Einfluss auf das fötale Wachstum und die Entwicklung des Fötus.

Zahlreiche humane Studien zeigen, dass eine Mangelernährung, Adipositas und Diabetes der Mutter während der Schwangerschaft und in der Stillzeit schwerwiegende Folgen auf den Nachwuchs haben.

Barker entwickelte eine Hypothese („Barker Hypothese“), die einen Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und später im Erwachsenenalter häufiger auftretendem MetS und koronaren Herzerkrankungen darstellt [30]. Nach Barker liegen die Wurzeln vieler, erst im Erwachsenenalter sich manifestierender, chronischer Erkrankungen wie MetS in einer gestörten intrauterinen Entwicklung, wobei Mangelernährung eine wichtige Rolle spielt.

Durch einen intrauterinen Mangelzustand wird die Glukoseverwertung gesteigert. Der Fötus stellt sich darauf ein, das Wenige besonders gut zu verwerten. Diese optimierte Verwertung hält auch postnatal und im weiteren Lebensverlauf an und führt bei ausreichender oder überschüssiger Nahrung vermehrt zu Adipositas oder MetS [30, 31]. Aber auch eine Überversorgung des Fötus hat diese Folgen. Das Ungeborene bekommt einen Überfluss an Nährstoffen und schon der Fötus sieht diesen Nahrungsreichtum als normal an. Durch die Über- oder Unterversorgung des Fötus wird ein Individuum geschaffen, das die Energiespeicherung während Zeiten des Überfluss maximiert und den Verlust von Energie in Hungerzeiten minimiert. In der heutigen nahrungsreichen Zeit besitzen diese Individuen ein erhöhtes Risiko an Adipositas und deren Folgen zu erkranken.

An Hand von Tierversuchen wurde belegt, dass fettreiche Fütterung und maternale Adipositas während der Schwangerschaft und des Säugens zu Adipositas und IR in der Nachkommenschaft führen. Im Gegensatz dazu könnte eine kohlenhydratreiche Ernährung einen schützenden Einfluss auf die Nachkommen haben. Nachkommen, deren Mütter kohlenhydratreiche Nahrung bekamen, haben ein geringeres Körpergewicht und reagierten sensitiver auf orexigene Neuropeptide. Wie in Menschen, kann eine maternale Unterernährung auch in Nagern zu Adipositas und dem MetS führen, wie Petri et al. oder Fernandez-Twin et al. in ihren Studien darstellten [31]. Zembrano et al. demonstrierten, dass die Ergebnisse geschlechtsabhängig sind. Weibliche Nachkommen von Muttertieren, die eine proteinarme Ernährung während der gesamten Schwangerschaft und der Zeit des Säugens erhielten, haben ein geringeres Körpergewicht, nehmen weniger Nahrung auf und haben eine erhöhte Insulinsensitivität im späteren Leben [31].

Ein häufig diskutierter Gedanke ist, dass sowohl ein Leptinmangel oder -überschuss als auch zu hohe oder zu niedrige Insulinkonzentrationen während der perinatalen Phase die Entwicklung neuronaler Stoffwechselwege beeinflussen können. Diese Veränderung wird durch die neurotrophen und metabolen Eigenschaften der beiden Hormone bewirkt. Es wird vermutet, dass Insulin über die Plazenta in den Fötus gelangt. 1996 beschrieben Jones et al., dass Nachkommen von Ratten denen im letzten Trimester der Schwangerschaft Insulin gespritzt wurde, im Erwachsenenalter adipös wurden. Außerdem könnte eine maternale Hyperinsulinämie über einen erhöhten Glukosetransport über die Plazenta im Fötus wirken. Das könnte zu einer fötalen Hyperglykämie führen, wie Kainer et al. 1997 vermuteten und der Grund für ein hohes Geburtsgewicht der Kinder von Müttern mit Gestationsdiabetes sein [31].
Leptin wird auch in der Plazenta gebildet, wie Studien in Mäusen, Ratten und Menschen belegen. Die Insulinbehandlung von Müttern mit T1DM führte zu einer gesteigerten Leptinproduktion in der Plazenta, was Lepercq et al. 1998 feststellten. Smith und Waddell zeigten, dass der Leptintransport und somit der fötale Plasmaleptinspiegel in Ratten im letzten Drittel der Schwangerschaft ansteigt. Daraus lässt sich ableiten, dass Föten von adipösen Ratten hyperleptinämisch sein müssten, was einen Einfluss auf die Gehirnentwicklung und die Entwicklung zentraler Stoffwechselwege der Energiehomöostase haben könnte. Auch postnatal könnten Insulin und Leptin ihre neurotrophen Effekte entfalten, da die beiden Hormone über die Muttermilch von dem Säugling aufgenommen werden [31].

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass die maternale Ernährung den epigenetischen Zustand des fötalen Genoms ändert. Epigenetische Faktoren beeinflussen die Genexpression, ohne die DNA-Sequenz zu verändern. Die Epigenetik beinhaltet Prozesse, die wie die DNA-Methylierung und Histon-Modifizierung die Transkription beeinflussen, sowie die Regulation über RNA-Interferenz. Die Verfügbarkeit von Aminosäuren und Mikronährstoffen kann die Methylierung und Histon-Modifizierung verändern [32, 33].
Die DNA-Methylierung erfolgt in Säugetieren immer am Cytosin von CpG-Dinukleotid-Motiven (Basenfolge Cytosin und Guanin). Über die Methylierung bestimmter DNA-Abschnitte wird die Expression von Genen ausgeschaltet. Dieser Prozess ist wichtig für die genomische Prägung („genomic imprinting“) und für Inaktivierung des X-Chromosoms in weiblichen Säugetieren. Methylgruppen können direkt aus der Nahrung aufgenommen werden oder werden aus Vorstufen wie Folsäure gebildet. Außerdem sind Zink und

Vitamin B-12 essentiell für den Methylierungsprozess. Ein Mangel dieser Moleküle führt zur Hypomethylierung und verändert das Genexpressionsmuster [32, 33].
Epigenetische Veränderungen geschehen lebenslang und können weitervererbt und durch Umweltfaktoren beeinflusst werden. Deshalb spielt die Epigenetik eine Rolle in der Entstehung humaner Krankheiten, die durch Umwelteinflüsse und dem Lebensstil bestimmt werden.

1.1.5. Die WOKW-Ratte als Modelltier für das Metabolische Syndrom

Die epigenetischen Einflüsse sowie die Umweltfaktoren erschweren die Identifizierung möglicher Kandidatengene für die Entstehung des MetS. Mit Modelltieren, die unter standardisierten Umweltbedingungen gehalten werden können, kann die Wechselwirkung zwischen den genetischen Faktoren und der Umwelt untersucht werden. Ratten sind als wichtige Modelltiere in der medizinischen und biologischen Forschung etabliert, um humane Krankheiten zu erforschen. Als ein weiterer Vorteil erweist sich die relativ kurze Generationszeit.

Die WOKW-Ratte ist eines dieser Modelltiere, da sie ein dem Menschen ähnliches Metabolisches Syndrom mit Obesitas, Dyslipidämie, Glukoseintoleranz, Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie entwickelt [34, 35, 36]. In einer altersabhängigen Studie mit WOKW und DA-Ratten bis zu einem Alter von 14 Wochen stellte sich heraus, dass WOKW-Ratten die einzelnen Facetten des MetS zwischen der 8. und 10. Lebenswoche manifestieren [35]. Eine daran anknüpfende Untersuchung mit WOKW- und DA-Ratten zeigte, dass WOKW-Ratten mit 5 Monaten zu Beginn der Untersuchungen einen signifikant höheren BMI, signifikant höhere Triglyceridwerte sowie eine leichte Glukoseintoleranz im Vergleich mit DA-Ratten haben. Auffallend hoch sind die Unterschiede in den Seruminsulin- und Serumleptinkonzentrationen. So ist die Leptinkonzentration mit 9,4 ng/ml in WOKW im Vergleich zu DA mit 4,2 ng/ml im Serum deutlich höher. Die Insulinkonzentration ist in 5 Monate alten WOKW-Ratten etwa doppelt so hoch als in DA-Ratten. Betrachtet man die Werte in einem Alter von 17 Monaten, dann ist unverkennbar, dass die Unterschiede zwischen WOKW und DA größer werden. In WOKW-Ratten steigen die Werte deutlich an. Außerdem entwickeln WOKW-Ratten am Ende des Untersuchungszeitraumes eine Hypertonie [37]. Diese Ergebnisse bestätigen, dass WOKW-Ratten ein komplettes MetS entwickeln, dessen Krankheitsbild sich mit zunehmendem Alter verschlechtert.

In Kreuzungsstudien mit kranken WOKW-Ratten und gesunden DA-Ratten konnten viele Quantitative Trait Loci für Facetten des Metabolischen Syndroms kartiert werden. QTLs sind bestimmte Chromosomenabschnitte, die für die Ausbildung eines bestimmten phänotypischen Merkmals verantwortlich sind. Sie werden durch statistische Analysen identifiziert und enthalten mehrere Gene [38].
Die Studien mit männlichen und weiblichen (WOKW x DA)F2-Nachkommen belegen, dass das MetS in der WOKW-Ratte, wie auch im Menschen, geschlechtsspezifisch determiniert ist. In (WOKW x DA)F2-Weibchen wurden QTLs für das Körpergewicht auf dem Chromosom 1, für Serum Triglyzeride auf den Chromosomen 7, 11 und 16, für Gesamtcholesterol auf den Chromosomen 3, 4 und 10, für Nüchternblutglukose auf dem Chromosom 4 und schließlich ein QTL für Serumleptin auf dem Chromosom 16 bestimmt. In männlichen F2-Hybriden wurden QTLs für das Körpergewicht und BMI auf dem Chromosomen 1 und 5 festgestellt. Außerdem konnten auf dem Chromosom 1 auch QTLs für den Adipositas Index und für Seruminsulin in F2-Männchen kartiert werden. Hinzu kommen QTLs für Serum Triglyzeride auf dem Chromosom 4, für HDL-Cholesterol auf den Chromosomen 5 und 17, für Gesamtcholesterol auf dem Chromosom 5, für Serum-leptin auf dem Chromosom 8, für Nüchternblutglukose auf dem Chromosom 17 und außerdem ein QTL für Glukosetoleranz auf Chromosom 3 [39, 40].

Die Polygenität des MetS in WOKW ist eine weitere Gemeinsamkeit mit der humanen Erkrankung und macht deutlich, dass die WOKW-Ratte ein hervorragend geeignetes Modelltier zur Erforschung des MetS ist. Denn im Vergleich zu WOKW, sind die einzelnen Facetten des MetS in der OLETF (Otsuka Long Evans Tokoshima Fatty)- und Obese Zucker-Ratte monogenetisch bedingt. Die OLETF-Ratte hat einen Defekt im Cholezystokinin-Rezeptor 1 und entwickelt als Folge erhöhter Nahrungsaufnahme eine Adipositas mit Hyperinsulinämie und Hyperglykämie. Außerdem bildet die OLETF-Ratte einen insulin-unabhängigen Diabetes mellitus (non-insulin dependent diabetes mellitus; NIDDM) aus, der sich allerdings mit fortschreitendem Lebensalter in einen insulinabhängigen Diabetes mellitus (insulin dependent diabetes mellitus; IDDM) wandelt [41]. Die Obese Zucker-Ratte ist adipös, hyperinsulinämisch und insulinresistent mit einer leichten Hypertonie. Diesen Störungen liegt eine Mutation im Leptinrezeptorgen zugrunde [42, 43].

Um die in vivo Relevanz dieser QTLs zu prüfen, wurden kongene DA.WOKW-Ratten generiert. Dadurch wurden chromosomale WOKW-Bereiche in den genetischen Hintergrund der DA-Ratte gebracht. Die generierten kongenen Linien wurden DA.3aW, DA.3bW, DA.5W, DA.10W und DA.16W genannt, wobei die Zahl das Chromosom beschreibt, auf dem ein Bereich mit WOKW ausgetauscht wurde. Diese kongenen Ratten unterscheiden sich demzufolge von DA nur in dem mit WOKW ausgetauschten homozygoten Chromosomenabschnitt auf dem spezifischen Chromosom. Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits publiziert [Anlage Baguhl et al.].

1.1.6. Kongene BB-Ratten als Modelle für das Metabolische Syndrom

Kongene BB.SHR-Ratten (*D4Got41-Tacr*; BB.4S) und BB.WOKW-Ratten (*D4Got41-Fabp1*; BB.4W) entwickeln im Gegensatz zu der WOKW-Ratte ein unvollständiges MetS. BB.4S und BB.4W tragen den genetischen Hintergrund der BB/OK-Ratte und einen kongenen Bereich auf dem Chromosom 4, der in den beiden kongenen Linien nahezu identisch ist. Allerdings stammen die ausgetauschten chromosomalen Bereiche von verschiedenen Donorstämmen. In BB.4S wurde der chromosomale Bereich mit SHR ausgetauscht und BB.4W-Ratten tragen kongene WOKW-Allele [44].
Die beiden Kongenen zeichnen sich dadurch aus, dass sie signifikant schwerer sind sowie einen signifikant höheren AI und signifikant erhöhte TG- Werte im Vergleich zum Parentalstamm BB/OK besitzen. Außerdem haben BB.4S-Ratten signifikant höhere Cholesterolwerte als BB/OK-Ratten. Interessanterweise unterscheiden sich BB.4S und BB.4W phänotypisch hinsichtlich der Seruminsulin- und Serumleptinkonzentration. Während BB.4S-Ratten hyperleptinämisch sind, entwickeln BB.4W-Ratten eine Hyperinsulinämie [44]. In 32 Wochen alten Tieren ist die Serumleptinkonzentration in BB.4S mit 15,4 ng/ml doppelt so hoch wie in BB.4W und BB/OK, die eine Leptinkonzentration von 7,7 ng/ml im Serum aufweisen. BB.4W-Ratten besitzen eine deutlich höhere Insulinkonzentration als BB/OK und BB.4S, was einen möglichen Einfluss der WOKW-Allele auf diesen Faktor anzeigt [44].
Erwähnt werden muss, dass *Repin1* innerhalb des kongenen Abschnitts in BB.4W und BB.4S liegt. Dieses Gen könnte wie schon beschrieben (S. 10), die Entstehung einzelner Facetten des MetS beeinflussen.

1.2. Zielstellung

Die kongenen Linien DA.3aW, DA.3bW, DA.5W, DA.10W sowie DA.16W sollen sowohl genotypisch, um die WOKW-spezifischen Bereiche zu ermitteln, als auch phänotypisch charakterisiert werden. Die phänotypischen Merkmale geben Aufschluss, ob die kongenen Linien einzelne Facetten des MetS entwickeln und somit mögliche Modelle für die genetische Entschlüsselung der Krankheit darstellen. Darüber hinaus sollen potentielle Kandidatengene über Expressionsanalysen in verschiedenen Organen und durch anschließende Sequenzierung identifiziert werden. Dabei liegt der Fokus auf dem distalen Chromosom 3, da die kongenen DA.3aW-Ratten phänotypisch stark von DA abweichen.
Außerdem wird die Genexpression einiger Adipokine sowie weiterer mit dem MetS im Zusammenhang stehender Gene in allen kongenen Linien untersucht und mit DA verglichen.
Im Anschluss daran wird die Bedeutung von *Repin1* als mögliches Kandidatengen ebenfalls geprüft.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Rattenstämme

Parentalstämme

DA

WOKW

Kongene Linien

kongene Linie	Rezipienten-stamm	chromosomaler Donorstamm	kongener Bereich
DA.3aW	DA	WOKW	Chr. 3; *D3Mgh5-D3Rat1*
DA.3bW	DA	WOKW	Chr. 3; *D3Mit10- D3Rat189*
DA.5W	DA	WOKW	Chr. 5; *D5Mgh6-D5Mit5*
DA.10W	DA	WOKW	Chr. 10; *D10Mgh2-D10Rat4*
DA.16W	DA	WOKW	Chr. 16; *D16Rat88- D16Wox7*
BB.4S	BB/OK	SHR	Chr. 4; *D4Got41-Tacr1*
BB.4W	BB/OK	WOKW	Chr. 4; *D4Got41-Fabp1*

Alle Ratten wurden in der Abteilung für Versuchstierkunde (Institut für Pathophysiologie, Medizinische Fakultät, Greifswald, D) gezüchtet und gehalten. Die Ratten wurden in Gruppen von jeweils drei Tieren unter strengen hygienischen Bedingungen in Macrolon-Käfigen (Größe 3, Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) und mit einem 12-h Tag- und Nachtzyklus (5 Uhr/ 17 Uhr) gehalten. Sie kamen ungehindert an Futter (ssniff, Soest) und angesäuertes Tränkwasser.

2.1.2. Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien sowie molekularbiologischen Kits wurden von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad (München, D), Roche (Mannheim, D), Roth (Karlsruhe, D), Invitrogen (Karlsruhe, D), Qiagen (Hilden, D), Serva (Heidelberg, D), Applied Biosystems (Foster City, USA), Analytik Jena (Jena, D), Linco Research (St. Charles, USA), Mercodia AB (Uppsala, Schweden), GE Healthcare (München, D) und Abbott (Wiesbaden, D).
Die Herstellung von Lösungen erfolgte mit deionisiertem Wasser der Firma DeltaSelect (Pfullingen, D). Außerdem wurde RNase freies Wasser (Eppendorf, Hamburg, D) für molekularbiologische Methoden sowie einfach gereinigtes HPLC-Wasser (Mallinckrodt Baker, AA Deventer, Niederlande) für die Sequenzierung verwendet. Allgemein gebräuchliche molekularbiologische Lösungen wurden nach Sambrook et al. hergestellt [45].
Die eingesetzten Enzymen und ihre Puffer wurden bei den Firmen Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, D), Applied Biosystems (Foster City, USA) und Promega (Mannheim, D) gekauft.

2.1.3. Oligonukleotid-Sequenzen

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) synthetisiert. Die Primer-Sequenzen sind in 5' - 3' Richtung angegeben (R = reverse Primer; F = forward Primer).

2.1.3.1. Primer für die Kartierung

Abp	F	CGCTGGGAGGAAAGA GAG	R	AGGCTTGCACTCTGTGTTTG
Aep	F	TCGTATTCCTAAGTACTTGCTCTCT	R	ACTAGGTCTAGGGCCTTTAGTAGAT
Il4	F	ACACAATTTGTGTTGTTGAG	R	CCTGTAATCTTCATATCTGT
K1430	F	CAGGACCTCTGGAAGAGCAG	R	TCCCACATTCACATTGTGCT
K1431	F	TGTAGGCCGTTCATGTTCAA	R	AGAAGGTTGTTCTCCCTGCTC
K1471	F	TGGTGGTTTTTCACAGCAGA	R	GCTTCCTGGGCAAGAACTTT
K1472	F	ACTTTTTGAAGCTCTGTTTGCT	R	GCAAGCCTTAAGTAAGCAGCA
K1473	F	AACACCTGTCTAATGCTTGGAG	R	GGTTTGGAGAAGACACAATGC

K1474	F	CCGAATGCATGTCTCACTTG	R	GGATGAGGGGTTGTGGAAAG
K1485	F	CACTTGTTGATAAGAACTGATAGCTTG	R	ACTCAGCGCCCTTCAGTAGA

Alle weiteren Markersequenzen stammen aus der Sequence Tagged Sites (STSs) database von NCBI (National Center for Biotechnology Information, UniSTS; www.ncbi.nlm.nih.gov/unists). Alle verwendeten Marker und ihre Position auf den Chromosomen sind in der Tab. 2 bzw. Tab. 3 dargestellt (S. 30, 31).

2.1.3.2. Primer für die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Acox1	F	GCCGTCGAGAAATTGAGAAC	R	GCACTCTTCTTAACAGCCACCT
Acss2	F	TTCTGGTGCACAGCAGACAT	R	GGATCCCCTCAAACAAAACA
Adipoq	F	TCCCTCCACCCAAGGAAACT	R	GGCCCGGTATCCCATTG
Cip98	F	CAGGGTCGAAGCACATCC	R	TCCACTCTGCAGGAGGTGTAG
Cygb	F	ATGGAGGATCCGTTGGAGAT	R	GTCTGGGTCATGCAGGTTCT
Dlgap4	F	TGTCAAACGTGGTTCATGGT	R	TTTGGACTTCAGCAGGCTCT
Edn3	F	GAACAGACTGTGCCCTATGGA	R	TCTGTGGAGAAGACTGGGAAC
Exoc7	F	CGCTGTCCTTTATTCGAGACA	R	TTCTCCAGCTTCATGAGTCG
Fasn	F	GGACATGGTCACAGACGATGAC	R	GGAGGCGTCGAACTTGGA
Foxa2	F	AACAAGATGCTGACGCTGGAG	R	AATGACGGATGGAGTTCTGC
Galr2	F	GCTCTGCAAGGCTGTTCATT	R	GTAGCGGATGGCCAGATACC
Glut4	F	CATTCTCGGACGGTTCCTCAT	R	CCAAGGCACCCCGAAGAT
H3f3b	F	GGTGAAGAAACCTCATCGCTAC	R	CACCAACCTCTGGAAGGGTA
Hnf4a	F	GAAGGTGCCAACCCTCAACTC	R	AGCTTGAGGCTCCGTAGTGT
Itgb4	F	GTAGTGCTGAGTGCCGGTCT	R	AGGCACAGCTCTTGTCCACT
Lpl	F	ATCCAGCTGGGCCTAACTTT	R	GACCCCCTGGTAAATGTGTG
Nkx2-2	F	AGCCTCATCCGTCTCACG	R	GCGTCACCTCCATACCTTTC
Ntsr1	F	TTTAGAGCACAGCACGTTCAA	R	CACAAAGGCAATGACCACAG
Oprl1	F	CTTTCCCTCCAAAACCACTG	R	AGGCCACAAAGCTTTCTCCT
Pck1	F	TCGAAGGCATCATTTTTGGT	R	CTCATGGCAGCTCCATACAAA

Pla2g4b	F	TTCATTGGGCCAGAGAACAT	R	CCAAGGAGATGTGGGAAATC
Plcg1	F	AGTTGCAGGACTGGGTGAAA	R	AAGGCGATCTTCTTCCTCCT
Pltp	F	ACTCCAGACCCACTGCTGTT	R	GCCCACAATTCGAGACACTT
Pofut1	F	AGCCTACCATCGGGTTTATCA	R	TGCCACCTCAAAGCAGTATG
Pparg	F	GCTGGCCTCCCTGATGAATA	R	GCTTCCGCAGGCTTTTGA
Pref1	F	GACGGGAAATTCTGCGAAATAG	R	GGAGCATTCGTACTGGCCTTT
Repin1	F	ATCTGGGCTCTGTTTAGGAATGG	R	CCTGACTAGCTCAAACCCAGATC
Retn	F	CCTGAGGACGGTTGATTGAGA	R	TCCTCTGCAGGGCATGGT
Rims4	F	AGCTGGAGGTGGACATCATC	R	CCATTTTCCAGCAGATAGGC
Slc32a1	F	TGGTCATCGCCTACTGTCTCT	R	ATGATGCCGATGGAGATAGG
Snta1	F	CAACCTATCCGTGCACATTG	R	CTGAAGTTTCTCAAAGGGCTGT
Tnfa	F	GACAAGGCTGCCCCGACTA	R	AAGGGCTCTTGATGGCAGAGA
Unc13d	F	TTCAATCCCACCACTTCTCC	R	AGGCCTCCTTCACATGGTT

2.1.3.3. Primer für die Sequenzierung

Cip98	F1 tgtcggtgagctcgtcct	R1 caacttcttggagcccttga
	F2 gtgggcatctacgtgtctct	R2 atccacttggtctggtccac
	F3 gctttctcagcatcctgcat	R3 caggtctatgagccacagca
	F4 tacagtgacaccggctcatc	R4 cacctccaccaggacaaagt
	F5 ggttaaccagcaccccatc	R5 tccttaccccgaagtgtctg
Cygb	F1 gacacacacacacacacacaca	R1 cggtcacatggctgtagatg
	F2 tgcatgacccagacaaggta	R2 aagggttcccctctgctaaa
Pck1	F1 ccttccctctgggaacacac	R1 cacatagggcgagtctgtca
	F2 cccaagagcagagagacacc	R2 gggttgatggcccttaagtt
	F3 atacggtgggaactcactgc	R3 catggcagctcctacaaaca
	F4 cccaggagtcaccatcactt	R4 ttgtcgatctcctccacctc
	F5 aaggaagacgccctgaactt	R5 gcaacaaagcaacacgactc

Pofut1	F1 gccggttacctgctctactg	R1 catccttcaacatggcacag
	F2 agcgcctcctacaaagaaca	R2 ccatgccaaagaaggatgac
Snta1	F1 ggacttcgaggcgaagatg	R1 gaagaaggctgacgctgaag
	F2 gaagcagtacaggccctcaa	R2 tctgcatcatagggcactga
	F3 agtgccctatgatgcagagc	R3 tctcttcgaaaggcactggt

2.1.4. Antikörper

Der β Aktin Antikörper (Mouse monoclonal; ab8226) wurde bei der Firma Biozol (Eching, D) bestellt. Der Dlk1 Antikörper (Rabbit polyclonal; ab21682) stammt von Abcam (Cambridge, UK). Der Repin1 Antikörper (Mouse monoclonal) war nicht kommerziell erhältlich und wurde von der Abteilung für Versuchstierkunde (Institut für Pathophysiologie, Medizinische Fakultät, Greifswald, D) in Auftrag gegeben und von der Firma Unicus (Karlsburg, D) hergestellt.
Die 2. Antikörper (anti-mouse IgG bzw. anti-rabbit IgG) waren als fertige Lösung im Kit (Western Breeze® Chromogenic Kit - Anti-Mouse bzw. Anti-Rabbit, Invitrogen, Karlsruhe, D) enthalten und mit der alkalischen Phosphatase konjugiert.

2.1.5. Größenstandards

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten im Agarose-Gel erfolgte mit dem Molecular Weight Marker XIV (100-1000 bp) von Roche (Mannheim, D).
Das Molekulargewicht der Proteine wurde mit dem Precision Plus Protein™ Standard All Blue der Firma Bio-Rad (München, D) bestimmt.

2.1.6. Bioinformatik-Software und Datenbanken

Primer-Sequenzen wurden mit Hilfe der Gendatenbank von NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) erstellt.
Die Expressionsergebnisse der qRT-PCR wurden mit der ABI PRISM 7000 SDS Software v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgewertet. Die Analyse der

Sequenzierungsdaten erfolgte mit dem GeneScan Analysis Programm (SeqEd v1.0, ABI PRISM) von Applied Biosystems. Sequenzalignements wurden mit dem im Internet zur Verfügung gestellten Basic Local Alignment Search Tool (Blast) von NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) durchgeführt. Des Weiteren wurden DNA-Sequenzen mit den Tools von ExPASy (www.expasy.ch/tools/; Expert Protein Analysis System) in die AS-Sequenzen umgeschrieben werden. Anschließend wurden die AS-Sequenzen ebenfalls mit Tools von Expasy verglichen.
Die Quantifizierung detektierter Proteine auf Western Blot Membranen geschah mit der Gelscan Standard Software v5.02 (Gel Scan 5™) der Firma BioSciTec (Frankfurt a.M., D). Die Daten wurden mit der GraphPad Prism Software (La Jolla, USA) grafisch dargestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Generierung kongener DA.WOKW-Ratten

Die kongenen DA.WOKW-Ratten wurden wie schon in der Anlage Baguhl et al. beschrieben generiert.

2.2.2. Phänotypische Charakterisierung kongener DA.WOKW- sowie DA- und WOKW-Ratten

Jeweils 12 Männchen und 12 Weibchen der kongenen Linien DA.3aW, DA.3bW, DA.5W, DA.10W und DA.16W sowie ihre Parentalstämme DA und WOKW wurden longitudinal charakterisiert. Dafür wurden Körpermasse, sowie die Serumlipid-, Leptin- und Insulinwerte über einen Zeitraum von 10 bis 30 Wochen gemessen. Die Ratten wurden nach 30 Wochen durch Inhalation von Isoflurane (Abbott, Wiesbaden, D) getötet, das linke und rechte inguinale Fettpad wurde entfernt, um den Adipositas Index (AI) zu errechnen (g Fettpads / Körpergewicht x 100). Zur Bestimmung der Serumlipidwerte sowie Seruminsulin- und Serumleptinkonzentration wurde den Tieren über den Augenplexus Blut abgenommen und sofort bei 13000 U/Min zentrifugiert.
Die Serumlipide wurden mittels Lipidelektrophorese durch das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (Medizinische Fakultät, Greifswald) bestimmt. Die Leptinwerte wurden mit einem Radio-Immunassay (RIA) Kit nach Angaben des Herstellers gemessen (Rat Leptin RIA Kit, Linco Research, St. Charles, USA). Die

Insulinwerte wurden mit einem ELISA (Rat Insulin ELISA, Mercodia, Schweden) laut Protokoll der Firma bestimmt.

2.2.3. Genotypisierung kongener DA.WOKW-Ratten

Die kongenen Ratten wurden mit Markern kartiert, die spezifisch für das jeweilige kongene Chromosom und außerdem polymorph zwischen DA und WOKW waren. Die Primer-Sequenzen wurden aus der Genbank ausgesucht und die PCR-Reaktion wurde wie schon beschrieben durchgeführt [46]. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem 3% Agarosegel analysiert. Die eingesetzte DNA wurde aus dem Blut mit dem innuPREP Blood DNA Midi Kit von Analytik Jena (Jena, D) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Die DNA-Proben wurden bei 4° C gelagert.

2.2.4. RNA-Analyse und cDNA-Synthese

Nach Tötung der Tiere wurden die Organe entnommen und anschließend in RNA-Later (Qiagen, Hilden, D) bei -20° C gelagert. Die Organproben wurden mit einem Sonopuls Ultraschall Homogenisator (Bandelin, Berlin, D) homogenisiert. Die Gesamt-RNA aus Leber, Niere und Hypothalamus wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, D) bzw. aus dem Fettgewebe mit dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, D) nach Anweisung des Herstellers isoliert. Anschließend wurde restliche DNA durch DNase-Behandlung (RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden, D) entfernt. Die RNA-Konzentration wurden spektrophotometrisch bestimmt und es wurden nur RNA-Proben mit einer OD_{260}/OD_{280}-Ratio > 1,6 für weitere Experimente verwendet.
1,5 µg gereinigte RNA der Gewebeproben wurden mit RNase-freien Wasser und 1 µl Random Primer auf ein Endvolumen von 13,5 µl ergänzt. Alle Proben wurden 5 Minuten bei einer Temperatur von 65° C denaturiert und danach schnell auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 6,5 µl des Reversen Transkriptionsmix dazugegeben. Der Reverse Transkriptionsmix enthielt:

- 4,0 µl M-MLV 5x Reaktionspuffer
- 0,5 µl (20 units) RNasin
- 1,0 µl 10 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 1,0 µl (250 units) M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase

Die Produkte für die Reverse Transkription wurden von Promega (Mannheim, Deutschland) hergestellt. Die cDNA-Synthese erfolgte 50 Min bei 42° C, gefolgt von einem Enzyminaktivierungsschritt bei 72° C für 10 Min. Alle in dieser Arbeit beschriebenen PCR-Reaktionen wurden im Thermocycler von Techne (Staffordshire, UK) durchgeführt.
Die cDNA wurde 1: 5 mit RNase freiem Wasser der Firma Eppendorf (Hamburg, D) verdünnt und bei -20° C gelagert.

2.2.5. Quantitative Real-Time-PCR

Die qRT-PCR wurde mit dem ABI PRISM® sequence detection system 7000 (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

- 12,5 µl SYBR-Green Master Mix (ABI)
- 0,4 – 2,0 µl Primer (50 ng/µl)
- 6,0 µl cDNA bzw. no template (NTC)
- RNase-freies Wasser wurde bis zu einem Endvolumen des Reaktionsansatzes von 25,0 µl zugegeben.

Die PCR-Reaktion wurde im Cycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 2 Min bei 50° C
- Denaturierung bei 95° C für 10 Min
- 45 Zyklen bei 95° C für 15 Sekunden
- 1 Min bei 60° C

Für jede Probe wurde der Versuch doppelt durchgeführt.
Das 18S rRNA-Gen der Ratte diente als endogenes Kontrollgen. Um die spezifische Amplifikation zu bezeugen, wurde die Schmelzkurve bei der Auswertung der Daten betrachtet. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Standardkurve. Für jede Probe wurde die Menge an Template und 18S rRNA aus der Kalibrierungskurve berechnet. Die Menge an Template wurde dann durch die Menge an 18S rRNA geteilt, um die relative Genexpression zu erhalten.

2.2.6. DNA-Sequenzierung

Die genomische DNA wurde aus der Leber mit einem Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim, D) isoliert. Um genetische Veränderungen festzustellen, wurden zuerst jeweils 2 männliche Tiere unterschiedlicher Stämme wie schon beschrieben nach dem ABI PRISM BigDye Terminators v3.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) Protokoll analysiert [47]. Wurden Sequenzunterschiede detektiert, dann erfolgte eine wiederholte Sequenzierung sowohl männlicher als auch weiblicher Tiere.

Die PCR-Reaktionen wurden folgendermaßen angesetzt:

- 5 µl Puffer
- 5 µl 1 mM dNTPs
- 5 µl Primer (50 ng/µl)
- 8 µl DNA (50 ng/µl)
- 4 µl Tag-Polymerase (1 U/µl)
- HPLC-Wasser wurde bis zu einem Endvolumen des Reaktionsansatzes von 50 µl dazugegeben.

Die PCR-Reaktion wurde im Cycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- initiales Denaturieren 1 Min bei 94°
- 35 Zyklen beginnend mit Denaturierung 30 Sek 94° C, gefolgt von Annaeling 1 Min 60° C und Elongation 45 Sek 72° C
- finale Elongation 30 Min bei 72° C und Reaktionsstopp bei 4° C

Das PCR-Produkt wurde anschließend über Filter mit einem Kit gereinigt (Illustra DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, München, D).

Die Sequenzierungs-PCR wurde mit dem ABI-BigDye Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) wie folgt angesetzt:

- 4 µl Premix
- 2 µl Puffer
- 0,5 µl DMSO
- 1-7 µl gereinigtes PCR-Produkt (25 ng/µl DNA)
- 1 µl Primer (Forward oder Reverse)
- HPLC-Wasser wurde bis zu einem Endvolumen von 20 µl hinzugegeben.

Die PCR-Reaktion wurde im Cycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 25 Zyklen 10 Sek bei 94° C und 4 Min bei 60° C
- Reaktionsstopp bei 4° C

Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI Prism 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

2.2.7. Isolierung von Proteinen aus Fettgewebe und Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Maximal 30 mg Gewebe wurden mit einem Skalpell zerkleinert und in 1 ml Cell Extraction Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, D) überführt. Der Puffer enthielt Protease Inhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim, D), um den enzymatischen Abbau der Proteine zu verhindern. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt und mit einem Sonopuls Ultraschall Homogenisator (Bandelin, Berlin, D) 10 Sek homogenisiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis das Gewebe eine homogene Lösung war. Nachdem die Proben 10 Min auf Eis inkubiert worden, wurden sie anschließend 10 Min bei 13000 U/Min und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20° C gelagert.
Die Gesamtproteinkonzentration wurde mit dem Quick Start™ Bradford Protein Assay von Bio-Rad (München, D) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

2.2.8. Trennung von Proteinen in der SDS-PAGE und Detektion mit Antikörpern

Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis) entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt.
Das 10 % Trenngel enthielt:

- 9,2 ml Wasser (DeltaSelect, Pfullingen, D)
- 6,8 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamidlösung (Roth, Karlsruhe, D)
- 2,5 ml 1,5 M Tris/HCL-Puffer (pH 8,8)
- 0,1 ml 10 % SDS-Lösung (Roth, Karlsruhe, D)

Vor dem Gießen des Trenngels wurden noch 200 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat)-Lösung und 10 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin) dazugegeben. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde ein 5 % Sammelgel gegossen. Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen:

- 5,7 ml Wasser (DeltaSelect, Pfullingen, D)
- 1,7 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamidlösung (Roth, Karlsruhe, D)
- 2,5 ml 0,5 M Tris/HCL-Puffer (pH 6,8)

- 0,1 ml 10 % SDS-Lösung (Roth, Karlsruhe, D)

Zu der Sammelgellösung wurden 50 µl 10 % APS und 10 µl TEMED addiert. Die polymerisierten Gele wurden mit der Trennkammer in den Puffertank gesetzt, die mit 1 x Laufpuffer (Roth, Karlsruhe, D) gefüllt wurde. Die Proteinmenge (10µg/ml Gesamtkonzentration), die im Gel getrennt werden sollte, wurde mit 1/3 des Volumens mit Probenpuffer (Rothi Load 1, Roth, Karlsruhe, D) versetzt und 15 Min im Wasserbad bei 65° C bzw. 5 Min 95° C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Sammelgels aufgetragen und bei 90 V bis zum Trenngel gesammelt. Die Trennung der Proben erfolgte bei 150 V.

Anschließend wurden die Proteine bei 20 V in einer Zeit von 30 Min auf eine PVDF-Membran geblottet. Die für den Transfer verwendeten Materialien wurden von Roth (Karlsruhe, D) hergestellt. Die Transfereinheit wurde nach Anweisung des Herstellers aufgebaut (Roth, Karlsruhe, D). Der Semi Dry Blot erfolgte mit einem Semi Dry Blotter von Invitrogen (Karlsruhe, D) und wurde nach Protokoll von Roth (Karlsruhe, D) durchgeführt.

Nach dem Transfer wurden die Proteine mit dem Western Breeze® Chromogenic Kit von Invitrogen (Karlsruhe, D) nach Angaben des Herstellers mit Antikörpern detektiert. Als Standard galt β Aktin. Der β Aktin Antikörper wurde 1: 10000 (1 µl pro 10 ml Lösung) verdünnt. Für die Detektion von Repin1 wurde der Repin1 Antikörper 1: 1000 (10 µl pro 10 ml Lösung) verdünnt. Der Dlk1 Antikörper wurde ebenfalls 1: 1000 (10 µl pro 10 ml Lösung) verdünnt. Da der 2. Antikörper mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, konnten die gebundenen Antikörper durch Zugabe von 5 ml BCIP/NBT-Lösung, die ebenfalls im Kit enthalten war, innerhalb von 1-60 Min nachgwiesen werden.

2.2.9. Statistischen Datenanalyse

Die Daten wurden mit dem statistischen Programm von Social Science (SPSS, Chicago, USA) ermittelt. Statistische Differenzen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Anova (one-way analysis of variance) und Bonferroni`s multiple comparison test errechnet. Die Daten sind, wenn nicht anders beschrieben, als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Genotypisierung der Chromosomen 3, 5, 10 und 16 der kongenen DA.WOKW-Ratten

Die Ergebnisse der Genotypisierung sind bereits publiziert (Anlage, Baguhl et al. 2009), so dass hier nur kurz auf die Ergebnisse der Genotypisierung eingegangen wird.

Um die kongenen Chromosomenabschnitte einzugrenzen, wurde das Chromosom 3 von DA.3aW und DA.3bW, das Chromosom 5 von DA.5W, das Chromosom 10 von DA.10W und das Chromosom 16 von DA.16W mit Markern, die polymorph zwischen DA und WOKW sind, kartiert. Die kongenen Linien enthalten in den spezifischen ausgetauschten Chromosomenregionen homozygote WOKW-Allele, während der genetische Hintergrund homozygot für DA ist.

In der Abb. 2 ist erkennbar, dass einige der mit (WOKW x DA)F2-Nachkommen identifizierte QTLs in den WOKW-spezifischen Bereichen der kongenen Linien liegen.

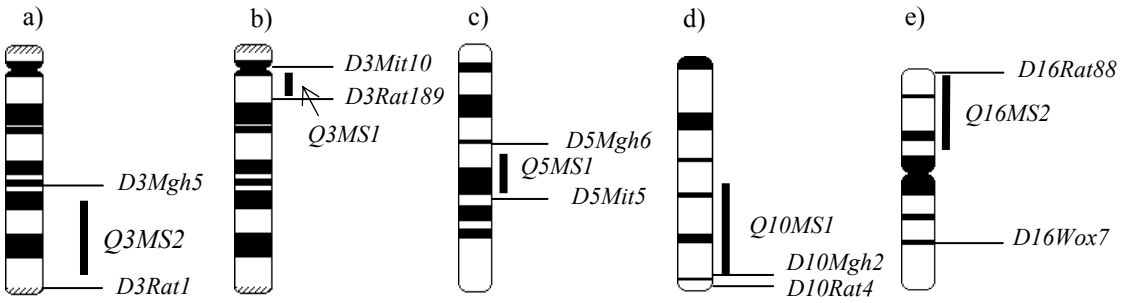

Abb. 2 Genotypische Merkmale der kongenen Chromosomen 3, 5, 10 und 16

Die Marker definieren WOKW-spezifische Regionen auf den Chromosomen 3 in DA.3aW (a) und DA.3bW (b), auf dem Chromosom 5 in DA.5W (c), auf dem Chromosom 10 in DA.10W (d) und auf dem Chromosom 16 in DA.16W. Die schwarzen Balken kennzeichnen QTLs die in (WOKW x DA)F2-Ratten durch Klöting et al. identifiziert wurden [39, 40].

Alle für die Feinkartierung der Chromosomen verwendeten Marker und ihre Positionen auf den spezifischen Chromosomen sind in der Tab. 2 und Tab. 3 dargestellt (S. 30, 31).

Der mit WOKW ausgetauschte Bereich auf dem Chromosom 3 wird in den DA.3aW-Ratten durch *D3Mgh5* und *D3Rat1* begrenzt und hat eine Größe von ca.73 Mb (Abb. 2). In diesem Bereich liegt auch ein für männliche Ratten spezifischer QTL für Glukosetoleranz (*Q3MS2*), der in (WOKW x DA)F2-Ratten durch Kloeting et al. kartiert wurde [39, 40]. In

DA.3bW wurde ein proximaler DA-Bereich des Chromosoms 3 von *D3Rat58* bis *D3Rat189* mit einem WOKW-Bereich ersetzt, der eine Region von ca. 25 Mb einschließt (Abb. 2). In diesem Bereich liegt ein Cholesterol-QTL (*Q3MS1*) [39, 40].

DA.5W besitzt eine kongene Region, die von *D5Mgh6* und *D5Mit5* begrenzt wird und ein QTL für die Körpermasse und den BMI (*Q5MS1*) enthält, der spezifisch für männliche Ratten ist (Abb. 2) [39, 40].

In der Abb. 2 ist zu erkennen, dass der mit WOKW ausgetauschte chromosomale Bereich in DA.10W mit einer Größe von ca. 3 Mb relativ gering ist. Ein QTL für Cholesterol (*Q10MS1*) grenzt an diese Region [39, 40]. Der in DA.16W mit WOKW ausgetauschte Bereich liegt zwischen den Markern *D16Rat88* und *D16Mgh1* und enthält einen QTL für Leptin, der als *Q16MS2* bezeichnet wurde [39, 40].

Tab. 2 Kartierung der Chromosomen 3 und 5 in kongenen DA.3aW, DA.3bW bzw. DA.5W

Marker	Position [cM]	DA	DA.3aW	DA.3bW
D3Rat96	3,5	D	D	D
D3Mgh9	4,0	D	D	D
D3Rat58	10,0	D	D	W
D3Rat279	12,4	D	D	W
D3Mit10	13,1	D	D	W
D3Rat117	25,3	D	D	W
D3Mit9	26,6	D	D	W
D3Rat32	29,7	D	D	W
D3Rat89	32,1	D	D	W
D3Rat100	35,2	D	D	W
D3Rat189	35,8	D	D	W
D3Rat227	41,1	D	D	D
D3Rat130	44,6	D	D	D
D3Wox9		D	D	D
D3Rat75	51,2	D	D	D
D3Rat288	53,1	D	D	D
D3Rat206	66,6	D	D	D
D3Rat93	75,4	D	D	D
D3rat176	81,5	D	D	D
D3Rat29	82,3	D	D	D
D3Arb10		D	D	D
D3Rat104	90,3	D	D	D
D3Mgh5	97,5	D	W	D
D3Rat165	103,3	D	W	D
D3Mgh11	105,8	D	W	D
D3Rat21	110,2	D	W	D
D3Rat220	111,8	D	W	D
D3Rat101		D	W	D
D3Rat17	121,8	D	W	D
D3Rat167	123,9	D	W	D
D3Rat15	125,9	D	W	D
D3Mit4	131,2	D	W	D
D3Mit3	136,4	D	W	D
D3Rat148	141,3	D	W	D
D3Mit2	143,2	D	W	D
D3Mgh29	145,1	D	W	D
D3rat114	149,5	D	W	D
D3Mgh10	162,0	D	W	D
D3Rat3	162,8	D	W	D
D3Rat137	163,3	D	W	D
D3Rat2	164,7	D	W	D
D3Rat1	170,0	D	W	D

Marker	Position [cM]	DA	DA.5W
D5Rat116	12,2	D	D
D5Mgh17	13,9	D	D
D5Rat125	17,7	D	D
D5Rat123	18,9	D	D
D5Mgh5	45,4	D	D
D5Mgh6	71,9	D	W
D5Mit2	72,3	D	W
D5Rat80	85,2	D	W
D5Rat147	88,1	D	W
D5Mit4	94,5	D	W
D5Wox20	101,7	D	W
D5Rat22	102,0	D	W
D5Rat60	106,3	D	W
D5Rat152	107,6	D	W
D5Mit5	109,1	D	W
D5Rat71	115,4	D	D
D5Rat156	116,0	D	D
D5Mgh13		D	D
D5Mcw1	135,8	D	D
D5Rat120	141,4	D	D
D5Mgh14	142,0	D	D
D5Rat39	143,6	D	D
D5Rat38	145,1	D	D
D5Rat93	154,0	D	D
D5Mgh15	167,8	D	D

Dargestellt sind die Marker, die polymorph zwischen WOKW und DA sind sowie ihre Positionen auf den Chromosomen 3 und 5. Dabei entspricht D = DA und W = WOKW, woraus abzuleiten ist, dass der kongene WOKW-Bereich in DA.3aW durch die Marker *D3Mgh5* und *D3Rat1*, der kongene Bereich in DA.3bW durch die Marker *D3Rat58* und *D3Rat189* und der kongene Bereich in DA.5W durch die Marker *D5Mgh6* und *D5Mit5* begrenzt wird.

Tab. 3 Kartierung der Chromosomen 10 und 16 in kongenen DA.10W bzw. DA.16W

Marker	Position [Mb]	DA	DA.10W
D10M38	14,7	D	D
D10Wax27	17,5	D	D
D10M34	36,7	D	D
IL4	39,1	D	D
D10M23	41,3	D	D
D10Mgh8	53,8	D	D
D10Mgh7	53,9	D	D
D10Mgh7/Syt2	56,2	D	D
Abp	56,5	D	D
D10Mgh13	61,5	D	D
D10Rat151	76,4	D	D
D10M213	84,3	D	D
D10Rat144	86,3	D	D
D10rat207	89,9	D	D
D10Mgh4	91,1	D	D
Aep	91,4	D	D
D10Mgh12	93,1	D	D
D10Rat98	96,6	D	D
D10Mgh2	103,9	D	W
D10Rat49/Rat97	107,0	D	W

Marker	Position [Mb]	DA	DA.16W
D16Rat88	0,8	D	W
D16Rat87	3,5	D	W
D16Gal4	6,1	D	W
D16Gal95	9,1	D	W
D16Mgh3	9,9	D	W
K1430	10,02	D	W
K1431	10,04	D	W
D16Gal14	11,2	D	W
D16Gal10	13,2	D	W
D16Rat81	15,9	D	W
D16Wax9	17,6	D	W
D16Mgh4	18,2	D	W
D16Gal17	18,6	D	W
D16Rat77	22,3	D	W
D16Rat6	22,7	D	W
D16M14	26,7	D	W
D16Wax12	29,4	D	W
K1471	31,8	D	W
K1472	33,1	D	W
D16Rat19	35,3	D	W
D16Gal98	40,6	D	W
K1473	42,2	D	W
K1474	43,8	D	W
D16Mgh1	46,1	D	W
D16M13	47,4	D	D
D16Wax7	63,3	D	D
D3Mgh1	72,9	D	D
K1485	73,3	D	D
D16Gal75	75,0	D	D
D16Rat130	78,6	D	D
D16Rat15	80,0	D	D
D16Gal88	84,2	D	D
D16Rat90	85,7	D	D
D16Rat89	89,0	D	D

Dargestellt sind die Marker, die polymorph zwischen WOKW und DA sind sowie ihre Positionen auf den Chromosomen 10 und 16. Dabei entspricht D = DA und W = WOKW, woraus abzuleiten ist, dass der kongene WOKW-Bereich in DA.10W durch die Marker *D10Mgh2* und *D10Rat4* und der kongene Bereich in DA.16W durch die Marker *D16Rat88* und *D16Mgh1* begrenzt wird.

3.2. Charakterisierung des Phänotyps der kongenen DA.WOKW-Ratten

Um den Phänotyp zu bestimmen, wurden männliche und weibliche Ratten der Parentalstämme DA und WOKW, sowie der kongenen Linien DA.3aW, DA.3bW, DA.5W, DA.10W und DA.16W longitudinal über einen Zeitraum von 30 Wochen charakterisiert. Dazu wurde das Körpergewicht gemessen und die Serumlipid-, Seruminsulin- und Serumleptinkonzentrationen bestimmt. Zusätzlich wurde der AI berechnet. Da die kongenen Linien zu > 90 % genetisch identisch mit DA sind und sich nur durch den mit WOKW ausgetauschten Bereich unterscheiden, werden hier nur die kongenen Linien im Vergleich zu DA grafisch dargestellt. Phänotypische Abweichungen der Kongenen vom Parentalstamm DA müssen ihren genetischen Ursprung in den WOKW-spezifischen chromosomalen Bereichen haben. Die longitudinale Studie bestätigte die bereits in der Einleitung beschriebenen phänotypischen Differenzen zwischen DA und WOKW.

3.2.1. Bestimmung der Körpermasse

Wie in Abb. 3 dargestellt, sind die männlichen DA.3aW-Ratten mit einem Gewicht von 298 g nach 20 Wochen bzw. 333 g nach 30 Wochen signifikant schwerer als die männlichen DA-Ratten, die nach 20 Wochen 268 g und nach 30 Wochen 297 g wiegen. Auch die DA.3aW-Weibchen haben nach 10 Wochen mit 159 g, nach 20 Wochen mit 198 g und nach 30 Wochen mit 207 g ein signifikant schwereres Körpergewicht als DA-Weibchen, deren Gewicht nach 10 Wochen 145 g, nach 20 Wochen 179 g und nach 30 Wochen 189 g beträgt. Im Gegensatz dazu sind die DA.16W-Weibchen mit 132 g in einem Alter von 10 Wochen signifikant leichter als weibliche DA-Ratten. Die anderen kongenen Linien weisen keine signifikanten Unterschiede zum Parentalstamm hinsichtlich des Körpergewichts auf.

Allgemein lässt sich aus der Abb. 3 ableiten, dass die Ratten mit zunehmendem Alter an Gewicht gewinnen. Außerdem sind die Weibchen leichter als die männlichen Ratten.

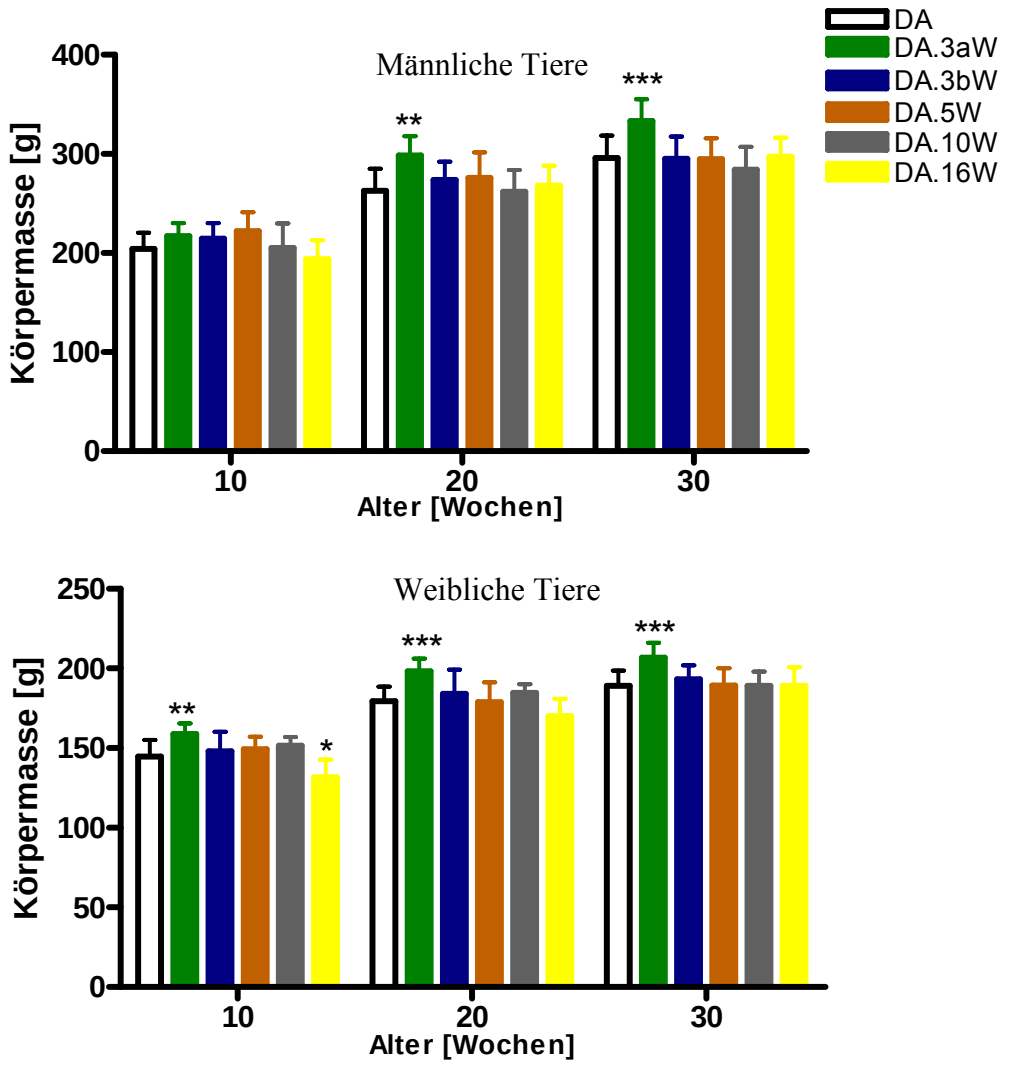

Abb. 3 Körpermasse der DA-Ratten sowie der kongenen Linien in Abhängigkeit vom Alter

Es ist die Körpermasse in Gramm im Alter von 10, 20 und 30 Wochen sowohl in männlichen als auch in weiblichen Tieren dargestellt.
* zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich mit DA an. * P< 0,05; ** P< 0,01; *** P< 0,001.

3.2.2. Adipositas Index, Serumleptin und Seruminsulin

Im Alter von 30 Wochen wurde der AI berechnet und die Leptin- sowie Insulinkonzentrationen im Serum der Tiere gemessen. Die Ergebnisse sind in der Abb. 4 grafisch dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, gibt es signifikante Differenzen

zwischen dem Parentalstamm DA und den kongenen Linien hinsichtlich der untersuchten phänotypischen Merkmale.

Der AI, ein Indikator für Adipositas, ist signifikant erhöht in männlichen und weiblichen DA.3aW-Ratten sowie in DA.16W-Weibchen im Vergleich zu DA. Für DA.3aW wurde ein AI von 1,6 in männlichen bzw. 1,0 in weiblichen Ratten berechnet. DA.16W-Weibchen haben einen AI von 1,1 während DA-Ratten einen AI von 1,2 (Männchen) und 0,8 (Weibchen) besitzen.

DA.16W-Weibchen haben außerdem erhöhte Seruminsulin- und Serumleptin-konzentrationen. Für diese Tiere wurden ein Leptinwert von 3,0 ng/ml und ein Insulinwert von 1,0 ng/ml gemessen. Im Unterschied dazu unterscheiden sich DA.16W-Männchen nur durch eine signifikant erhöhte Leptinkonzentration von 8,7 ng/ml im Serum von DA-Ratten. Die Serumleptinkonzentration ist außerdem signifikant höher in DA.3aW- und DA.10W-Ratten beider Geschlechter im Vergleich mit DA. DA.3aW-Männchen haben eine Leptinkonzentration von 7,7 ng/ml und in männliche DA.10W-Ratten wurde eine Leptinkonzentration von 5,6 ng/ml gemessen. In DA.3aW-Weibchen wurde ein Leptinwert von 2,9 ng/ml ermittelt und in DA.10W-Ratten des gleichen Geschlechts konnte ein Wert von 2,6 ng/ml festgestellt werden. Ferner haben sowohl DA.10W-Männchen als auch DA.10W-Weibchen höhere Seruminsulinkonzentrationen als DA-Ratten. Hierfür betragen die ermittelten Werte 1,6 ng/ml in Männchen bzw. 0,8 ng/ml in Weibchen. Im Vergleich dazu sind die Insulinwerte in DA-Ratten mit 0,7 ng/ml in Männchen bzw. 0,4 ng/ml in Weibchen deutlich geringer. Die festgestellten Leptinkonzentrationen in DA von 4,2 ng/ml in männlichen Tieren und 1,8 ng/ml in Weibchen sind auch eindeutig niedriger als die beschriebenen Werte der kongenen Linien (Abb. 4).

Die beiden Kongenen DA.3bW und DA.5W unterscheiden sich in keinem der hier beschriebenen Parameter von DA.

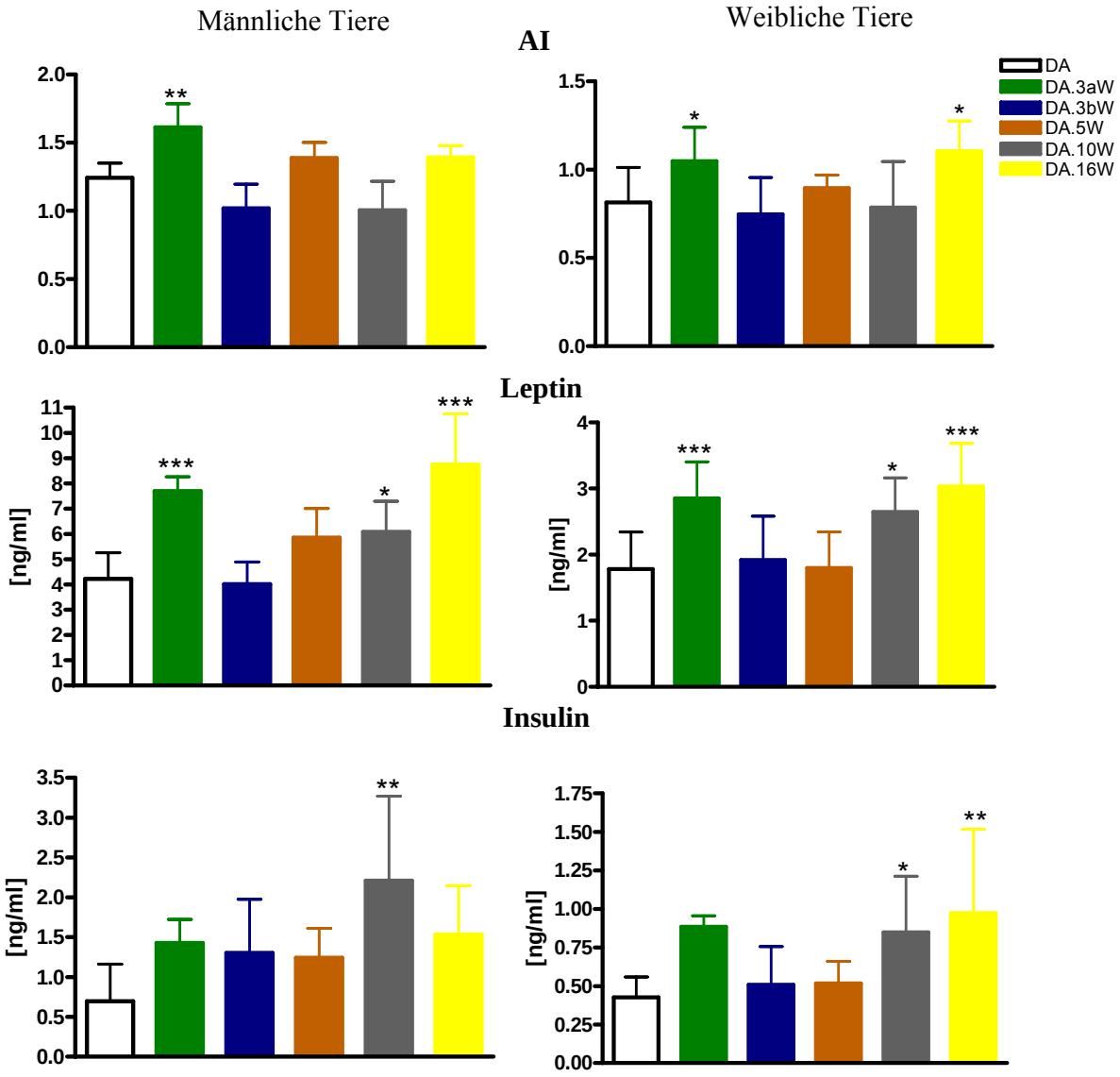

Abb. 4 AI, Leptin- und Insulinwerte

Der AI wurde nach Tötung der Tiere berechnet. Die Leptin- und Insulinkonzentrationen wurden im Serum 30 Wochen alter Tiere bestimmt.
* zeigt signifikante Unterschiede zu DA; * P< 0,05; ** P< 0,01; *** P< 0,001.

3.2.3. Bestimmung der Serumlipidwerte

Da eine Dyslipidämie ein Kennzeichen des MetS ist, wurden die Lipidkonzentrationen über einen Zeitraum von 10 bis 30 Wochen im Serum bestimmt.

Die TG-Werte sind in DA.16W-Männchen im Alter von 10 und 20 Wochen signifikant erhöht im Vergleich mit DA. Außerdem wurden signifikant niedrigere TG-Konzentrationen in DA.3aW- und DA.5W-Weibchen nach 10 Wochen sowie in DA.3bW-Weibchen nach 20 Wochen gemessen (Abb. 5)

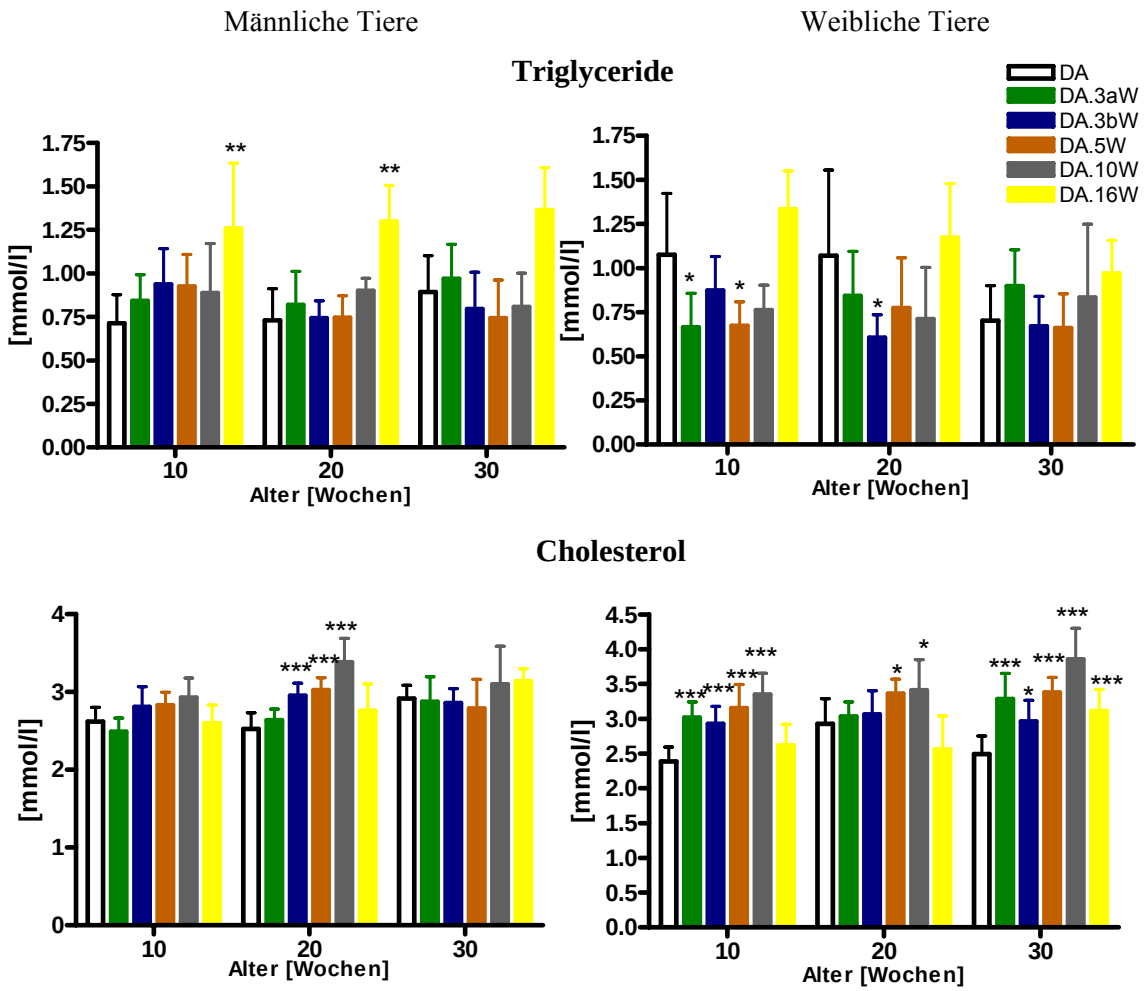

Abb. 5 Triglycerid- und Cholesterolwerte in Abhängigkeit vom Alter

Es sind die Triglycerid- sowie Cholesterolwerte im Alter von 10, 20 und 30 Wochen dargestellt.
* zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zu DA an. *P< 0,05; ** P< 0,01; *** P< 0,001.

Bezüglich der Cholesterolwerte fällt auf, dass die Weibchen aller kongenen Linien im Alter von 30 Wochen signifikant erhöhte Konzentrationen im Vergleich mit DA aufweisen. Nach 10 Wochen haben im Gegensatz zu den anderen kongenen Linien die DA.16W-Weibchen keine signifikant erhöhte Cholesterolkonzentration. Dazu kommen signifikant höhere Cholesterolkonzentrationen in DA.5W- und DA.10W-Weibchen nach 20 Wochen. Bei den männlichen Tieren sind lediglich nach 20 Wochen in DA.3bW, DA.5W und DA.10W signifikant erhöhte Cholesterolwerte nachweisbar (Abb. 5).

Außerdem wurde auch die Konzentration von Lipoproteinen im Serum bestimmt (Abb. 6). Die VLDL (very low density lipoprotein) -Werte sind in DA.3aW- und in DA.10W-Weibchen in einem Alter von 10 Wochen signifikant geringer als in DA-Ratten. Bei den männlichen Tieren wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der VLDL-Konzentrationen gemessen (Abb. 6). Die LDL (low density lipoprotein)-Werte sind in DA.16W-Weibchen nach 10 und 20 Wochen signifikant niedriger als in DA. Außerdem wurden signifikant erhöhte LDL-Werte in DA.3aW-Weibchen in einem Alter von 30 Wochen gemessen. Bei den DA.3aW-Männchen ist interessant, dass die LDL-Konzentration nach 10 Wochen signifikant erhöht und nach 20 Wochen aber signifikant geringer ist im Vergleich zum Parentalstamm DA. Außerdem ist die LDL-Konzentration auch in DA.10W-Männchen nach 10 und 20 Wochen signifikant erniedrigt (Abb. 6).

Des Weiteren haben die Weibchen aller kongenen Linien in einem Alter von 30 Wochen signifikant erhöhte HDL-Werte, währenddessen sich die Männchen in diesem Alter nicht signifikant von DA unterscheiden. Außerdem ist die HDL-Konzentration sowohl in DA.5W- als auch in DA.10W-Ratten beider Geschlechter nach 10 und 20 Wochen signifikant erhöht. Auch weibliche DA.3aW- und DA.3bW-Ratten haben nach 10 Wochen sowie DA.3bW-Männchen nach 20 Wochen signifikant höhere HDL-Werte (Abb. 6).

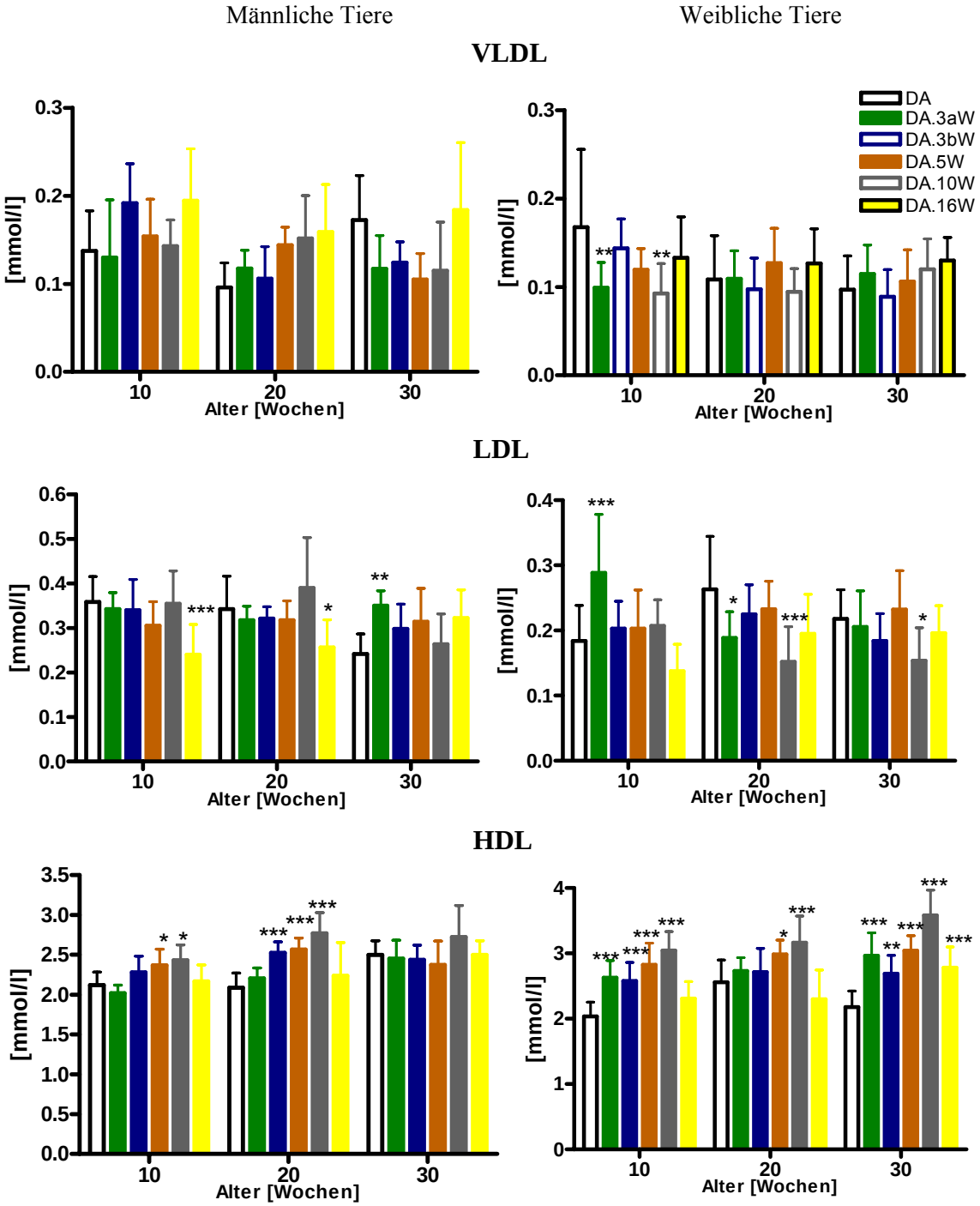

Abb. 6 Lipoproteinwerte in Abhängigkeit vom Alter

Es sind die VLDL-, LDL- und HDL-Werte in männlichen und weiblichen Ratten in einem Alter von 10, 20 und 30 Wochen dargestellt.
* zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich mit DA an. * P< 0,05; ** P< 0,01; *** P< 0,001.
VLDL, very low density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein.

3.3. Genexpression in DA, WOKW und den kongenen Linien im Fettgewebe

Nach der phänotypischen Charakterisierung wurde die mRNA-Expression ausgewählter Gene, die innerhalb der kongenen Chromosomenabschnitte liegen sowie die Expression von Adipokinen untersucht. An Hand der Genexpressionsanalysen sollen Unterschiede der mRNA-Expression zwischen den kongenen Linien und dem Parentalstamm DA sowie dem Donorstamm WOKW aufgedeckt werden.
Die Genexpression wurde ausschließlich in männlichen Tieren mit einem Alter von 30 Wochen untersucht.

3.3.1. Genexpression von Adipokinen

Da bekannt ist, dass eine veränderte Produktion und Sekretion der Adipokine die Entstehung des Metabolischen Syndroms begünstigen, wurde die Genexpression von einigen Adipokinen in den kongenen Linien und den Parentalstämmen untersucht. Dabei muss beachtet werden, dass DA als krankheitsresistent gilt und der chromosomale Donorstamm WOKW das Metabolische Syndrom entwickelt. Deshalb wurden nur die statistisch signifikanten Differenzen im Vergleich zu DA abgebildet.
In der Abb. 7 sind die Expressionsergebnisse von *Pparg*, *Adipoq* und *Retn* im subkutanen (sub) sowie im epididymalen (epi) Fettgewebe dargestellt.
Zunächst fällt auf, dass nur DA.5W- und WOKW-Ratten signifikante Differenzen hinsichtlich der mRNA-Expression einiger Adipokine im Vergleich mit DA haben. So ist die Expression von *Pparg* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe in DA.5W signifikant höher als in DA (Abb. 7).
Adipoq wird in WOKW-Ratten sowohl im subkutanen als auch im epididymalen Fettgewebe nur sehr gering expremiert, wobei die signifikanten Unterschiede zwischen DA und WOKW deutlich ausgeprägt sind. Die Expression von *Adipoq* im subkutanen Fettgewebe ist auch in DA.3aW etwas erniedrigt, aber nicht signifikant im Vergleich mit DA. Die *Adipoq*-Expression in den anderen drei kongenen Linien ist sogar höher als die Expression in DA, wobei die Unterschiede in DA.5W signifikant im Vergleich mit DA sind. Im epididymalen Fett sind die Differenzen der *Adipoq*-Expression zwischen DA und den kongenen Linien nicht signifikant verschieden (Abb. 7).
Des Weiteren wird *Retn* im subkutanen Fettgewebe von WOKW signifikant höher expremiert als in DA. Im epididymalen Fettgewebe ist die *Retn*-Expression in WOKW und

DA.3aW ebenfalls höher und in DA.5W sowie DA.10W niedriger als in DA. Diese Ergebnisse sind aber statistisch nicht signifikant (Abb. 7).

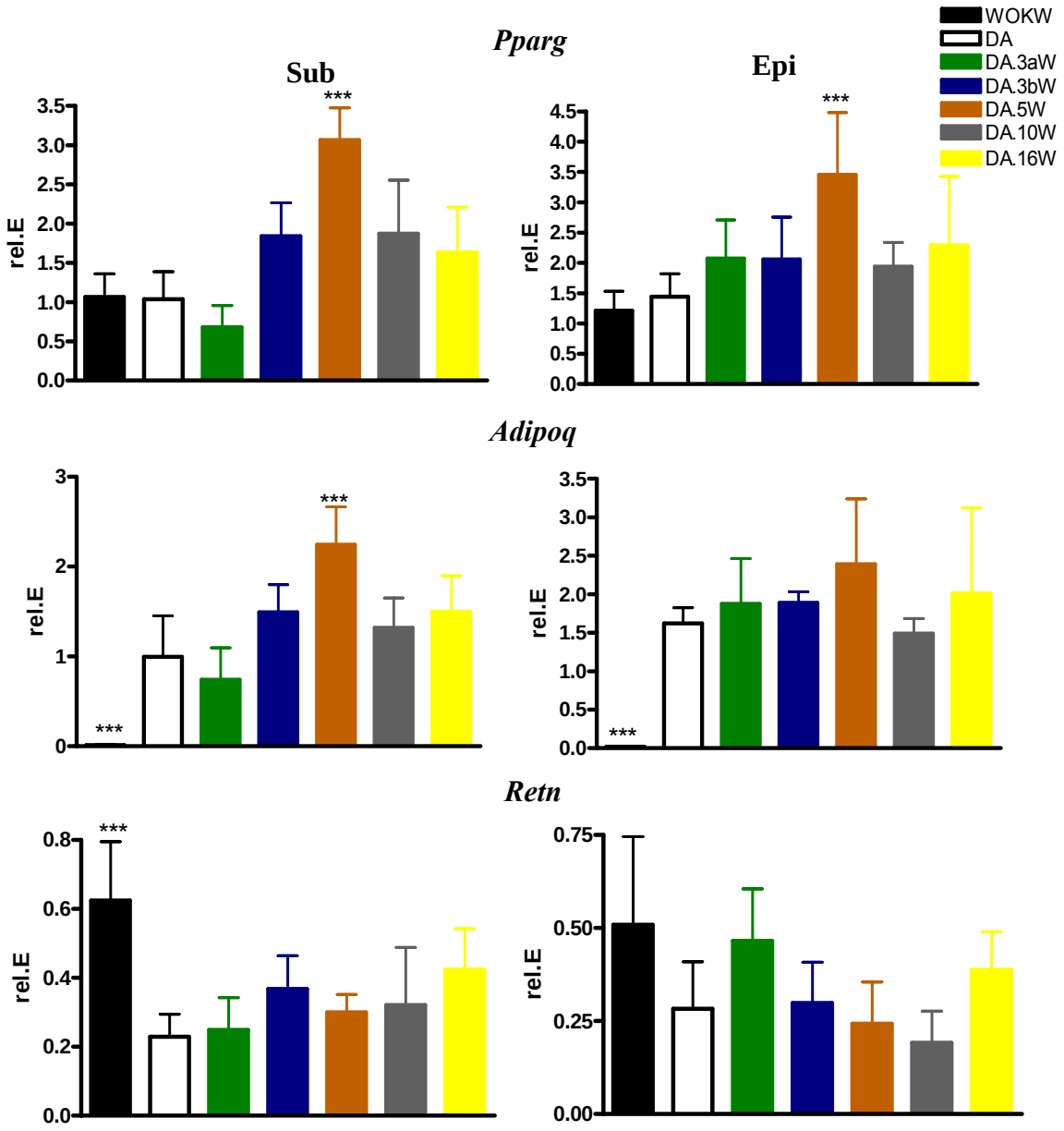

Abb. 7 Expression von Adipokinen im subkutanen und epididymalen Fettgewebe

Die Expression von *Pparg*, *Adipoq* und *Retn* wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen.
* zeigt signifikante Unterschiede zu DA; * P< 0,05; ** P< 0,01; *** P< 0,001.

In der Abb. 8 sind die Ergebnisse der *Tnfa*-Expression in DA.3aW, DA.5W und den Parentalstämmen dargestellt. WOKW, DA.3aW und DA.5W haben eine höhere *Tnfa*-Expression im epididymalen Fett als DA. Hierbei ist die Expressionshöhe zwischen WOKW und DA.5aW vergleichbar. Im subkutanen Fettgewebe wird *Tnfa* in DA und WOKW ungefähr gleich stark expremiert. Außerdem ist eine höhere *Tnfa*-Expression in DA.5W zu erkennen. In DA.3aW dagegen ist die Expression etwas niedriger als in DA. Die Expressionsunterschiede sind aber statistisch nicht signifikant.

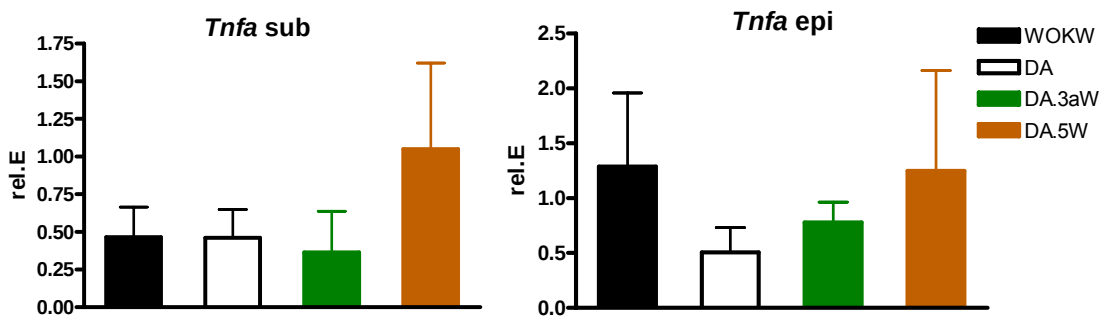

Abb. 8 Expression von *Tnfa* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe

Die Expression von *Tnfa* wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen. Die Expression ist in den kongenen Linien DA.3bW, DA.10W und DA.16W nicht auswertbar und kann deshalb nicht abgebildet werden.
Die Expressionsunterschiede sind statistisch nicht signifikant.

3.3.2. Expression von *Glut4*

Da WOKW-Ratten auch durch eine Hyperinsulinämie gekennzeichnet sind, wurde die Expression des insulinabhängigen Glukosetransporters Glut4 (Glucose transporter 4) im Fettgewebe untersucht.

In Abb. 9 kann man erkennen, dass die *Glut4*-Expression im subkutanen Fettgewebe in WOKW und DA.3aW geringer ist als in DA. Im Gegensatz dazu ist die Expression in DA.3bW, DA.5W, DA.10W und DA.16W erhöht, wobei die Expressions-Differenzen in DA.5W und DA.16W signifikant verschieden im Vergleich mit DA sind. Im epididymalen Fettgewebe ist die *Glut4*-Expression in WOKW und DA.10W tendenziell erniedrigt. Auffallend ist die hohe Expression im epididymalen Fett von DA.16W, die statistisch auch signifikant abweichend von DA ist (Abb. 9).

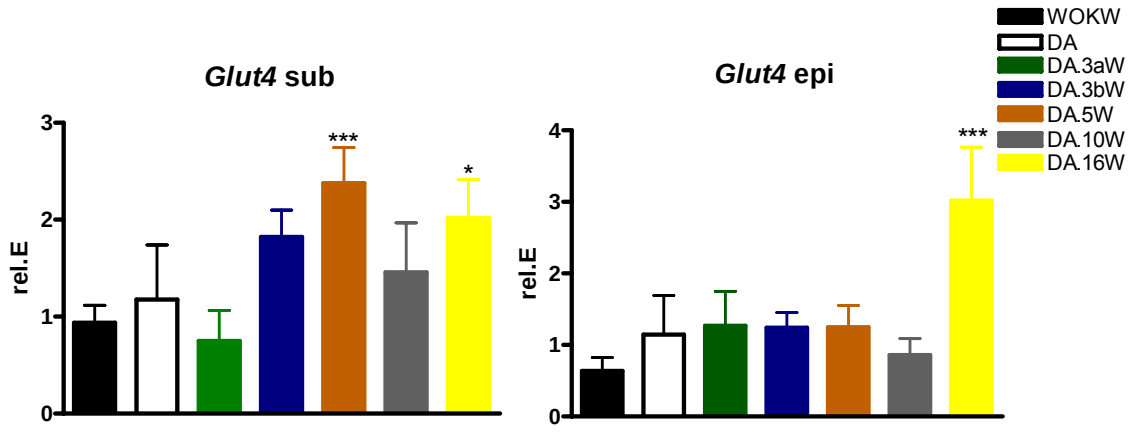

Abb. 9 Expression von *Glut4* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe

Die Expression von *Glut4* wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen.
* zeigt signifikante Unterschiede zu DA; * P<0,05; *** P< 0,001.

3.3.3. Expression von *Fasn*

Fasn (Fatty acid synthase), ein entscheidendes Enzym der Lipid-Biosynthese, ist auf dem Chromosom 10 der Ratte lokalisiert, allerdings außerhalb des kongenen Bereiches.

In der Abb. 10 ist zu erkennen, dass *Fasn* sowohl im subkutanen als auch im epididymalen Fettgewebe in DA.16W-Ratten signifikant höher expremiert wird als in DA. Im epididymalen Fett ist die *Fasn*-Expression in DA.16W sogar 6-mal so hoch wie in DA. Weiterhin ist eine erhöhte mRNA-Expression von *Fasn* in DA.3aW, DA.3bW und DA.5W im subkutanen Fettgewebe im Vergleich mit DA zu sehen, auch wenn diese Unterschiede nicht signifikant sind. Außerdem wird *Fasn* in diesen drei kongenen Linien stärker im subkutanen als im epididymalen Fettgewebe expremiert. Im epididymalen Fett ist die Expression in WOKW und DA.10W deutlich geringer als in DA.

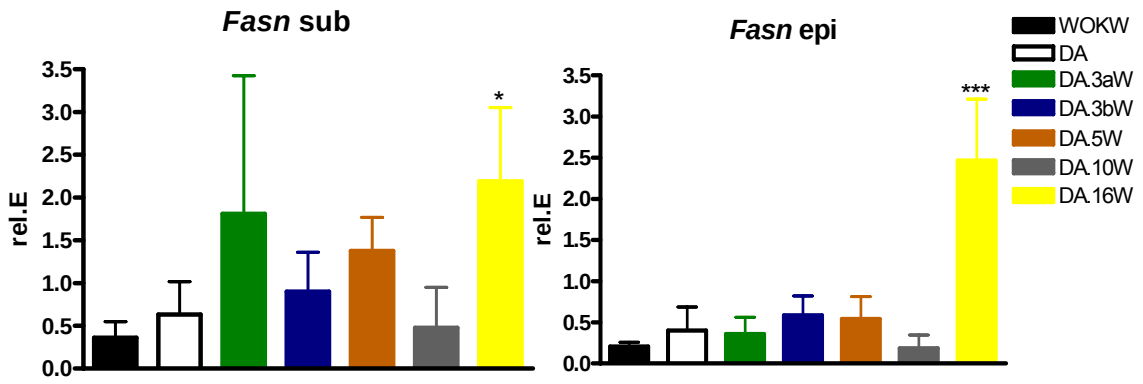

Abb. 10 Expression von *Fasn* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe

Die Expression von *Fasn* wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=4-6) mittels qRT-PCR gemessen. *Fasn* wird in DA.16W signifikant höher expremiert.
* zeigt signifikante Unterschiede zu DA; * P<0,05; *** P< 0,001.

3.3.4. Expression von *Lpl*

Das *Lpl*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 16 der Ratte und liegt in dem mit WOKW ausgetauschten Bereich in DA.16W.

Die Lipoprotein Lipase wird im subkutanen Fettgewebe sowohl in WOKW als auch in den kongenen Linien, in DA.10W nur geringfügig, stärker expremiert als in DA. Die höchste Expression ist in DA.5W zu erkennen, die fast doppelt so hoch ist wie in DA-Ratten. Die Expressionsunterschiede sind in DA.5W und DA.16W statistisch signifikant im Vergleich mit DA (Abb. 11).

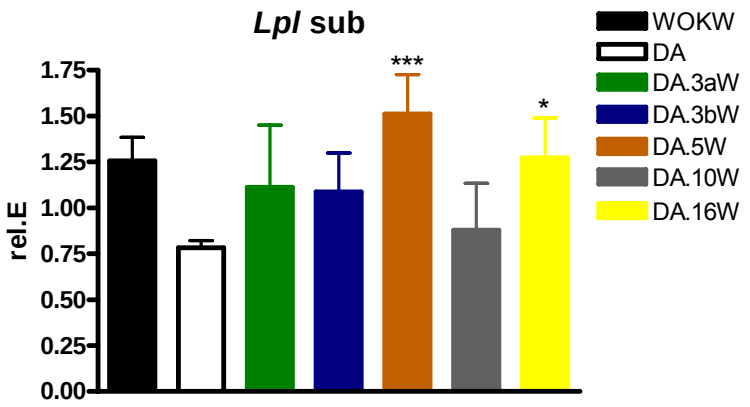

Abb. 11 Expression von *Lpl* im subkutanen Fettgewebe

Die Expression von *Lpl* wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen. *Lpl* wird in DA.5W und in DA.16W höher expremiert. Im epididymalen Fettgewebe ist die Expression nicht auswertbar und kann deshalb nicht abgebildet werden.
* zeigt signifikante Unterschiede zu DA; * P<0,05; *** P< 0,001.

3.3.5. Expression von Kandidatengenen des distalen Bereichs von Chromosom 3

Um mögliche Kandidatengene zu identifizieren, wurde die Expression ausgewählter Gene, die in dem kongenen Bereich kartieren, in DA.3aW sowie in den Parentalstämmen DA und WOKW untersucht. Zunächst wurde die Expression von Genen untersucht, die im Lipidmetabolismus involviert sind.

Wie man in der Abb. 12 erkennen kann, ist die Expression von *Pltp* (Phospholipid transfer protein) im subkutanen Fettgewebe in WOKW und DA höher als in DA.3aW. Außerdem ist die Expression in den Parentalstämmen WOKW und DA in etwa gleich. Im epididymalen Fettgewebe dagegen ist die Expression in DA niedriger als in DA.3aW und nahezu gleich in WOKW und DA.3aW.

Acss2 (Acyl-CoA Synthetase short chain family member 2) wird im subkutanen und epididymalen Fettgewebe in WOKW am geringsten expremiert. Die *Acss2*-Expression unterscheidet sich kaum zwischen DA und DA.3aW (Abb. 12).

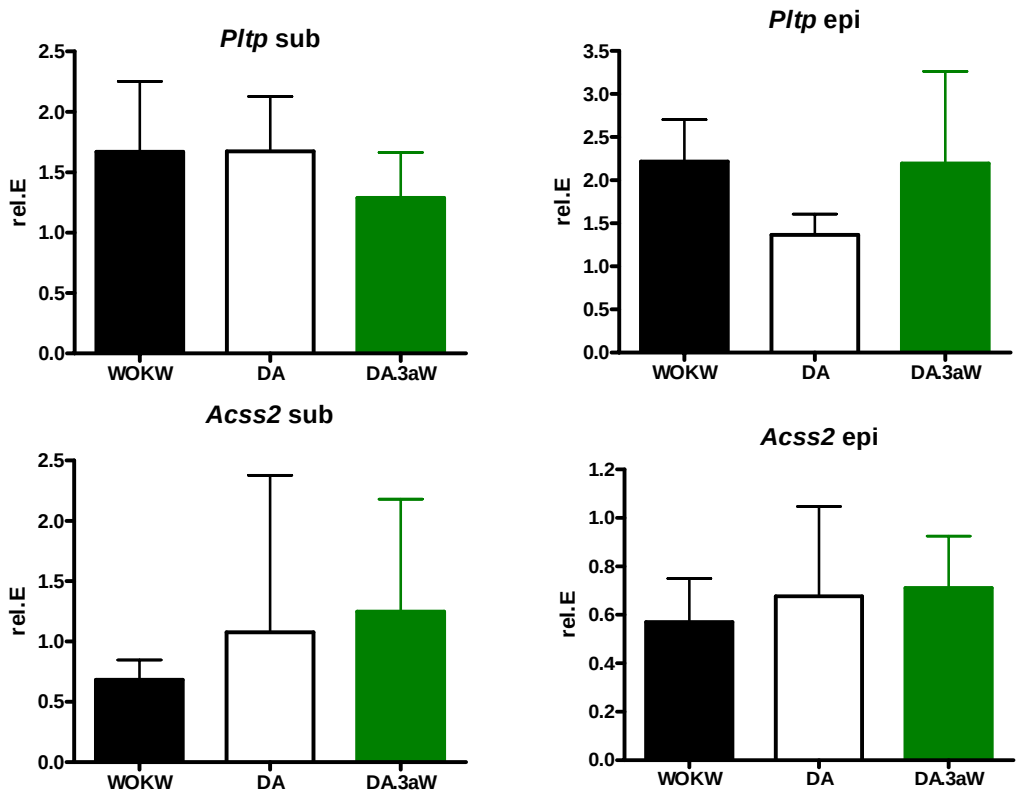

Abb. 12 Expression von *Pltp* und *Acss2* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe von WOKW, DA.3aW und DA
Die Expression von *Pltp* und *Acss2* wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen. Die Expressionsunterschiede sind statistisch nicht signifikant.

Wie man in der Abb. 13 erkennen kann, ist die mRNA-Expression der beiden Phospholipasen Plcg1 (Phospholipase C, gamma 1) und Pla2g4b (Phospholipase A2, group IVB) in WOKW, DA und DA.3aW nicht signifikant verschieden. Aber es ist zu sehen, dass die *Pla2g4b*-Expression im subkutanen Fett in DA und DA.3aW ungefähr gleich ist, während sie in WOKW-Ratten im subkutanen Fett geringer ist. Im epididymalen Fett indessen, ist die Expression von *Pla2g4b* in WOKW am höchsten und in DA.3aW am niedrigsten. Die mRNA-Expression von *Plcg1* ist im subkutanen Fett in DA am höchsten und in DA.3aW am niedrigsten. Im epididymalen Fettgewebe zeigt *Plcg1* in DA.3aW die höchste Expression (Abb. 13).

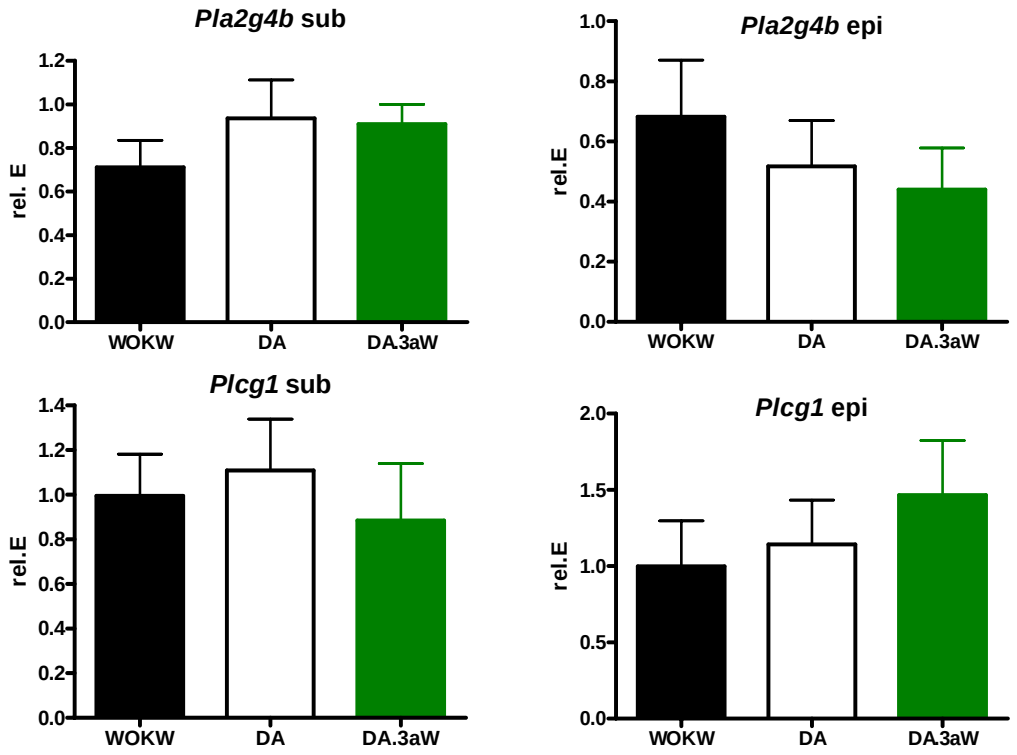

Abb. 13 Expression von *Pla2g4b* und *Plcg1* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe von WOKW, DA.3aW und DA
Die Expression von *Pla2g4b* und *Plcg1* wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen.
Die Expressionsunterschiede sind statistisch nicht signifikant.

Ferner wurde die Expression des Transkriptionsfakors *Foxa2* (Forkhead transcription factor A2) und die mRNA-Expression von *Hnf4a* (Hepatocyte nuclear factor 4 alpha) untersucht. In Abb. 14 kann man erkennen, dass die *Foxa2*-Expression in den drei

Stämmen sowohl im subkutanen als auch im epididymalen Fett sehr gering ist. Dabei ist die Expression in WOKW noch am höchsten. *Hnf4a* wird in WOKW und in DA.3aW höher expremiert als in DA. Diese Unterschiede sind aber aufgrund der hohen Streuung nicht signifikant. In DA ist die *Hnf4α*-Expression sehr niedrig (Abb. 14).

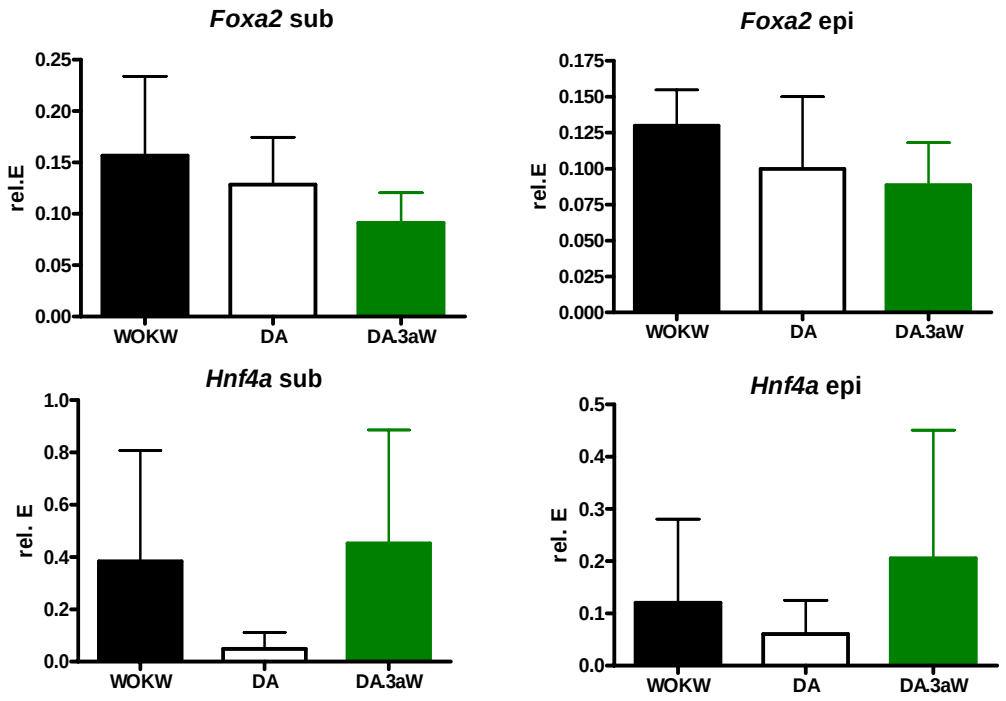

Abb. 14 Expression von *Foxa2* und *Hnf4α* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe von WOKW, DA.3aW und DA
Die Expression von *Foxa2* und *Hnf4a* wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen.
Die Expressionsunterschiede sind statistisch nicht signifikant.

Schließlich wurde die mRNA-Expression von *Dlgap4* (Discs, large homolog-associated protein 4), *Snta1* (Syntrophin alpha 1) und *Pofut1* (Protein-O-Fucosyltransferase 1) ermittelt, die bis dato keine Rolle im Lipidstoffwechsel spielen. Interessant bei diesen Ergebnissen ist, dass die drei Gene im Fettgewebe nachgewiesen werden und signifikanten Differenzen feststellbar sind. Die Expressionsunterschiede der drei Gene sind aber nur im epididymalen Fettgewebe statistisch signifikant, wobei die Expression in DA.3aW immer signifikant verschieden zu beiden Parentalstämmen ist (Abb. 15).

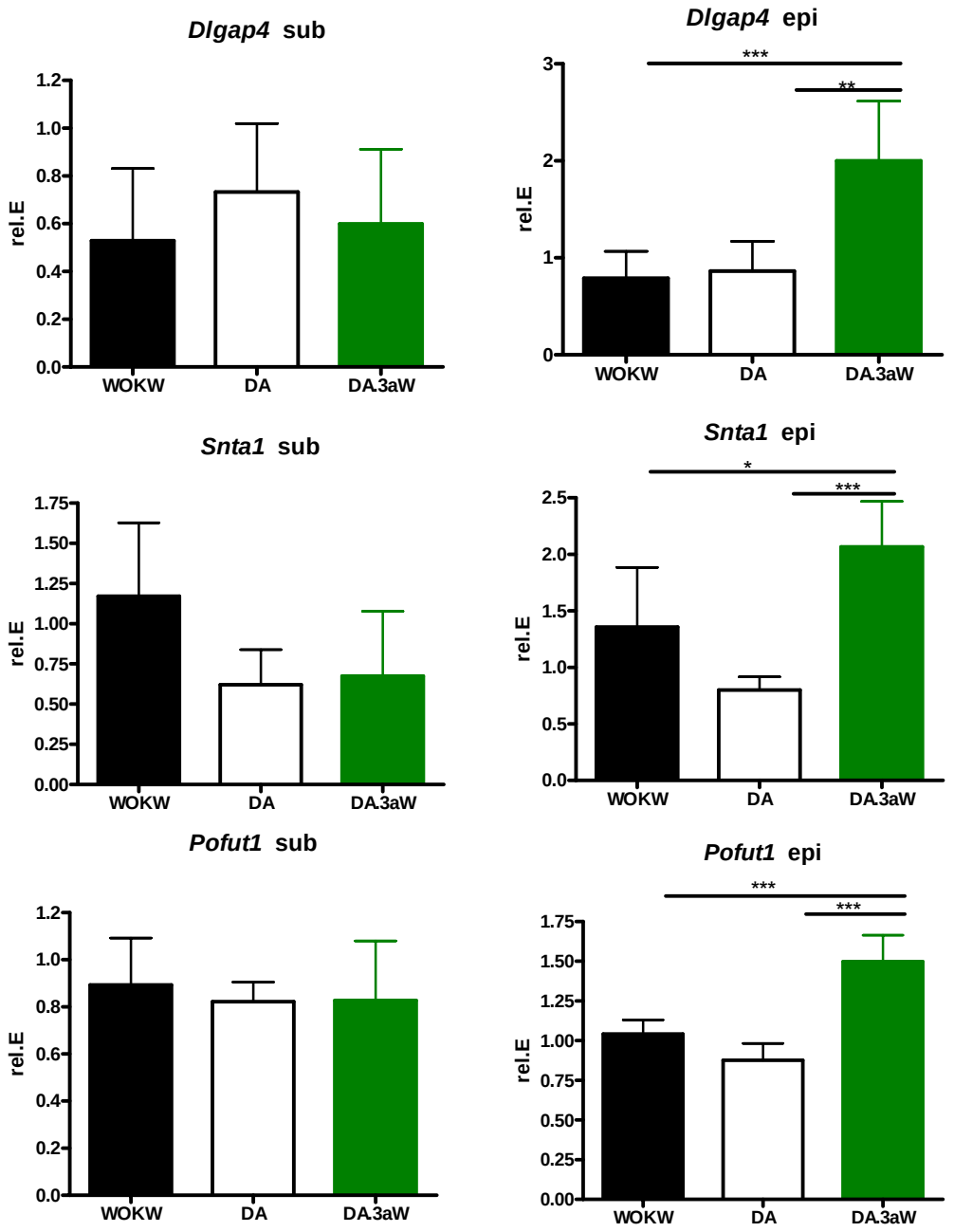

Abb. 15 Expression von *Dlgap4, Snta1* und *Pofut1* im subkutanen und epididymalen Fettgewebe von WOKW, DA.3aW und DA

Die Expression wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen. Im epididymalen Fettgewebe sind die Expressionsunterschiede signifikant verschieden in DA.3aW im Vergleich mit den beiden Parentalstämmen DA und WOKW.

* zeigt signifikante Unterschiede; * P<0,05; ** P< 0,01; *** P< 0,001.

3.3.6. Expression von Kandidatengenen auf Chromosom 10

Da auch DA.10W-Ratten Facetten des Metabolischen Syndroms entwickeln, wurde die Expression möglicher Kandidatengene, die in diesem ausgetauschten Bereich kartieren, in DA.10W sowie in den Parentalstämmen DA und WOKW untersucht.

Von den hier untersuchten Genen wurden nur signifikanten Differenzen in der mRNA-Expression von *Galr2*, *Acox1* und *Cygb* gefunden (Abb. 16).

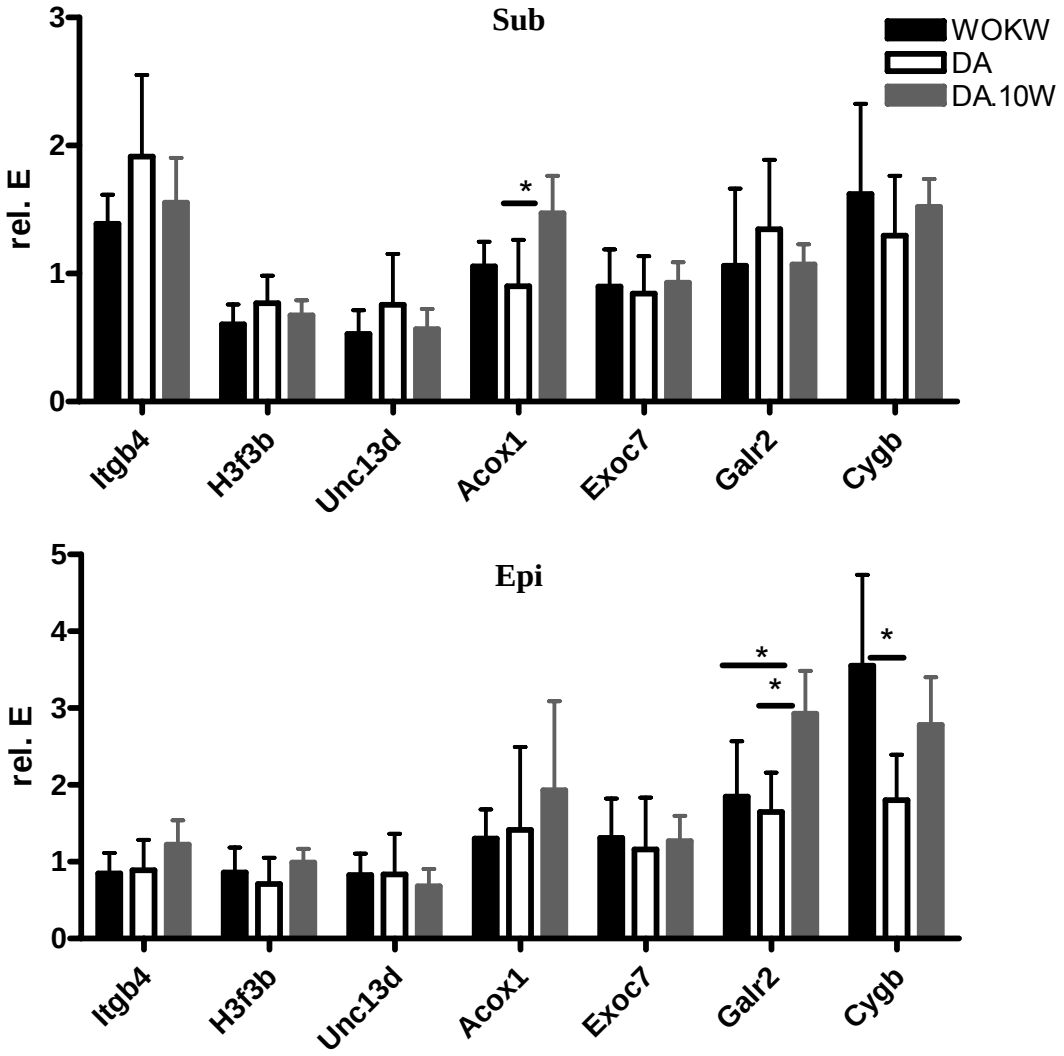

Abb. 16 Expression von Kandidatengenen des Chromosoms 10 im subkutanen und epididymalen Fettgewebe

Die Expression wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen. Die Expressionsergebnisse sind in WOKW, DA und DA.10W vergleichend dargestellt. Signifikante Unterschiede sind in der Expression von *Acox1* im subkutanen Fett und in der Expression von *Galr2* und *Cygb* im epididymalen Fett zu erkennen.

* zeigt signifikante Unterschiede; * P<0,05.

Die Expression von *Galr2* (Galanin receptor 2) ist im epididymalen Fettgewebe in DA.10W signifikant höher als in den beiden Parentalstämmen. Außerdem ist die *Galr2*-Expression auch in WOKW leicht erhöht im Vergleich mit DA. Im Gegensatz dazu ist die *Galr2*-Expression im subkutanen Fett in DA.10W und WOKW niedriger als in DA.
Weiterhin ist eine höhere *Acox1* (Acyl CoenzymA Oxidase 1)-Expression in WOKW wie auch in DA.10W im subkutanen Fettgewebe zu erkennen. Die Expressionsunterschiede sind aber nur zwischen DA und DA.10W signifikant different. Im epididymalen Fettgewebe ist die höhere *Acox1*-Expression in DA.10W statistisch nicht signifikant.
Die Expression von *Cygb* (Cytoglobin) ist sowohl im subkutanen als auch im epididymalen Fettgewebe in WOKW und DA.10W höher als in DA. Aber die Differenzen in der Expression sind nur zwischen WOKW und DA im epididymalen Fettgewebe signifikant.
Weiterhin fällt die tendenziell erhöhte *Itgb4* (Integrin beta 4)-Expression in DA.10W im subkutanen Fettgewebe auf, die aber auf Grund der Streuung nicht signifikant ist. Auch die mRNA-Expression der anderen untersuchten Gene *H3f3b* (H3 histone, family 3B), *Unc13d* (unc-13 homolog D) und *Exoc7* (exocyst complex component 7) ist zwischen DA, WOKW und DA.10W nicht signifikant verschieden im Fettgewebe (Abb. 16).

3.3.7. Expression von *Cip98* in WOKW, DA und DA.5W

Cip98 (CASK-interacting protein CIP98) liegt an Position 80,3 Mb innerhalb des mit WOKW ausgetauschten Bereiches auf Chromosom 5 der Ratte. Auf Grund dessen könnte es in der Entstehung einzelner Facetten des Metabolischen Syndroms in DA.5W involviert sein.
Wie aus der Abb. 17 ersichtlich, ist die Expression in DA.5W sowohl im subkutanen als auch im epididymalen Fettgewebe höher im Vergleich zu DA und WOKW. *Cip98* wird im subkutanen sowie im epididymalen Fettgewebe in DA.5W-Ratten fast doppelt so hoch wie in DA-Ratten expremiert. Allerdings sind die Ergebnisse nur zwischen DA und DA.5W im epididymalen Fett statistisch signifikant. Ergänzend dazu ist die Expressionshöhe in DA- und WOKW-Ratten nahezu identisch.

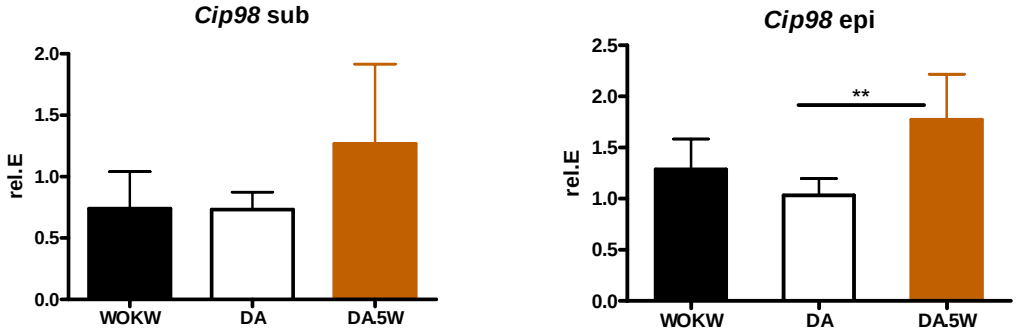

Abb. 17 Expression von *Cip98* im Fettgewebe von DA, WOKW und DA.5W

Die Expression wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen. Die *Cip98*-Expression ist im epididymalen Fettgewebe zwischen DA und DA.5W signifikant verschieden.
* zeigt signifikante Unterschiede; ** P<0,01.

3.4. Genexpression in DA, WOKW und DA.3aW im Hypothalamus

Auch im Hypothalamus, ein spezialisierter Bereich im Gehirn, wurde die Expression von Genen untersucht, die in dem mit WOKW ausgetauschten distalen Bereich auf dem Chromosom 3 liegen.

Die Expressionsergebnisse sind in der Abb. 18 zusammengefasst. Signifikante Unterschiede wurden in der *Snta1*- und *Pofut1*-Expression zwischen DA und DA.3aW gefunden. Diese beiden Gene werden in DA.3aW höher expremiert als in DA-Ratten. Daneben neigen auch WOKW-Ratten zu einer erhöhten Expression dieser beiden Gene.

Außerdem wurde eine signifikant erhöhte Expression von *Glut4* in WOKW im Vergleich mit DA festgestellt. Auffällig ist die sehr hohe Expression von *Dlk1* (*Pref*-1; Preadipocyte factor-1) in allen drei untersuchten Stämmen, wobei die Expression in WOKW- sowie DA.3aW-Ratten tendenziell höher ist als in DA.

Weiterhin wurden die Gene *Dlgap4*, *Ntsr1* (Neurotensin receptor 1), *Edn3* (Endothelin 3), *Rims4* (Regulating synaptic membrane exocytosis 4), *Foxa2*, *Hnf4α*, *Nkx2-2* (NK2 homeobox 2), *Slc32a1* [Solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter), member 1] und Oprl1(Opiate receptor-like 1) nicht signifikant verschieden zwischen DA, WOKW und DA.3aW expremiert (Abb. 18).

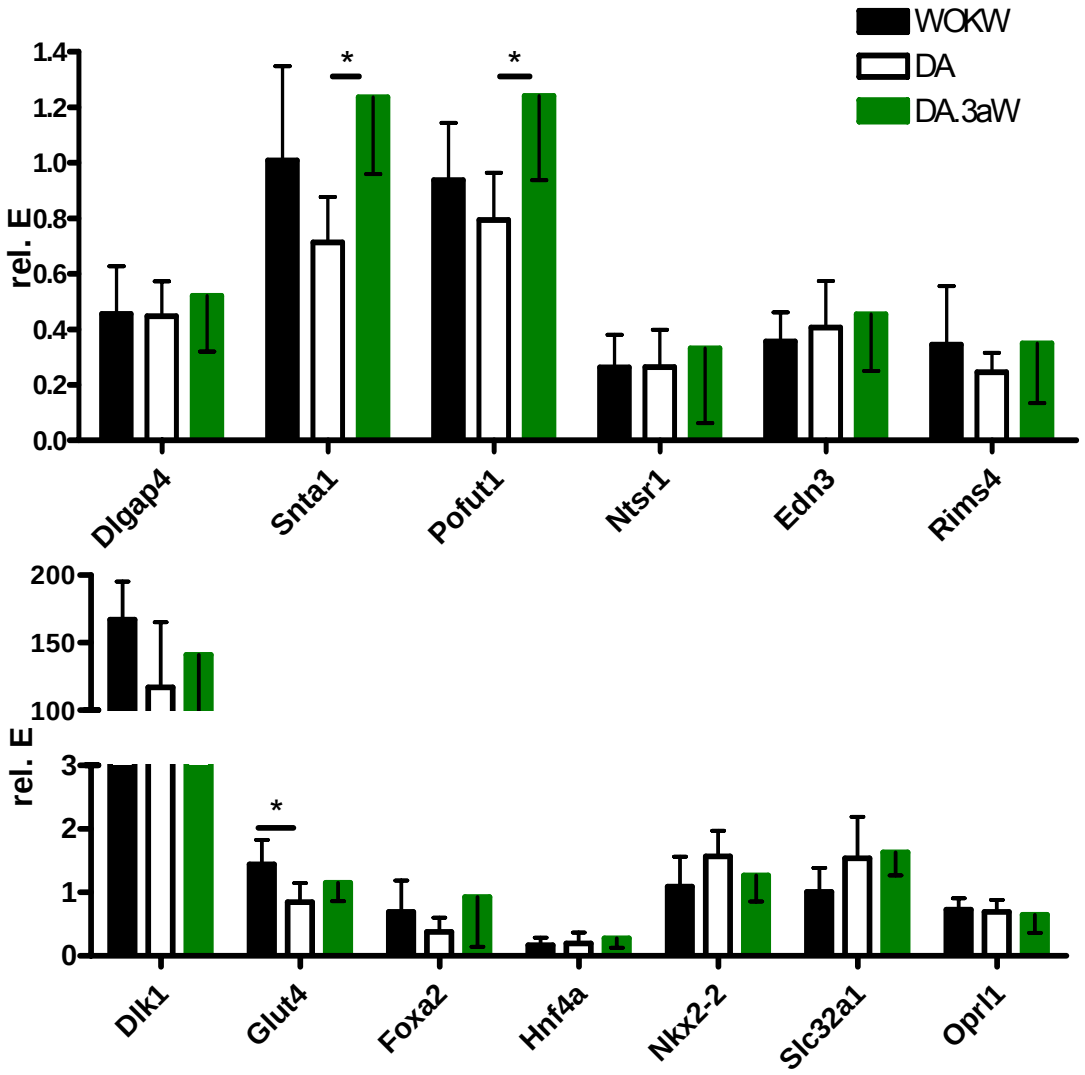

Abb. 18 Expression von Kandidatengenen im Hypothalamus von DA, WOKW und DA.3aW

Die Expression wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen. *Snta1* und *Pofut1* sind in DA.3aW signifikant stärker expremiert als in DA. Außerdem ist die *Glut4*-Expression signifikant verschieden zwischen DA und WOKW.
* zeigt signifikante Unterschiede; * P<0,05.

3.5. Genexpression in DA, WOKW und DA.3aW in der Leber

Schließlich wurde die Expression in der Leber untersucht, da sie eine zentrale Rolle im Metabolismus einnimmt.

In der Abb. 19 sind signifikante Unterschiede in der Genexpression von *Pltp*, *Fasn*, *Acss2*, *Pofut1* und *Pck1* (Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1) zu erkennen. Dabei werden *Pltp* und *Pck1* in WOKW und DA.3aW signifikant niedriger expremiert, während die Expressionshöhe von *Fasn* in diesen beiden Stämmen signifikant höher ist im Vergleich mit DA. Die Expression von *Fasn* ist in DA.3aW fast doppelt so hoch wie in DA und deutlich höher als im Fettgewebe (Abb. 10).

Die *Acss2* und *Pofut1* mRNA-Expression ist in DA und DA.3aW ungefähr gleich hoch und ist signifikant höher als in WOKW.

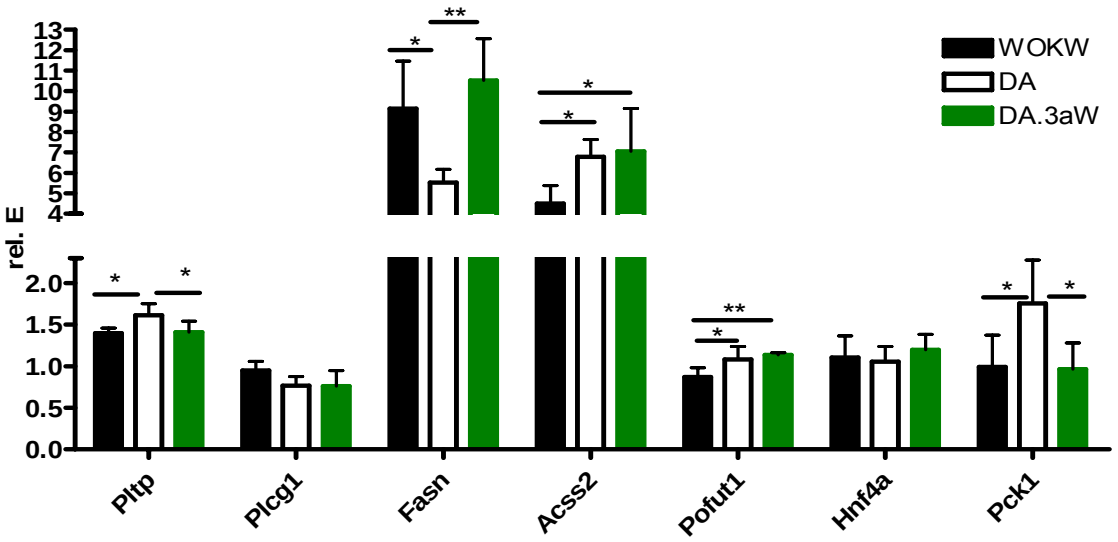

Abb. 19 Expression von Kandidatengenen in der Leber von DA, WOKW und DA.3aW

Die Expression wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen. Nur in der Expression von *Plcg1* und *Hnf4α* sind die Differenzen nicht signifikant verschieden zwischen den Stämmen.

Außerdem wurde eine sehr geringe Expression von *Glut4*, *Foxa2* und *Lpl* in der Leber festgestellt (Abb. 20). Die Expression von *Lpl* in der Leber ist im Gegensatz zum Fettgewebe (Abb. 11) in WOKW signifikant geringer als in DA.

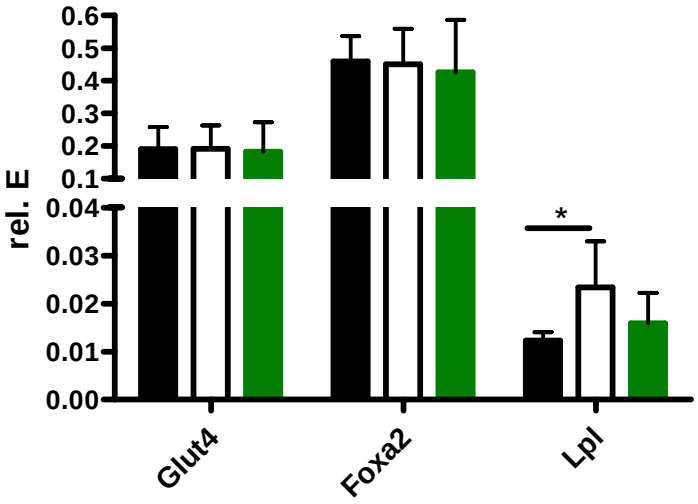

Abb. 20 Expression von Kandidatengenen in der Leber von DA, WOKW und DA.3aW

Die Expression wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen. Die *Lpl*-Expression ist signifikant different zwischen DA und WOKW.
* zeigt signifikante Unterschiede; * P<0,05.

3.6. Expression von *Pck1* in der Niere

Da *Pck1* neben der Leber und dem Fettgewebe auch in der Nierencortex am stärksten expremiert wird, wurde die Expression dieses Gens in der Niere untersucht. Wie aus der Abb. 21 ersichtlich, ist die *Pck1*-Expression im Parentalstamm DA am höchsten und im chromosomalen Donorstamm WOKW am geringsten. Die Expressionsunterschiede sind sowohl zwischen WOKW und DA als auch zu DA.3aW signifikant verschieden.

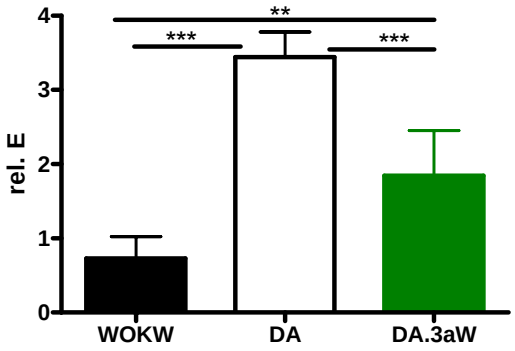

Abb. 21 Expression von *Pck1* in der Niere von WOKW, DA und DA.3aW

Die Expression wurde in 30 Wochen alten Tieren (n=6) mittels qRT-PCR gemessen. Die *Pck1*-Expression ist signifikant different zwischen allen drei untersuchten Rattenstämmen.
* zeigt signifikante Unterschiede; ** P<0,01; *** P<0,001.

3.7. Detektion von Dlk1 im subkutanen Fett von DA, WOKW und DA.3aW

Da *Dlk1* mittels qRT-PCR im Fettgewebe nicht detektiert werden konnte, wurde versucht, Dlk1 auf Proteinebene nachzuweisen.

Wie in der Abb. 22 zu erkennen ist, konnte Dlk1 in den drei hier untersuchten Stämmen im subkutanen Fettgewebe nachgewiesen werden. Die Konzentration von Dlk1 ist im subkutanen Fett in DA.3aW signifikant geringer als in den beiden Parentalstämmen.

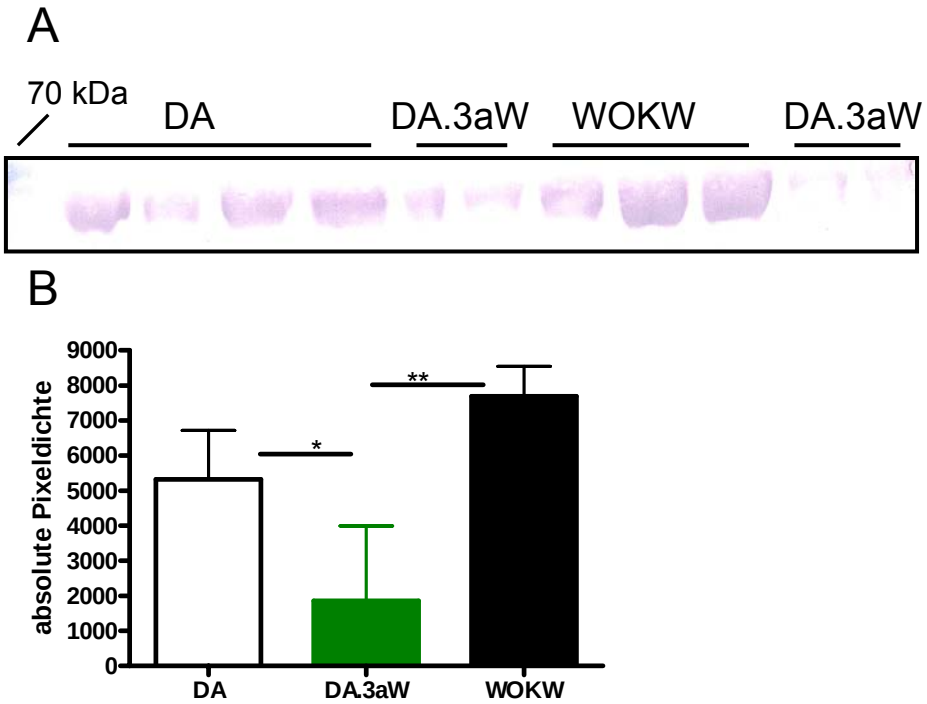

Abb. 22 Nachweis von Dlk1 im subkutanen Fettgewebe von DA, WOKW und DA.3aW

A: 10 µg/ml Gesamtproteinkonzentration aus dem subkutanen Fettgewebe von 30 Wochen alten DA-Ratten, 30 Wochen alten WOKW-Ratten und 30 Wochen alten DA.3aW-Ratten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem polyklonalen Dlk1 Antikörper immundetektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. Dlk1 hat ein scheinbares Molekulargewicht (Mr) von 60 kDa.
B: Die Quantifizierung der Blots erfolgte mit der Software Gel Scan 5™. Dargestellt ist die absolute Pixeldichte. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Mögliche statistische Differenzen wurden mit Anova und Bonferroni`s multiple comparison test errechnet. * $P<0.05$ ** $P<0.01$.

3.8. Sequenzierung möglicher Kandidatengene

An Hand der Expressionsergebnisse wurden *Cip98*, *Cygb*, *Pck1*, *Pltp*, *Pofut1* und *Snta1* als mögliche Kandidatengene ausgewählt und sequenziert. *Pofut1*, *Snta1* und *Cip98* kommen in Frage, da die Expression dieser Gene zwischen DA.3aW bzw. DA.5W und DA signifikant verschieden ist und in WOKW-Ratten ein den kongenen Linien ähnliches Expressionsmuster zu erkennen ist (Abb. 15, 17, 18). *Pck1* könnte ein mögliches Kandidatengen sein, da die *Pck1*-Expression in Leber und Niere von WOKW sowie DA.3aW signifikant geringer ist als in DA (Abb. 19 und 21). Weiterhin wurde *Cygb* sequenziert, da dessen mRNA-Expression im epididymalen Fettgwebe in WOKW-Ratten signifikant und in DA.10W tendenziell höher als in DA-Ratten ist. Im subkutanen Fett ist das Expressionsmuster von *Cygb* ähnlich (Abb. 16).

Für die Sequenzierung wurde cDNA, weshalb ausschließlich die codierende Sequenz (CDS) analysiert wurde, aus der Leber verwendet. Als erstes erfolgte die Sequenzierung der beiden Parentalstämme DA und WOKW. Zur Bestätigung bestehender Unterschiede in der DNA-Sequenz wurden jeweils zwei weitere Tiere der beiden Stämme sequenziert. Wenn die Differenzen belegt werden konnten, dann wurde die kongene Linie sequenziert.

Durch Analyse der cDNA-Sequenz konnten keine Unterschiede in der DNA-Sequenz von *Cip98*, *Cygb*, *Pofut1* und *Snta1* zwischen DA und WOKW festgestellt werden. Die Sequenzen der genannten Gene sind folglich in den beiden Parentalstämmen identisch.

Nur im *Pck1*-Gen ist ein SNP an der Position 4384 im Gen sequenziert worden (Tab. 4). An dieser Stelle befindet sich in WOKW statt Thymin ein Cytosin. Nach Abgleich mit der NCBI Genbank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ist zu erkennen, dass die DA-Sequenz dem WT-Allel entspricht. Das bedeutet, dass ein Nukleotidaustausch von T→C in WOKW-Ratten vorhanden ist. Auch DA.3aW-Ratten tragen diesen SNP, währenddessen DA.3bW-Ratten in der Sequenz dem WT entsprechen (Tab. 4). Die Sequenzierung mit dem Revers Primer bestätigte diesen SNP.

Tab. 4 Sequenzierung von *Pck1*

Stamm	Base	SNP	Basenposition im Gen	Basenposition im Genom	AS-Substitution
WOKW, DA.3aW	C	T→C	4384	334675	Nein
DA, DA.3bW, WT	T				

Pck1 ist auf dem Chromosom 3 (3q42) lokalisiert.
Es ist ein SNP an Position 4384 im Gen identifiziert worden. Dieser Nukleotidaustausch führt nicht zu einer veränderten AS-Sequenz. WT = Wildtyp der NCBI Datenbank.

Das Umschreiben der DNA-Sequenzen von DA und WOKW in die Aminosäuresequenz (http://www.expasy.ch/tools/) und anschließendem Vergleich der beiden AS-Sequenzen führt zu dem Ergebnis, dass der Nukleotidaustausch von T→C nicht zu einer veränderten AS-Folge führt, sondern eine stumme Mutation ist.

Mit dem Bioinformatikprogramm TESS (Transcription Element Search System; http://www.cbil.upenn.edu/tess/) ist anschließend untersucht worden, ob der Nukleotidaustausch zu einer zusätzlichen Bindestelle oder zu einem Verlust einer Bindestelle für Transkriptionsfaktoren führt. In wie weit der Verlust einer Bindestelle für NIP (Nuclear inhibitory protein) in WOKW- sowie DA.3aW-Ratten von Belang ist, muss diskutiert werden (Abb. 23).

A

NIP

DA TGTAGGAGCTGCCATGAGATCAGAGGCCA

WOKW TGTAGGAGCCGCCATGAGATCAGAGGCCA

B

NIP GCTGCCAT

Abb. 23 Der SNP in *Pck1* führt zu dem Verlust einer NIP-Bindestelle in WOKW und DA.3aW
A: Dargestellt ist ein Auszug aus der *Pck1*-Sequenz mit dem SNP T→C an Position 4384 im Gen. Der Polymorphismus ist rot hervorgehoben und führt zu dem Verlust einer NIP-Bindestelle, die ebenfalls gekennzeichnet ist. Dieses Ergebnis wurde mit dem Bioinformatikprogramm TESS erstellt.
B: Abgebildet ist die DNA-Sequenz, an die NIP bindet.
NIP, Nuclear inhibitory protein; TESS, Transcription Element Search System.

3.9. Untersuchung von *Repin1* als mögliches Kandidatengen

3.9.1. Altersabhängigkeit der Repin1-Proteinkonzentration

Zunächst wurde die Repin1-Konzentration in Abhängigkeit vom Alter untersucht. Für diese Versuche wurden 4 Wochen, 10 Wochen und 30 Wochen alte BB.4W- und BB.4S-Ratten ausgewählt. Diese kongenen Ratten haben als Gemeinsamkeiten den genetischen Hintergrund der BB/OK-Ratte und ein kongenes Chromosomenstück des Chromosoms 4, dass wie bereits beschrieben (S. 15) von unterschiedlichen Donorstämmen stammt. *Repin1* ist innerhalb des kongenen Chromosomenabschnitts in BB.4S und BB.4W lokalisiert.
An Hand der TTT-Repeatlänge in der 3'UTR von *Repin1* und da sie als krankheitsresistenter Stamm gelten, dienen DA-Ratten als Kontrolle. DA enthalten 7 TTT-Repeats in der 3'UTR von *Repin1* und entsprechen somit dem WT-Allel. Die beiden kongenen Linien müssen Mutantenalle tragen, da *Repin1* in BB.4W genetisch identisch mit WOKW ist und somit 11 TTT-Repeats besitzt, währenddessen *Repin1* in BB.4S genetisch identisch mit SHR ist und demzufolge fünf TTT-Repeats enthält.
Repin1 wurde aus einem Proteinextrakt mit einem monoklonalen Antikörper immundetektiert. Es ist immer eine Doppelbande bei ungefähr 50 kDa detektiert worden. Das stimmt mit dem errechneten Molekulargewicht (Mr) von ca. 55 kDa überein, ausgehend von einem durchschnittlichen Mr von 100 Da für eine Aminosäure.

In der Abb. 24 ist sehr gut zu erkennen, dass die Repin1-Konzentration im Altersverlauf der BB.4S-Ratten ansteigt. Nach 10 Wochen ist die Repin1-Konzentration fast 4-Fach höher als in 4 Wochen alten Ratten, wenngleich diese Unterschiede nicht signifikant verschieden sind. Nach 30 Wochen kommt Repin1 signifikant 3-mal so häufig wie in 10 Wochen alten Ratten im subkutanen Fett vor. Beeindruckend ist der Unterschied zwischen 4 und 30 Wochen alten Tieren. Hier wurde ein signifikanter Anstieg um das 11-Fache festgestellt. Außerdem ist die Repin1-Konzentration in 30 Wochen alten BB.4S deutlich wie auch signifikant höher im Vergleich mit 30 Wochen alten DA (Abb. 24).

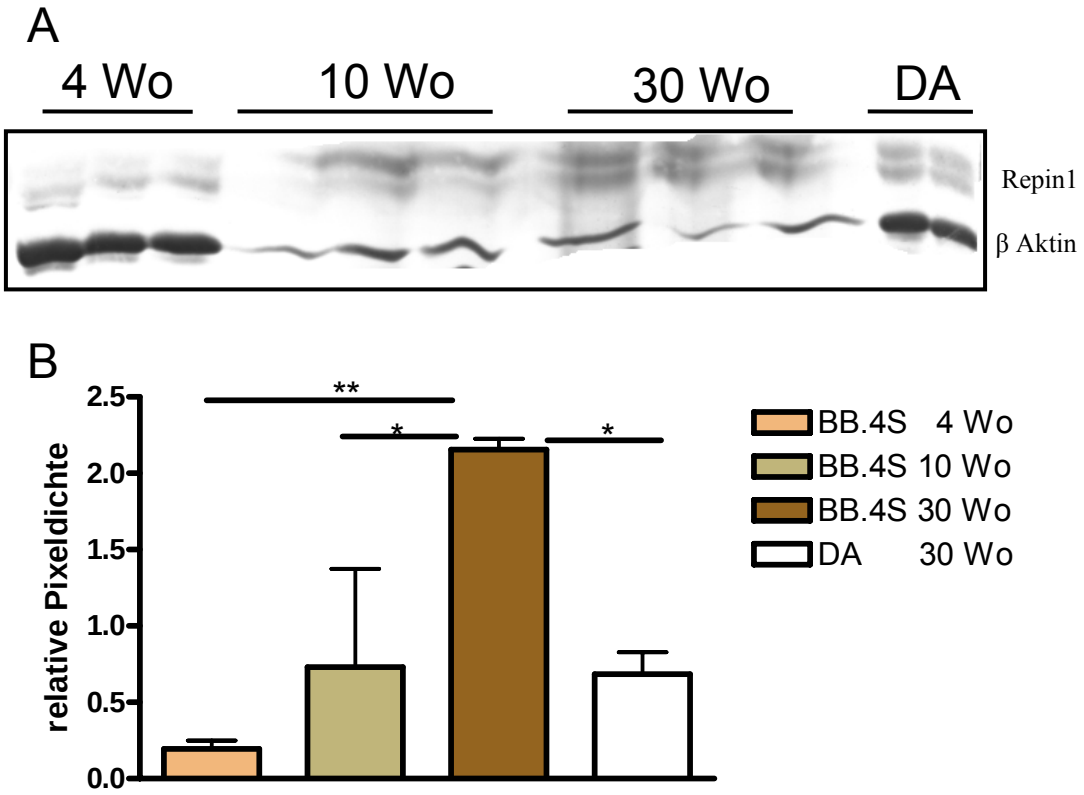

Abb. 24 Altersabhängigkeit der Repin1-Konzentration in BB.4S

A: 10 µg/ml Gesamtproteinkonzentration aus dem subkutanen Fettgewebe von 4, 10 und 30 Wochen alten BB.4S-Ratten (n=3) und 30 Wochen alten DA-Ratten (n=2) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl mit einem Repin1 Antikörper als auch mit einem β Aktin Antikörper zur Kontrolle immundetektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot.
B: Die Quantifizierung der Blots erfolgte mit der Software Gel Scan 5™. Die Absolutwerte der beiden Repin1-Banden wurden addiert und anschließend durch die Absolutwerte der β Aktin Banden dividiert, um die relative Pixeldichte zu erhalten. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Mögliche statistische Differenzen wurden mit Anova und Bonferroni`s multiple comparison test errechnet. * $P<0.05$ ** $P<0.01$.
Es wurden ausschließlich männliche Tiere untersucht.

Auch in BB.4W-Ratten ist mit zunehmendem Alter ein Anstieg der Repin1-Konzentration im subkutanen Fettgewebe zu erkennen (Abb. 25). In 4 Wochen alten Ratten ist Repin1 nur sehr gering vorhanden. Nach 10 Wochen ist die Repin1-Konzentration um das 4-Fache angestiegen, während sie nach 30 Wochen am höchsten ist. Deutlich ist der Anstieg um das 12-Fache zwischen 4 und 30 Wochen alten Tieren (Abb. 25). Außerdem ist ein merklicher Unterschied in der Repin1-Konzentration zwischen 30 Wochen alten BB.4W- und DA-Ratten zu beobachten. In BB.4W-Ratten ist Repin1 ungefähr 4-mal so häufig vorhanden wie in DA-Ratten des gleichen Alters (Abb. 25).

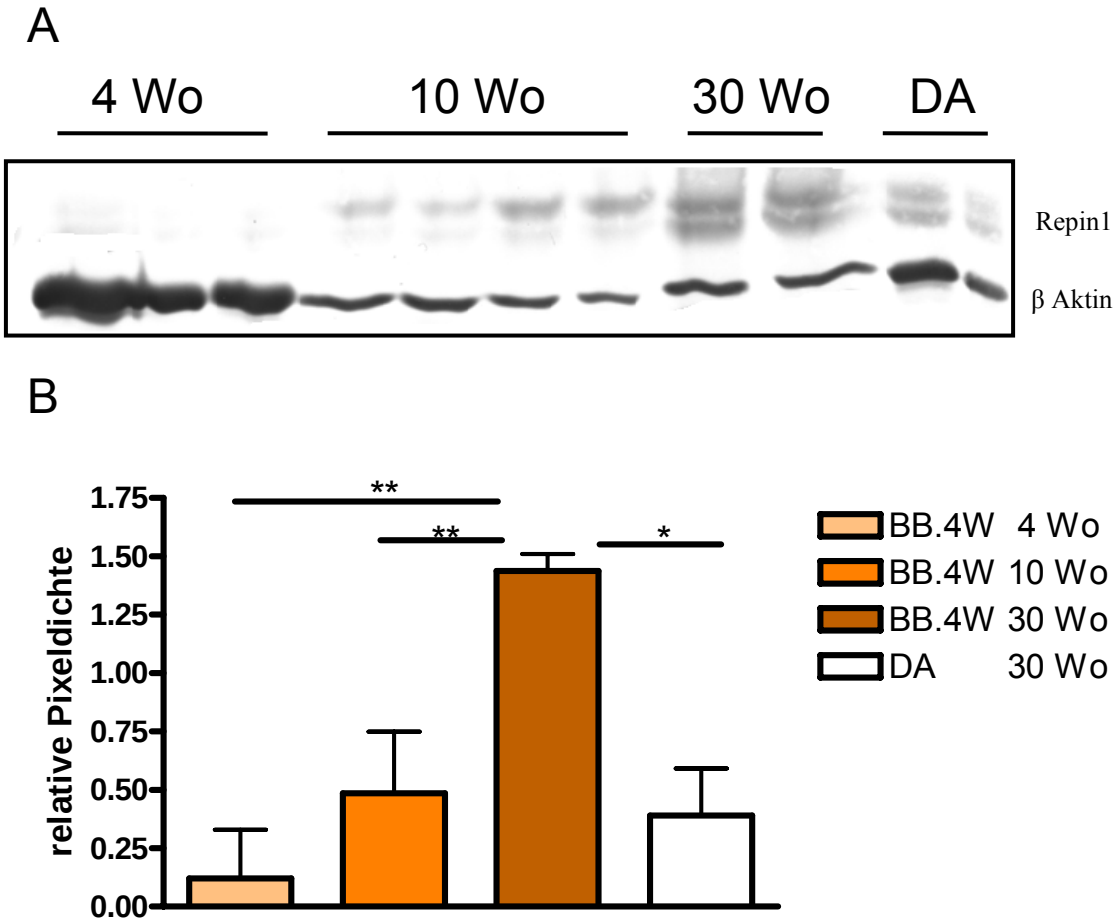

Abb. 25 Altersabhängigkeit der Repin1-Konzentration in BB.4W

A: 10 µg/ml Gesamtproteinkonzentration aus dem subkutanen Fettgewebe von 4, 10 und 30 Wochen alten BB.4S-Ratten (n=2-4) und 30 Wochen alten DA-Ratten (n=2) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl mit einem Repin1 Antikörper als auch mit einem β Aktin Antikörper zur Kontrolle immundetektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot.
B: Die Quantifizierung der Blots erfolgte wie unter Abb. 24 B beschrieben. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Mögliche statistische Differenzen wurden mit Anova und Bonferroni`s multiple comparison test errechnet. * $P<0.05$ ** $P<0.01$.
Es wurden ausschließlich männliche Tiere untersucht.

Weitere Experimente haben belegt, dass eine Veränderung der Gesamtproteinkonzentration von 10 µg/ml bis 50 µg/ml nicht zu einer Erhöhung der Repin1-Konzentration in 4 Wochen alten Tieren führt (hier nicht dargestellt).

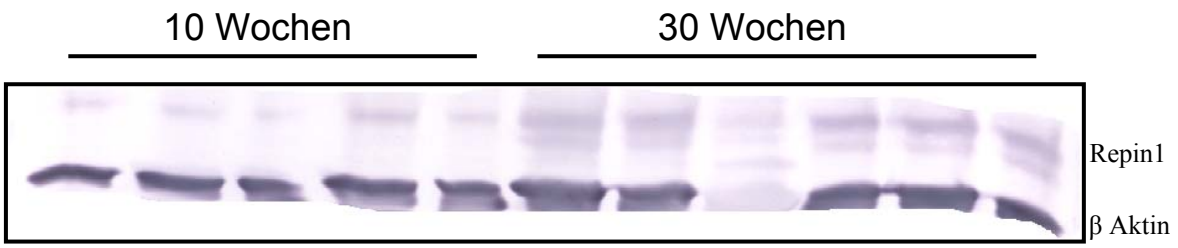

Abb. 26 Altersabhängigkeit der Repin1-Konzentration in DA-Ratten

10 µg/ml Gesamtproteinkonzentration aus dem subkutanen Fettgewebe von 10 und 30 Wochen alten DA-Ratten (n=5-6) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl mit einem Repin1 Antikörper als auch mit einem β Aktin Antikörper zur Kontrolle immundetektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot.

Ferner kann auch ein Anstieg der Repin1-Konzentration in 10 Wochen und 30 Wochen alten DA-Ratten beobachtet werden (Abb. 26).

3.9.2. Repin1 in DA, WOKW und DA.3aW

Um die Bedeutung von Repin1 in der Entstehung von Facetten des MetS zu untersuchen, wurde die Repin1-Konzentration in DA als gesunder Stamm sowie in WOKW-Ratten, die das MetS ausbilden, verglichen. Außerdem wurde Repin1 in DA.3aW analysiert, da diese kongenen Linie zahlreiche Facetten des MetS entwickelt, wie die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung belegen (Abb. 3-6).

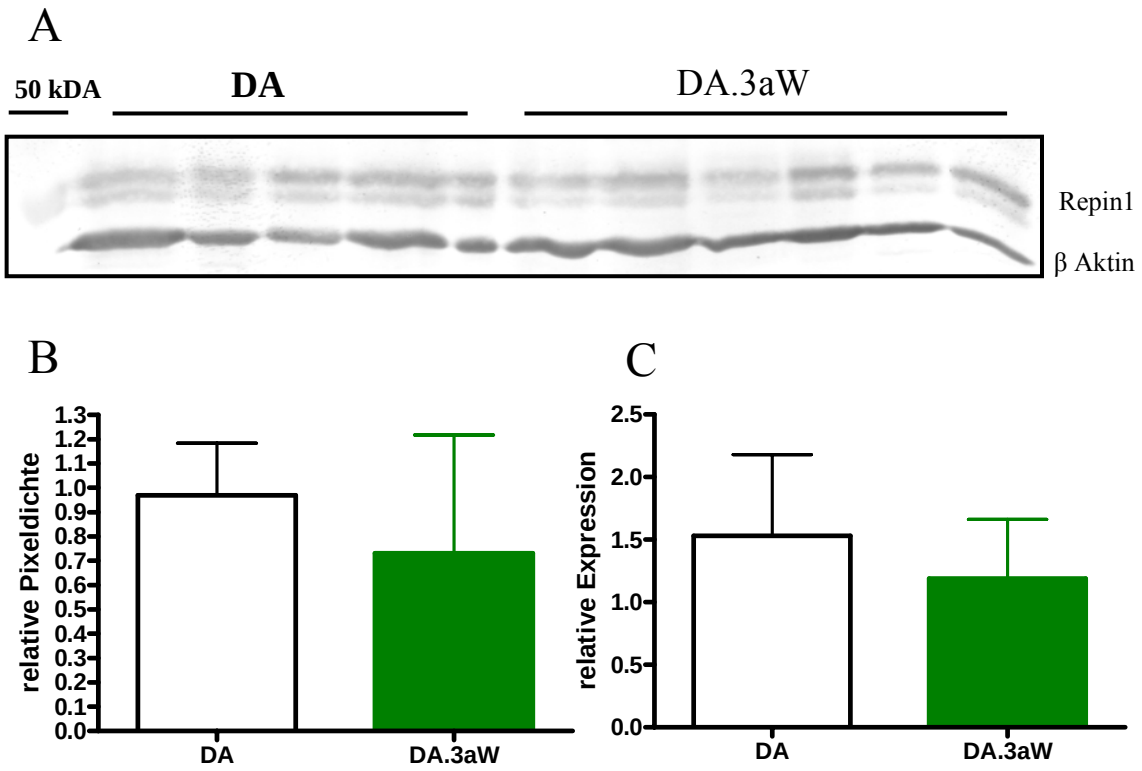

Abb. 27 Repin1 im subkutanen Fettgewebe von DA und DA.3aW

A: 10 µg/ml Gesamtproteinkonzentration aus dem subkutanen Fettgewebe von 30 Wochen alten DA- und DA.3aW-Ratten (n=5-6) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl mit einem Repin1 Antikörper als auch mit einem β Aktin Antikörper zur Kontrolle immundetektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot.
B: Die Quantifizierung der Blots erfolgte wie unter Abb. 24 B beschrieben. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Mögliche statistische Differenzen wurden mit dem t-Test nach Student errechnet.
C: Die *Repin1*-Genexpression wurde bezogen auf die *18S*-Expression relativiert. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD (n=6) dargestellt. Mögliche statistische Differenzen wurden mit dem t-Test nach Student errechnet.
Es wurden ausschließlich männliche Tiere untersucht.

Sowohl im subkutanen als auch im epididymalen Fettgewebe sind keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Protein-Expression (Abb. 27 B, 28 B) sowie der Genexpression (Abb. 27 C, 28 C) zwischen DA und DA.3aW ermittelt worden. Im subkutanen Fettgewebe ist die Expression auf Protein- und Gen-Ebene in DA-Ratten leicht erhöht, während sie im epididymalen Fett in DA-Ratten leicht erniedrigt ist (Abb. 27, 28).

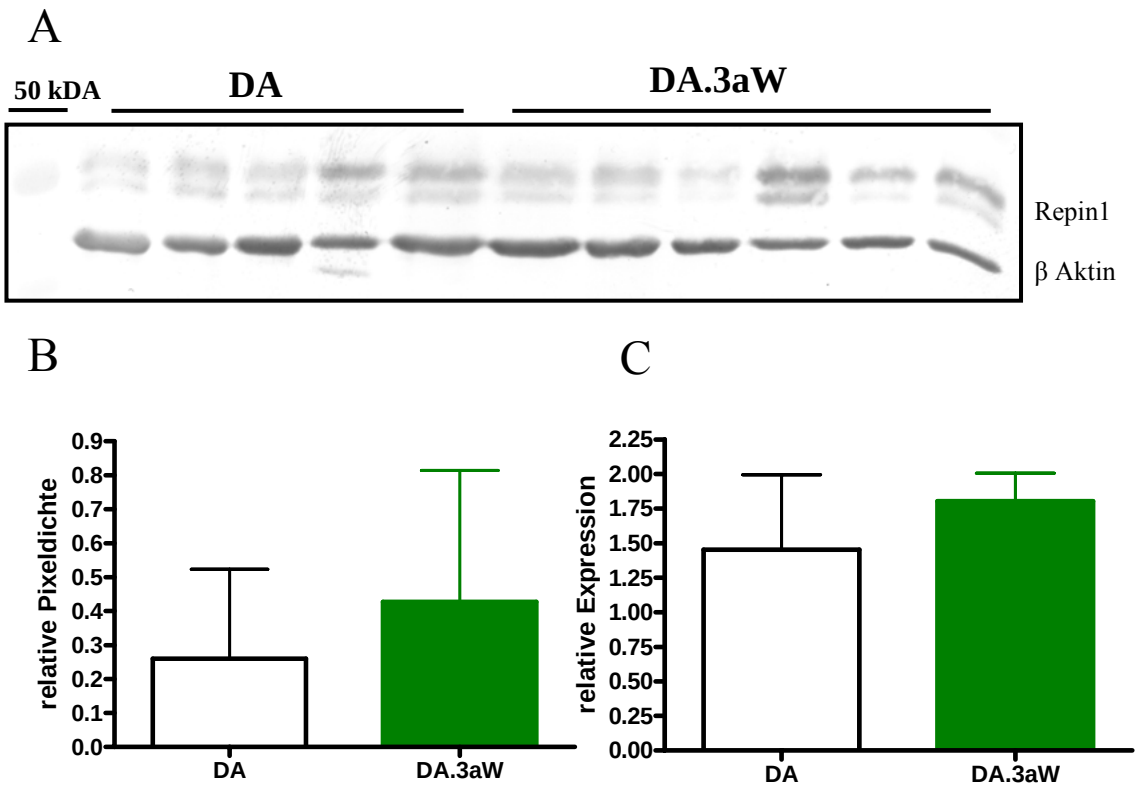

Abb. 28 Repin1 im epididymalen Fettgewebe von DA und DA.3aW

A: 10 µg/ml Gesamtproteinkonzentration aus dem epididymalen Fettgewebe von 30 Wochen alten DA- und DA.3aW-Ratten (n=5-6) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl mit einem Repin1 Antikörper als auch mit einem β Aktin Antikörper zur Kontrolle immundetektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot.
B: Die Quantifizierung der Blots erfolgte wie unter Abb. 24 B beschrieben. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Mögliche statistische Differenzen wurden mit dem t-Test nach Student errechnet.
C: Die *Repin1*-Genexpression wurde bezogen auf die *18S*-Expression relativiert. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD (n=6) dargestellt. Mögliche statistische Differenzen wurden mit dem t-Test nach Student errechnet.
Es wurden ausschließlich männliche Tiere untersucht.

Interessanterweise kann im subkutanen Fettgewebe von WOKW ein signifikant erhöhtes Vorkommen von Repin1 als in DA festgestellt werden (Abb. 29 B), was man auch auf dem Blot sehr deutlich erkennen kann (Abb. 29 A).

Abweichend von diesem Ergebnis ist die *Repin1*-Genexpression in WOKW nicht erhöht im Vergleich mit DA, sondern tendenziell erniedrigt (Abb. 29 C).

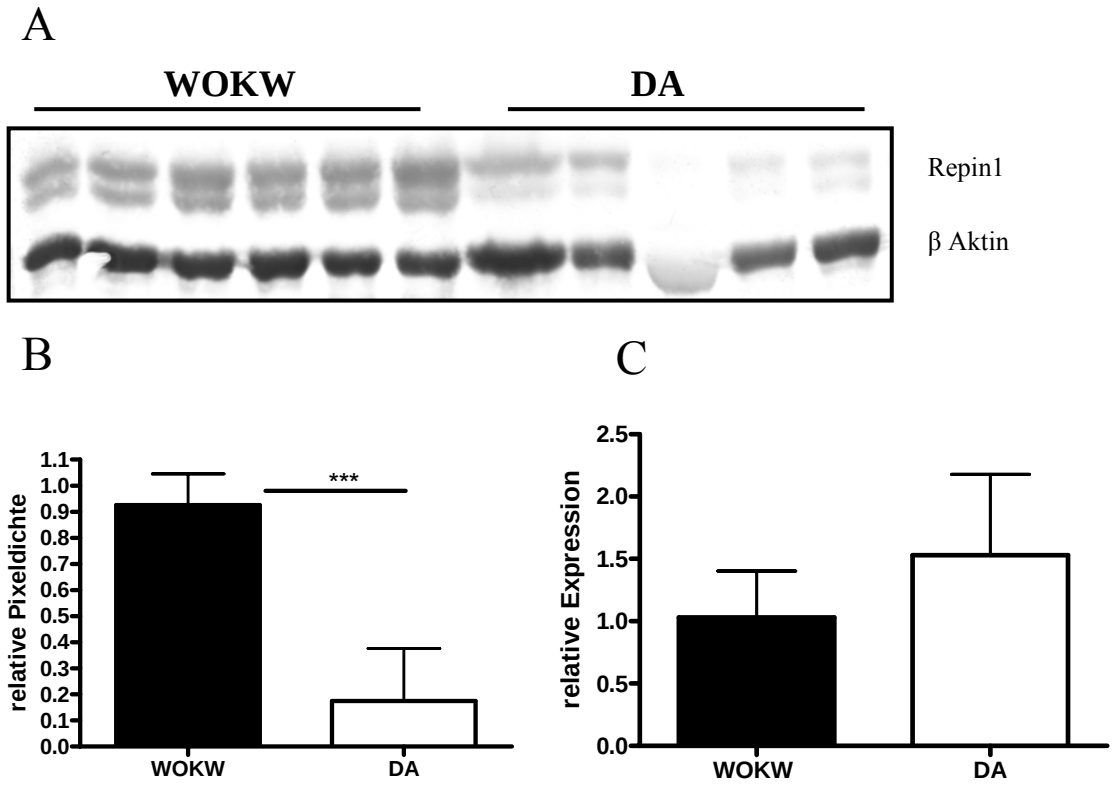

Abb. 29 Repin1 im subkutanen Fettgewebe von WOKW und DA

A: 10 µg/ml Gesamtproteinkonzentration aus dem subkutanen Fettgewebe von 30 Wochen alten DA- und WOKW-Ratten (n=5-6) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl mit einem Repin1 Antikörper als auch mit einem β Aktin Antikörper zur Kontrolle immundetektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot.
B: Die Quantifizierung der Blots erfolgte wie unter Abb. 24 B beschrieben. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Mögliche statistische Differenzen wurden mit dem t-Test nach Student errechnet.
*** P<0.001.
C: Die *Repin1*-Genexpression wurde bezogen auf die *18S*-Expression relativiert. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD (n=6) dargestellt. Mögliche statistische Differenzen wurden mit dem t-Test nach Student errechnet.
Es wurden ausschließlich männliche Tiere untersucht.

Im epididymalen Fettgewebe ist die Repin1-Konzentration ebenfalls statistisch signifikant höher als in DA (Abb. 30 A, B). Die Unterschiede sind allerdings im subkutanen Fett offenbar ausgeprägter als im epididymalen Fettgewebe. An Hand der relativen Pixeldichte kann eine Erhöhung um das 5-Fache der Repin1-Konzentration in WOKW im subkutanen Fett im Vergleich mit DA errechnet werden. Demgegenüber steht ein etwas geringer Anstieg der Repin1-Konzentration, um das Doppelte, im epididymalen Fett (Abb. 30 B). Auch im epididymalen Fett ist die *Repin1*-Genexpression in WOKW-Ratten tendenziell erniedrigt im Vergleich mit DA (Abb. 30 C).

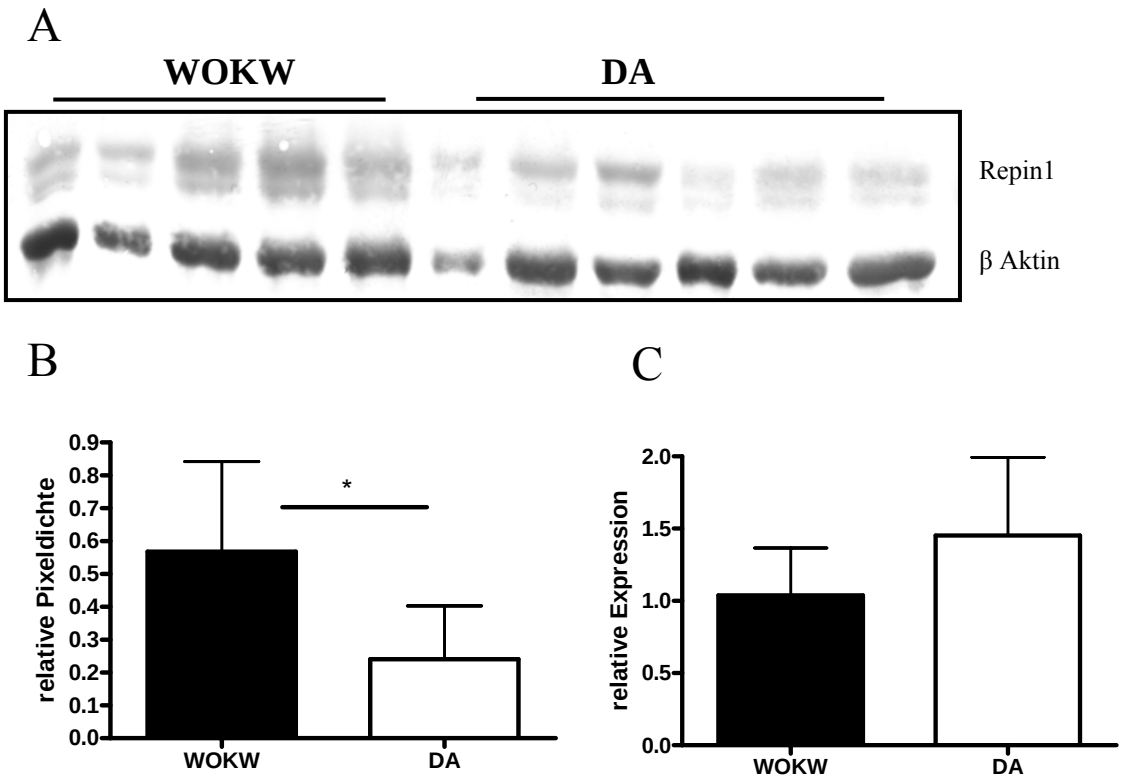

Abb. 30 Repin1im epididymalen Fettgewebe von WOKW und DA

A: 10 µg/ml Gesamtproteinkonzentration aus dem epididymalen Fettgewebe von 30 Wochen alten DA- und WOKW-Ratten (n=5-6) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl mit einem Repin1 Antikörper als auch mit einem β Aktin Antikörper zur Kontrolle immundetektiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot.
B: Die Quantifizierung der Blots erfolgte wie unter Abb. 24 B beschrieben. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Mögliche statistische Differenzen wurden mit dem t-Test nach Student errechnet.
*** P<0.001.
C: Die *Repin1*-Genxpression wurde bezogen auf die *18S*-Expression relativiert. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD (n=6) dargestellt. Mögliche statistische Differenzen wurden mit dem t-Test nach Student errechnet.
Es wurden ausschließlich männliche Tiere untersucht.

4. Diskussion

Das Metabolische Syndrom ist eine Krankheit, die sich aus zahlreichen Facetten zusammensetzt und aktuell viel diskutiert wird, da die Anzahl der Erkrankten weltweit ansteigt. Eine zentrale Rolle als Risikofaktor für das MetS nimmt dabei eine Adipositas ein, wobei die Prävalenz des MetS mit dem Ausmaß der Adipositas ansteigt. Außerdem wird eine enge Beziehung zwischen einer Insulinresistenz und dem MetS angenommen.
Alarmierend ist die Tatsache, dass ungefähr 110 Millionen (Mio) Kinder weltweit als übergewichtig oder sogar adipös gelten und damit ein hohes Risiko für metabolische und kardiovaskuläre Krankheiten tragen [48]. Erfahrungsgemäß sind Kinder gefährdeter, zukünftig diese Krankheit zu entwickeln, deren Eltern am MetS erkrankt sind. Die meisten adipösen Kinder haben mindestens ein Elternteil, der ebenfalls fettleibig ist. Dabei spielt die Genetik sowie das Verhalten eine entscheidende Rolle, denn Übergewicht wird erwiesenermaßen durch Bewegungsmangel gefördert. Der positive Zusammenhang zwischen dem Fernsehen und übergewichtigen Kindern sowie Erwachsenen ist deshalb nicht überraschend. Oftmals ist es leider so, dass Kinder von adipösen Eltern deren inaktive Lebensweise annehmen. Dagegen fördert Bewegung die Insulinsensitivität und schützt vor Übergewicht und Adipositas. Auch eine Umstellung der Essgewohnheiten von fettreicher Ernährung auf z.B. mediterrane Kost ist vorteilhaft für einen gesunden Lebensstil [49].
Da das MetS ein entscheidender Risikofaktor für Gefäßschäden, Herzerkrankungen, Schlaganfall und T2DM ist, muss die Verbreitung dieser Krankheit eingedämmt werden. Auch aus wirtschaftlichen Gründen, da die Kosten für das Gesundheitssystem enorm hoch sind und weiter ansteigen [50]. Deshalb hat in den letzten Jahren die Aufklärung der genetischen Prädisposition für das MetS an Bedeutung gewonnen.
Zahlreiche Studien versuchen die genetische Komponente zu entschlüsseln. Erfolge konnten durch Linkage-Analysen erzielt werden, in denen Chromosomenregionen (QTLs) die mit einzelnen Facetten des MetS korrelieren, identifiziert wurden. Die Linkage-Analyse ist ein statistisches Verfahren, mit Hilfe dessen die Kosegregation zweier Loci gemessen werden kann. Dabei gibt der LOD-Score (logarithm of the odds) die Wahrscheinlichkeit an, ob zwei Loci nah nebeneinander liegen und somit gekoppelt vererbt werden [1].

Terán-Garcia und Bouchard haben in ihrem Review humane QTLs, die mit dem MetS assoziiert sind und einen LOD-Score ≥ 2 haben, beschrieben und zusammengefasst [1]. Interessant sind auch die im Anschluss kurz beschriebenen Linkage-Analysen, mit deren Hilfe chromosomale Regionen mit Kandidatengenen für das MetS identifiziert werden konnten. In der GENNID Studie (Genetics of NIDDM) wurden Familien mit T2DM aus vier ethnischen Gruppen untersucht. In dieser Studie konnten zwei chromosomale Loci mit Verbindung zum MetS identifiziert werden. Eine Region auf dem Chromosom 2 (2q12.1–2q13) für einen Gewicht / Taillen Faktor in weißen Probanden und eine Region auf dem Chromosom 3 (3q26.1–3q29) für Blutdruck in Amerikanern mexikanischer Abstammung [51]. In einer Linkage Analyse mit Testpersonen der HERITAGE family study (HEalth, RIsk factors, exercise Training And GEnetics) konnten QTLs, die das MetS beeinflussen, auf dem Chromosom 10p und 19q in weißen und auf dem Chromosom 1q in schwarzen Probanden bestimmt werden [52]. Die Ergebnisse einer Studie mit T2DM Patienten schließen auf einen MetS-Locus auf dem Chromosom 1p36, der auch durch andere Studien belegt werden kann [53].
Anschließend werden mögliche Kandidatengene für Facetten des MetS in kongenen DA.WOKW-Ratten sowie deren phänotypische Merkmale diskutiert.

4.1. Gene auf den Chromosomen 3, 5, 10 und 16 der Ratte sind in der Entwicklung von Facetten des MetS beteiligt

Eine kongene Rattenlinie wird generiert, indem ein spezifischer Locus von einem Donorstamm auf einem Rezipienteninzuchtstamm übertragen wird. Der übertragende genetische Locus kann mehrere Gene enthalten. Wenn der kongene Stamm in einem oder mehreren phänotypischen Merkmalen von dem Rezipientenstamm abweicht, dann kann geschlussfolgert werden, dass in dem kongenen Abschnitt ein Locus liegt, der das bzw. die Merkmale beeinflusst.
In dieser Arbeit wurden kongene DA.WOKW-Rattenlinien generiert, um die in vivo Relevanz von QTLs zu belegen, die in früheren Studien mit männlichen und weiblichen (WOKW x DA)F2-Nachkommen kartiert worden sind [39, 40]. Deshalb wurden Regionen der Chromosomen 3, 5, 10 und 16 der DA-Ratte mit den homologen chromosomalen Bereichen von WOKW ersetzt. Die kongenen Linien wurden DA.3aW, DA.3bW, DA.5W, DA.10W und DA.16W genannt und unterscheiden sich genetisch nur von der DA-Ratte

durch den spezifischen kongenen Chromosomenbereich. Da die kongenen Linien zu >90 % genetisch identisch mit DA sind, müssen die WOKW-spezifischen Gene in den kongenen Chromosomenregionen für die phänotypischen Abweichungen zwischen DA und den kongenen Linien verantwortlich sein.

Die phänotypische Charakterisierung der kongenen Linien zeigt deutlich, dass Gene in den kongenen WOKW-Bereichen auf den Chromosomen 3, 5, 10 und 16 den AI, die Körpermasse, die Seruminsulin- und Serumleptinwerte sowie die Serumlipide in Abhängigkeit von der chromosomalen Region und des Geschlechts der Ratten beeinflussen. In der Abb. 2 ist zu erkennen, dass einige QTLs, die in den früheren Linkage-Analysen mit (WOKW x DA)F2-Nachkommen kartiert wurden, innerhalb der kongenen WOKW-Bereiche liegen. Zusätzlich geben die phänotypischen Daten Hinweise für weitere QTLs.

Wie aus den phänotypischen Ergebnissen ersichtlich ist, könnten in der Region zwischen *D3Mgh5* und *D3Rat1* auf dem distalen Chromosom 3 QTLs für die Körpermasse, den AI und Leptin sowie ein für Weibchen spezifischer Cholesterol-QTL liegen (Abb. 3, 4 und 6). Diese Region ist sehr interessant, da ein Teil (3q42) homolog zum humanen Chromosomenabschnitt 20q13.1 ist, eine Region die mit Adipositas und Diabetes assoziiert ist [54-57]. Dong et al. identifizierten ebenfalls in der Region auf dem humanen Chromosom 20 einen Abschnitt mit Verbindung zu Obesitas zwischen *D20S178* und *D20S149* [58].

Außerdem ist die distale Region des Chromosoms 3 der Ratte zwischen den Markern *D3Mgh5* und *D3Rat1* homolog zum distalen Maus-Chromosom 2, wo QTLs für AI, Körpermasse und Fett lokalisiert sind [59-62]. Außerdem erkannten Allan et al. in Linkage-Analysen mit (ICR x M16)F2-Nachkommen einen Plasmaleptin-QTL (*Mlepq1*) in dem homologen Bereich des murinen Chromosoms 2 [63].

DA.3bW- und DA.5W-Ratten fallen durch erhöhte HDL-Cholesterol- und Gesamt-cholesterolwerte auf, die in weiblichen Ratten bestimmt wurden (Abb. 5 und 6). Die proximale Region zwischen *D3Mit10* und *D3Rat189* auf dem Chromosom 3 der Ratte ist homolog zum murinen und humanen Chromosom 2. QTLs für Serumcholesterol, LDL-Cholesterol und HDL-Cholesterol in den homologen Regionen belegen, dass Gene die in der proximalen Region auf dem Chromosom 3 liegen, in der Entwicklung von Dyslipidämie, einer Facette des MetS, involviert sind [64-66]. Zudem untermauern die phänotypischen Daten und die Ergebnisse weiterer Studien den Cholesterol-QTL *Q3MS1*, der in der proximalen Region auf dem Chromosom 3 der Ratte liegt [39, 40].

Des Weiteren befindet sich in der kongenen Region in DA.5W-Ratten ein QTL für Serumcholesterol (*Scl20*), der zu den erhöhten Gesamtcholesterolwerten in DA.5W-Weibchen passt [67]. Erwähnenswert ist auch ein QTL für verschiedene Facetten des MetS wie Insulin-, Leptin- oder Triglyceridlevel, den Seidelmann et al. in einer Kreuzung zwischen B6 und PERA Mäusen in der homologen murinen Chromosomenregion kartiert haben [68]. Da die DA.5W-Ratten im Vergleich zu DA keine veränderte Körpermasse besitzen, konnte der QTL für BMI und Körpermasse *Q5MS1* an Hand der phänotypischen Charakterisierung nicht belegt werden.

In der Region zwischen *D10Mgh2* und *D10Rat4* auf dem Chromosom 10 der Ratte müssen Gene liegen, die die Leptin- und Insulinwerte sowie Gesamtcholesterol- und HDL-Cholesterollevel beeinflussen, wie aus den phänotypischen Daten ableitbar ist [Abb. 4-6]. Asahina et al. entdeckten in ihrer Studie mit F2-Nachkommen einer Kreuzung von ExHC- (exogenously hypercholesterolemic) und BN- (Brown-Norway) Ratten einen Serumcholesterol-QTL (*Scl47*), der vor der kongenen WOKW-Region auf dem Chromosom 10 liegt [69]. Sie konnten in der Arbeit ebenfalls einen für Weibchen-spezifischen Serumcholesterol-QTL auf dem Chromosom 5 lokalisieren (*Scl44*), der mit den vorliegenden Befunden in DA.5W-Ratten übereinstimmt. Auch der in der Arbeit von Klöting et al. beschriebene Cholesterol-QTL (*Q10MS1*) grenzt an die kongene WOKW-Region auf dem Chromosom 10 (Abb. 2), [39, 40]. Des Weiteren befindet sich *Socs3* in der Region, ein Gen das mit Leptinresistenz in Verbindung gebracht wird und zudem in der Human Obesity Gene Map als Kandidatengen für Obesitas aufgeführt wird [70, 71].

Interessanterweise haben DA.10W-Ratten keinen erhöhten AI, obwohl sie im Vergleich zu DA hyperleptinämisch sind.

Auch Gene in der WOKW-spezifischen Region auf dem Chromosom 16 zwischen *D16Rat88* und *D16Wox7* beeinflussen Faktoren des MetS. An Hand der phänotypischen Ergebnisse der DA.16W-Ratten kann geschlussfolgert werden, dass in diesen Chromosomenbereich ein Serumleptin-QTL für beide Geschlechter sowie für weibliche Ratten spezifische QTLs für den AI und Insulinlevel und ein für männliche Ratten spezifischer Triglycerid- und LDL-QTL liegen könnten. Unterstützt wird diese These durch beschriebene QTLs für Hyperinsulinämie, Leptin und Adipositas, die in den homologen Regionen auf den murinen Chromosomen 8 und 14 kartiert worden sind [72-75].

Der Phänotyp der hier generierten und charakterisierten kongenen Linien macht deutlich, dass Gene auf den Chromosomen 3, 5, 10 und 16 der Ratte, teilweise in Abhängigkeit vom

Geschlecht, die Entwicklung von Facetten des MetS beeinflussen müssen. Aus diesem Grund wurde die Genexpression mögliche Kandidatengene untersucht. Des Weiteren belegen die unterschiedlichen chromosomalen Regionen die Polygenität des MetS in WOKW-Ratten.

4.2. Gene auf dem Chromosom 5 beeinflussen die Expression von *Pparg* und *Adipoq* im Fettgewebe

Adipokine gelten als Biomarker des MetS, deren Expression und Sekretion in Patienten mit dieser Krankheit oder mit einzelnen Facetten des MetS verändert ist.
Auch die generierten kongenen Linien entwickeln Facetten des MetS, wie an Hand der phänotypischen Charakteristika belegt ist, aber nur DA.5W zeigt ein verändertes Expressionsmuster einiger Adipokine im Fettgewebe (Abb. 7).
PPARγ, der Hauptregulator der Fettzellfunktion, induziert die Expression von Genen, die die Aufnahme von Fettsäuren und die Triglyzeridsynthese fördern und die Insulinsensitiviät unterstützen [76]. Es existieren zwei PPARγ Isoformen (γ1 und γ2), die durch alternatives Spleißen und durch verschiedene Transkriptionsstartstellen gebildet werden. Während PPARγ2 spezifisch für das Fettgewebe ist, werden beide Isoformen im Muskel expremiert [77]. Die mRNA-Expression von *Pparg* wird sowohl im subkutanen als auch im epididymalen Fettgewebe von DA.5W signifikant höher expremiert als in DA-Ratten. Da *Pparg* auf dem Chromosom 4q42 der Ratte kartiert, müssen WOKW-spezifische Gene in dem kongenen Bereich auf dem Chromosom 5 die *Pparg*-Expression beeinflussen. Einige Regulatoren der *Pparg*-Transkription sind bekannt. Während der Adipogenese regulieren C/EBPs (CCAAT/enhancer binding protein), ADD1/SREBP1 (Sterol regulatory element binding transcription factor 1) und E2Fs die *Pparg*-Expression [78]. Außerdem wird PPARγ durch Prostaglandinderivate, oxidierte Linolensäuren und durch Thiazolidinedione, eine Gruppe Antidiabetika, aktiviert [79]. Ferner konnten Armoni et al. mit Promotor-Assays zeigen, dass sowohl die Transkription von PPARγ1 als auch von PPARγ2 durch FOXO1(forkhead box O1) repremiert wird [77].
Adiponectin, ein Adipositas-Marker, wird direkt von den Fettzellen gebildet. Erstaunlicherweise haben adipöse Menschen geringere Plasmaadiponectinkonzentrationen als Nicht-Fettleibige. Diese Aussage konnte auch in verschiedenen Nagermodellen bestätigt werden [80, 81]. Entsprechend dieser Feststellung ist die *Adipoq*-Expression in

adipösen WOKW-Ratten im subkutanen und epididymalen Fettgewebe sehr gering (Abb. 7). Im Gegensatz dazu kann in DA.3aW-Ratten kein Zusammenhang zwischen AI und der mRNA-Expression von *Adipoq* festgestellt werden.

Da DA.5W-Ratten neben einer erhöhten *Pparg*-Expression auch eine gesteigerte *Adipoq*-Expression im subkutanen Fettgewebe haben, könnte eine Verknüpfung zwischen diesen beiden Genen bestehen. Dafür spricht der Befund von Ajuwon et. al, dass Adiponectin die mRNA-Expression von *Pparg2* in Schweine-Adipozyten erhöht [82]. Maeda et al. demonstrierten 2001, dass Thiazolidinedione die mRNA-Expression und Sekretion von Adiponectin verbessern. Aber sie vermuteten, dass diese PPARγ-Liganden die *Adipoq*-Transkription nicht durch direkte Promotorbindung aktivieren [83]. Vielmehr könnte über eine ligandenabhängige PPARγ-Aktivierung die Transkription von *Adipoq* erhöht werden [84].

Vorstellbar ist auch, dass Gene in dem Bereich zwischen *D5Mgh6* und *D5Mit5* auf dem Chromosom 5 die *Adipoq* mRNA-Expression beeinflussen. Wie auch für Pparγ auf dem Chromosom 4, könnte eine direkte Wechselwirkung zwischen WOKW-spezifischen Genen in dem kongenen Bereich auf dem Chromosom 5 und Adiponectin auf dem Chromosom 11q23 bestehen. Über eine Protein-DNA-Interaktion könnte die *Pparg* bzw. *Adipoq* mRNA-Expression verändert werden. Möglich ist auch ein Einfluss WOKW-spezifischer Gene innerhalb des kongenen Chromosoms 5 auf den Signaltransduktionsweg, was zu einer veränderten Expression beider Gene führt.

An Hand der Expressionsdaten kann ausgeschlossen werden, dass Gene in den kongenen Regionen auf dem Chromosomen 3, 10 und 16 zu einer veränderten mRNA-Expression von *Pparg* und *Adipoq* führen.

Die erhöhte *Retn*-Expression in WOKW-Ratten im subkutanen Fett passt zu der Tatsache, dass Resistin im Fett von adipösen Menschen erhöht ist [85]. Da auch DA.3aW-Ratten einen erhöhten Adipositas Index haben, aber *Retn* im Fettgewebe nicht verändert expremieren, scheinen WOKW-spezifische Gene auf dem distalen Chromosom 3 die *Retn*-Expression nicht zu beeinflussen.

4.3. Gene auf den Chromosomen 5 und 16 könnten in der Regulation der *Glut4*-, *Lpl*- und *Fasn*-Expression im Fettgewebe involviert sein und somit die Insulinsensitivität beeinflussen

GLUT4 ist ein insulinabhängiger Glukosetransporter in Fett- und Muskelgewebe, der eine entscheidende Rolle in der Insulinsensitivität spielt. In Mäusen, in denen *Glut4* überexpremiert wurde, konnte eine gesteigerte Insulinantwort mit einem erhöhten Glukoseverbrauch beobachtet werden. Des Weiteren führt eine Insulinresistenz in Patienten mit T2DM und Adipositas zu einer Reduktion der intrazellulären GLUT4-Konzentration in Adipozyten, was die insulinabhängige Glukoseaufnahme beeinträchtigt [86]. Die Funktion und Expression von GLUT4 wird auf mRNA- und Protein-Ebene reguliert. Dabei spielen freie Fettsäuren und PPARγ eine entscheidende Rolle. Freie Fettsäuren senken die GLUT4-Expression auf Proteinebene über einen noch unbekannten Post-Translationalen Prozess. Außerdem bindet PPARγ vermutlich an cis-Elemente im *Glut4*-Promotor in Abwesenheit von PPARγ-Liganden und bewirkt so eine Repression der *Glut4*-Expression. Binden Liganden an PPARγ wie z.B. Thiazolidinedione, löst sich PPARγ vom *Glut4*-Promotor und die *Glut4*-Expression wird aktiviert [86]. Auf Grund dessen ist es nicht verwunderlich, dass eine erhöhte PPARγ-Konzentration negativ mit der *Glut4*-Expression korreliert [86]. Interessanterweise ist in dieser Studie sowohl die *Pparg*- als auch die *Glut4*-Expression im subkutanen Fettgewebe in DA.5W-Ratten erhöht. Da aber im epididymalen Fettgewebe *Glut4* nicht höher expremiert wird jedoch aber *Pparg*, scheint es keinen direkten Zusammenhang in dieser kongenen Linie zwischen diesen beiden Genen hinsichtlich der Genexpression zu geben. Auch WOKW-Gene auf dem Chromosom 16 beeinflussen die *Glut4* mRNA-Expression sowohl im subkutanen als auch im epididymalen Fettgewebe, aber nicht die *Pparg*-Expression (Abb. 7 und 9).

In diesem Zusammenhang muss auch die signifikant höhere *Glut4*-Expression im Hypothalamus von WOKW-Ratten erwähnt werden (Abb. 18). Benomar et. al konnten einen Einfluss einer chronischen Leptin und Insulingabe auf neuronale SH-SY5-Zellen feststellen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wird aber in der Studie von Benomar et. al die *Glut4* mRNA-Expression durch Leptin- und Insulinüberschuss, den man mit dem Status einer Hyperleptinämie und Insulinämie gleichsetzen kann, gesenkt [87].

Neben PPARγ beeinflussen weitere Transkriptionsfaktoren die Expression von *Glut4*. Armoni et al. entwickelten ein Modell, wie FOXO1 die Insulinsensitivität in Adipozyten

regulieren könnte. FOXO1 repremiert die *Pparg*-Expression und aktiviert bzw. derepremiert direkt oder indirekt die *Glut4*-Expression [77, 86]. Daneben sind die Myocyte Enhancer Faktoren 2A und 2D (MEF2A, MEF2D) sowie MyoD (myogenic differentiation 1) in der Transkriptionsregulation von *Glut4* beteiligt. Weiterhin könnten u.a. die Protein-Kinase AMPK, der Transkriptionsfaktor KLF15 (Kruppel-like factor 15), NF1 (neurofibromin 1) sowie das CCAAT/ Enhancer-Binding Protein alpha (C/EBPα) eine wichtige Rolle in der Regulation spielen [86, 88, 89]. Da diese genannten Regulatoren nicht in den kongenen Bereichen auf den Chromosomen 5 und 16 der Ratte lokalisiert sind, müssen andere Gene zwischen *D5Mgh6* und *D5Mit5* sowie *D16Rat88* und *D16Mgh1* in den Regulationsprozess eingreifen.

In der vorliegenden Arbeit wurde *Cip98*, das in der kongenen WOKW-Region auf dem Chromosom 5 lokalisiert ist, als mögliches Kandidatengen untersucht. Yap et al. entdeckten 2003, dass CIP98 mit der Calmodulin-abhängigen Serin Kinase CASK interagiert und verbreitet im Zentralen Nervensystem expremiert wird [90]. Interessanterweise entdeckten Wang et al., dass CASK in den Insulin-Signalweg eingreifen könnte. Sie beobachteten, dass CASK einen Komplex mit zwei Phosphotyrosin Proteinen in Abhängigkeit von Insulin bildet. Außerdem bewirkte Insulin einen Rückgang in der Lokalisation von CASK im Zellkern [91]. In dieser Studie wurde die Expression von *Cip98* sowohl im subkutanen als auch im epididymalen Fettgewebe nachgewiesen. Im epididymalen Fettgewebe kann eine erhöhte *Cip98*-Expression in DA.5W-Ratten beobachtet werden (Abb. 17). Es wurde aber kein SNP in der CDS von *Cip98* dokumentiert. Somit ist eine veränderte direkte Interaktion von *Cip98* und dem genetischen DA-Background in DA.5W-Ratten eigentlich ausgeschlossen und andere Gene aus dem kongenen WOKW-Bereich auf dem Chromosom 5 müssen die *Glut4*-Expression beeinflussen.

Ein interessantes Enzym, dessen veränderte Aktivität einen pathogenen Einfluss auf zahlreiche Erkrankungen wie Alzheimer, Adipositas, Diabetes und auch Insulinresistenz hat, ist die Lipoprotein Lipase (LPL). LPL hydrolysiert Triacylglcerolbestandteile von zirkulierenden Chylomykronen und VLDLs. Dadurch werden freie Fettsäuren und 2-Monoacylglycerol für die Verstoffwechslung im Gewebe bereitgestellt [92]. *Lpl* ist in dem kongenen WOKW-Bereich zwischen *D16Rat88* und *D16Wox7* auf dem Chromosom 16 lokalisiert und könnte auch ein mögliches Kandidatengen für die Entstehung einzelner Facetten des MetS sein [16, 24]. In der vorliegenden Arbeit wird diese These durch eine erhöhte Expression in DA.16W Ratten unterstützt, der ein oder mehrere SNPs im *Lpl*-Gen

zugrunde liegen könnten. Dazu kommt, dass auch die DA.16W-Rattenlinie genau wie Probanden mit der Asn291→Ser Substitution, eine Hypertryglyceridämie (Abb. 5) entwickelt [24]. Des Weiteren ist die *Lpl*-Expression ebenfalls in DA.5W erhöht. Hierbei müssen allerdings andere Faktoren involviert sein, da *Lpl* wie schon beschrieben in der kongenen Region auf dem Chromosom 16 kartiert ist. Möglicherweise könnte Adiponectin einen Einfluss haben, da von Eynatten et al. feststellten, dass Probanden mit geringem Adiponectinspiegel eine geringe LPL-Aktivität besitzen [93]. Außerdem wurde in einem Maus-Modell mit *Adipoq*-Überexpression sowohl eine erhöhte *Pparg2*-Expression als auch eine erhöhte LPL-Aktivität in weiblichen Mäusen entdeckt [94]. Da DA.5W-Ratten eine erhöhte *Adipoq*-Expression aufweisen, könnte diese positiv mit der *Lpl*-Expression korrelieren. Vorstellbar ist aber auch wieder eine Wechselwirkung mit Genen auf dem Chromosom 5 zwischen *D5Mgh6* und *D5Mit5* und der Lipoprotein Lipase auf dem Chromosom 16.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass WOKW-spezifische Gene auf dem Chromosom 16 die *Fasn*-Expression im subkutanen und epididymalen Fettgewebe beeinflussen. Somit könnte FASN, dass die Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA zu langkettigen Fettsäuren im Cytoplasma katalysiert, in der Entstehung von Facetten des MetS involviert sein. Dafür spricht, dass Loftus et al. sowie Kumar et al. durch Inhibition von FASN in Mäusen das Körpergewicht und die Nahrungsaufnahme reduzieren konnten [95, 96] und das Enzym damit eine Rolle in der Entstehung von Adipositas spielen könnte. Des Weiteren wurde ein Val1483→Ile Polymorphismus (eine Valin→Isoleucin Substitution) in FASN entdeckt, der eng mit Adipositas und Insulinsensitivität assoziiert ist [97, 98].

Da DA.16W-Ratten eine erhöhte Serumleptinkonzentration besitzen, könnte dieses Hormon möglicherweise die *Fasn*-Expression aktivieren, wie auch in der Arbeit von Berndt et al. diskutiert wird. In dieser Hinsicht sind auch die Expressionsdaten der Leber interessant, da dort Fasn in WOKW- sowie DA.3aW-Ratten höher expremiert wird, was auf einen Einfluss von Genen der distalen Region auf dem Chromosom 3 auf die *Fasn*-Expression schließen lässt (Abb. 19). Allerdings kann in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, dass *Fasn* im Fettgewebe von adipösen Probanden stärker expremiert wird als in dünnen, da WOKW- und DA.3aW-Ratten keine erhöhte *Fasn*-Expression aufweisen. Außerdem wird *Fasn* hier nicht im epididymalen Fett, welches ein Vertreter des viszeralen Fettgewebes darstellt, stärker expremiert als im subkutanen, wie in der Studie

von Berndt et al. beobachtet wurde [99]. Allerdings werteten Berndt et. al humane Daten aus und somit ist unklar, ob die hier vorliegenden Ergebnisse vergleichbar sind.
Zusammenfassend ist feststellbar, dass in dem mit WOKW ausgetauschten Bereichen auf den Chromosomen 5 und 16 Gene liegen müssen, die in die *Glut4*-, *Lpl*- und *Fasn*-Expression im Fettgewebe involviert sind und damit eine entscheidenden Einfluss auf die Insulinsensitivität sowie Entwicklung von Adipositas haben.

4.4. Kandidatengene in der kongenen Region auf dem distalen Chromosom 3

Auf dem distalen Chromosom 3 der Ratte müssen Gene liegen, die in der Entwicklung von Adipositas mit Hyprleptinämie und Dyslipidämie involviert sind, wie aus den phänotypischen Daten von DA.3aW hervorgeht. Die Homologien zum murinen Chromosom 2 und humanen Chromosom 20, besonders zum Abschnitt 20q13.1, untermauern den Einfluss der distalen Region auf die Entstehung einzelner Facetten des MetS. Die Bedeutung dieser chromosomalen Region wird dadurch unterstützt, dass viele Gene innerhalb dieses Bereiches in der Human Obesity Gene Map als Kandidatengene für Adipositas gelten [71]. Durch Analyse der mRNA-Expression wurden mögliche Kandidatengene für die Entstehung der metabolischen Abweichungen in DA.3aW untersucht.
Obwohl DA.3aW einen erhöhten AI hat und somit mehr Fettmasse als DA besitzt, kann im subkutanen Fettgewebe keine abweichende Expression der untersuchten Gene festgestellt werden. Und auch im epididymalen Fettgewebe ist nur die Expression von drei untersuchten Genen (*Dlgap4*, *Snta1*, *Pofut1*) in DA.3aW different von den Parentalstämmen (Abb. 15). Zwei der drei Gene, *Dlgap4* und *Snta1*, werden eigentlich von der Funktion her eher im Gehirn als im Fettgewebe vermutet. Allerdings hat das Zentrale Nervensystem (ZNS) sowohl parasympatische als auch sympatische Verbindungen mit dem Fettgewebe, über die viele Funktionen des Fettgewebes reguliert werden, weshalb die Expression dieser Gene untersucht wurde. Ergänzend kommt hinzu, dass umgekehrt viele Adipokine auf das ZNS wirken und so das Essverhalten, die Energie-Balance und die Hormonsensitivität beeinflussen [100].
DLGAP4 (Discs, large homolog-associated protein 4), auch unter SAPAP4 bekannt, ist an der Synaptogenese beteiligt [101]. *Snta1* codiert für Syntrophin alpha 1 und gehört zur Familie der Dystrophin-assoziierten Proteine. Die Dystrophin-assoziierten Proteine

befinden sich in der Neuromuskulären Endplatte, sind aber auch im Gehirn und in der Retina lokalisiert. Deshalb könnte SNTA1 auch in der Synaptogenese mitwirken [102]. Außerdem interagiert Syntrophin alpha 1 mit ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) und könnte an der apoA-I-vermittelten Cholesterol-Freisetzung im Gehirn beteiligt sein [103]. Für eine Beteiligung von *Snta1* an der Entstehung des MetS spricht auch die differente mRNA-Expression im Hypothalamus (Abb. 18), wenn auch kein SNP in der CDS gefunden wurde. Neben *Snta1* wird *Pofut1* ebenfalls im Hypothalamus in DA.3aW signifikant verschieden im Vergleich zu DA expremiert.

POFUT1 (Protein O-Focusyltransferase 1) überträgt L-Fukose an EGF (epidermal growth factor)-like Repeats und ist im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert. Durch die Fucosylierung der EGF-like Repeats wird die Interaktion des Notch-Rezeptors mit seinen Liganden ermöglicht. Der Notch-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Embryogenese und auch in der Adipogenese [104,105].

Loriol et al. konnten die *Pofut1*-Expression in 13 verschiedenen bovinen Geweben u.a. in Leber, Pankreas, Gehirn beobachten jedoch nicht im Fettgewebe [104]. Auch Wang et al. haben *Pofut1* in ihren Northern Blot-Analysen nicht im humanen Fettgewebe nachgewiesen [106]. Somit kann die *Pofut1*-Expression erstmals neben Leber und Hypothalamus in der vorliegenden Arbeit auch im epididymalen sowie im subkutanen Fettgewebe belegt werden (Abb. 15, 18, 19). Obwohl keine Sequenzunterschiede in der *Pofut1*-CDS zwischen DA, DA.3aW und WOKW festgestellt worden sind, machen dennoch die Expressionsergebnisse im epididymalen Fettgewebe, Leber und Hypothalamus *Pofut1* als mögliches Kandidatengen interessant.

Aus den Expressionsergebnissen geht hervor, dass *Pltp* von Bedeutung für die Entstehung einzelner Facetten des MetS in DA.3aW-Ratten sein könnte (Abb. 19). Außerdem liegt es in der homologen Region 20q13.1 auf dem humanen Chromosom 20, die wie schon beschrieben sehr interessant für die Aufklärung der Genetik des MetS ist. Die Rolle von *Pltp* als mögliches Kandidatengen wird durch die Tatsache belegt, dass die PLTP-Aktivität in Patienten mit T2DM und IR erhöht ist [107]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass SNPs in Intron 1 und Intron 12 u.a. mit Adipositas und hohem BMI assoziiert sind [108]. Sowohl in dieser Studie als auch in der vorliegenden Arbeit konnten keine SNPs in den Exons von *Pltp* identifiziert werden.

4.4.1. *Pck1* als mögliches Kandidatengen

Pck1(PEPCK-C) codiert für die cytosolische Form der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese. *Pck1* wird am stärksten in der Leber, in der Nierencortex sowie im weißen und braunen Fettgewebe expremiert. Die Gewebsspezifität wird durch regulatorische Elemente im Promotor gegeben, an die gewebsspezifische Transkriptionsaktivatoren binden. Es befindet sich u. a. eine PPARγ2-Bindestelle im Promotor, die für die fettgewebsspezifische Expression benötigt wird. Die PCK1-Aktivität wird über die Transkriptionsrate kontrolliert, wobei Glucocorticoide und cAMP die *Pck1*-Expression erhöhen, während Insulin diese inhibiert [109].

Ein Insulinmangel und eine IR, wie in T1DM bzw. T2DM vorzufinden ist, führen zu einer erhöhten *Pck1*-Transkription, die mit einer uneingeschränkten Gluconeogenese in Leber und Niere verbunden ist. In T2DM hat Insulin seine inhibitorische Wirkung auf die Enzyme der Gluconeogenese verloren, wobei der Mechanismus dieser IR noch nicht aufgeklärt ist [110]

In dieser Arbeit wurde eine geringere *Pck1*-Expression in Leber und Niere von Ratten mit MetS bzw. mit Facetten des MetS festgestellt. Kontrovers zu den Befunden entwickeln transgene Hooded Wistar Ratten Facetten des MetS, obwohl sie *Pck1* in Leber und Niere überexpremieren und die regulatorische Wirkung von Insulin auf die *Pck1*-Transkription ausgeschaltet ist [111]. Auch in verschiedenen Tiermodellen für T2DM und Adipositas ist die *Pck1*-Transkription erhöht. So entwickeln transgene Mäuse, die *Pck1* in der Leber überexpremieren, eine Hyperglykämie und Hyperinsulinämie sowie eine Glucoseintoleranz [112, 113].

Es scheint so, dass in hyperinsulinämischen WOKW-Ratten und in kongenen DA.3aW-Ratten die regulatorische Insulinwirkung auf die *Pck1*-Transkription noch vorhanden ist und die Gluconeogenese nicht dereguliert wird. Das bedeutet, dass die Gluconeogeneserate in diesen Tieren nicht erhöht ist und somit keine übermäßige Glucose in der Leber produziert und ins Blut abgegeben wird. Vorstellbar ist aber auch eine geringere Gluconeogenese in WOKW in Folge der erhöhten Insulinkonzentration und der geringeren *Pck1*-Transkription.

In transgenen Mäusen führen sowohl eine Über- als auch eine Unterexpression von *Pck1* in Adipozyten zu Facetten des MetS. In Adipozyten findet keine Gluconeogenese statt, sondern PCK1 dient hier als Enzym der Glyceroneogenese. Dieser Stoffwechselweg dient der Synthese von Glycerol-3-Phosphat, ein Produkt für die TG-Synthese und unterstützt

die Aufrechterhaltung des Fettsäure-Zyklus. Hinzufügen muss man, dass die Glyceroneogenese auch in der Leber stattfindet.

Mäuse ohne fettgewebsspezifische PEPCK-C weisen durch fehlende Glyceroneogenese einen Mangel an TGs in Adipozyten auf. In Folge dessen entwickeln einige dieser Mäuse eine Lipodystrophie und sind hyperglykämisch [114]. Eine Überexpression führt zu adipösen, euglykämischen Mäusen mit normaler Insulinsensitivität auf Grund erhöhter Glyceroneogenese und TG-Synthese [115].

In dieser Arbeit konnte außerdem ein Nukleotidaustausch im Exon 8 von *Pck1* in DA.3aW-Ratten und dem chromosomalen Donorstamm WOKW festgestellt werden. Dieser C/T Polymorphismus an Position 4384 im Gen könnte mit Facetten des MetS korrelieren. Ratten die das C-Allel tragen, hätten somit ein erhöhtes Risiko eine Adipositas mit Hyperinsulinämie sowie Hyperleptinämie zu entwickeln. Des Weiteren führt der Nukleotidaustausch von T→C in WOKW- sowie DA.3aW-Ratten zu dem Verlust einer NIP (Nuclear inhibitory protein) -Bindestelle in *Pck1*, was aus der Analyse mit dem Bioinformatikprogramm TESS hervorgeht (Abb. 23). NIP wurde als Repressor der IL-3 (Interleukin 3) -Transkription identifiziert und besteht aus mehreren Proteinen. Der Proteinkomplex bindet im IL-3 Promotor und kontrolliert die gewebsspezifische Expression [116, 117]. Da sich hier die NIP-Bindestelle jedoch außerhalb des *Pck1*-Promotors befindet, ist ein Einfluss dieser Region auf die *Pck1*-Expression fragwürdig.

In einer Studie mit kaukasischen Typ 2 Diabetikern beschreiben Cao et al. 9 SNPs im *Pck1*-Gen. Davon drei im *Pck1*-Promotor und sechs in den Exons 3 und 6. Der SNP C/G an Position 671 führt zu einem AS-Austausch (Leu184Val), während die anderen SNPs in der CDS keinen Einfluss auf die AS-Sequenz haben [118]. Vor kurzem ist veröffentlicht worden, dass der Leu184Val Polymorphismus mit T2DM korreliert. Chinesen mit Val haben ein erhöhtes Risiko T2DM zu entwickeln [119].

Der Promotor SNP -232C→G (rs2071023) ist in einer Studie mit finnischen Probanden bestätigt worden [120] und ist mit einem erhöhten Risiko für T2DM assoziiert. Allerdings konnte der Zusammenhang zwischen diesem Promotor SNP und einem erhöhten Risiko an T2DM zu erkranken, in einer koreanischen Studie sowie mit dänischen und deutschen Patienten nicht belegt werden [121-123]. Diese genetischen Differenzen in verschiedenen ethnischen Gruppen spiegeln den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entstehung von Krankheiten wider und zeigen die Schwierigkeit, einzelne Kandidatengene zu identifizieren.

Auf Grund dieser Befunde und der Tatsache, dass *Pck1* auf dem humanen Chromosom 20q13.31 neben einem Locus für T2DM liegt sowie der enzymatischen Funktion, ist *Pck1* ein mögliches Kandidatengen für die Entstehung von Facetten des MetS.

4.5. Kandidatengene auf dem Chromosom 10

Kongene DA.10W-Ratten sind phänotypisch durch eine Hyperinsulinämie sowie Hyperleptinämie ohne gleichzeitige Erhöhung des AI gekennzeichnet. Der kongene Abschnitt in DA.10W-Ratten ist homolog mit einer Region auf dem humanen Chromosom 17q24-25, die mit der Entwicklung von Adipositas in Verbindung gebracht wird [124, 125]. Im Rahmen der Genexpressionsanalysen fallen *Acox1*, *Galr2* sowie *Cygb* aufgrund der signifikanten Unterschiede auf (Abb. 16). Diese Gene liegen innerhalb der erwähnten Region in der Nähe von *Socs3*, das wie schon beschrieben in der Entstehung von Obesitas involviert sein könnte.

Acox1 codiert für die Acyl-Coenzym A Oxidase 1, ein Schlüsselenzym der β-Oxidation. Möglicherweise ist die Hyperleptinämie in DA.10W-Ratten mit der erhöhten *Acox1* mRNA-Expression im Fettgewebe assoziiert (Abb. 16). Dafür spricht, dass Leptin bekanntermaßen die β-Oxidation aktiviert [126]. Außerdem demonstrieren Prieur et al. in Mäusen den Einfluss von Leptin auf die Enzyme der Fettsäure-Oxidation. In den Versuchen mit ob/ob Mäusen wird die *Acox1*-Expression in der Leber, aber nicht im Skelettmuskel, nach Leptin-Injektion erhöht [127].

In Adipösen ist möglicherweise die Fettsäure-Oxidation beeinträchtigt, was zu einer erhöhter intrazellulären Lipidkonzentration führt. In Folge dessen kommt es zur ektopischen Fettakkumulation in der Leber, im Skelettmuskel sowie in den β-Zellen, die mit einer IR und T2DM assoziiert ist. Diese Hypothese konnte durch Versuche in Nagetieren bestätigt werden, in denen durch Inhibition der β-Oxidation die Lipidkonzentration anstieg [128]. Übereinstimmend mit dieser Annahme scheint ein Plus an Leptin in adipösen WOKW-Ratten die *Acox1*-Expression im Fettgewebe und somit den Fettsäure-Abbau nicht zu fördern (Abb. 16). Neben Leptin beeinflusst auch Adiponectin über Aktivierung der Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) positiv die β-Oxidation [126]. Der Fakt, dass WOKW-Ratten eine sehr geringe *Adipoq* mRNA-Expression aufweisen (Abb. 7), spricht auch für eine geringe β-Oxidation mit den daraus resultierenden Folgen in diesen an MetS erkrankten Ratten. In DA.10W-Ratten könnte der

Fettsäure-Abbau durch Aktivierung der Enzyme der β-Oxidation infolge der Hyperleptinämie bei normalem Adiponectin-Spiegel erhöht sein, weshalb diese Ratten keinen erhöhten AI entwickeln.

GALR2 ist einer der drei Rezeptoren, der die Galaninwirkung vermittelt. Aufgrund seiner Lokalisation im Gehirn wird ein Einfluss dieses Rezeptors u.a. auf das Fressverhalten, Wachstum, Lernen und Gedächtnis vermutet. Allerdings konnten Befunde mit *Galr2*-Defizienten Mäusen diese Annahme nicht bestätigen [129]. In der vorliegenden Studie kann die mRNA-Expression von *Galr2* im subkutanen sowie im epididymalen Fettgewebe von Ratten nachgewiesen werden. Yang et al. konnten die Expression von Galanin und den beiden Rezeptoren *Galr1* und *Galr2* an Hand von Dot Blot Analysen auch im humanen viszeralen Fettgewebe belegen und vermuten deshalb einen Einfluss von Galanin auf die Leptin-Expression und -Sekretion [130]. In einer daran anknüpfenden Studie wird durch intravenöse Galanin-Injektion die Leptin mRNA-Expression und Protein-Sekretion im Fettgewebe von Ratten sowie in 3T3-L1 Adipozyten gesenkt [131]. Außerdem demonstriert die Arbeitsgruppe, dass in Ratten nach 72-stündigem Hungern die Galanin-Expression um das 8-Fache im Fettgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe ansteigt und gleichzeitig die Leptin-Expression sinkt. An Hand dieser Befunde könnte spekuliert werden, dass in DA.10W-Ratten die Regulation der Leptin-Sekretion durch Galanin gestört ist, ausgehend von einer gleichzeitigen Erhöhung der *Galr2* und Galanin mRNA-Expression. Somit sind Galanin und der Galanin Rezeptor 2 eventuell in der Entstehung der Hyperleptinämie in DA.10W-Ratten involviert.

Auf Grund der gezeigten mRNA-Expressionsergebnisse stellen die beiden Gene *Acox1* sowie *Galr2* interessante Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen dar.

Erwähnt werden muss auch *Cygb* als mögliches Kandidatengen, da es in WOKW-Ratten signifikant höher expremiert wird und in DA.10W die Tendenz einer gesteigerten Expression zu erkennen ist. Cytoglobin scheint ein Tumor Suppressor Gen zu sein sowie vor oxidativen Stress zu schützen. In der Arbeit von Li et al. wird die *Cygb* mRNA-Expression in neuronalen Zellen durch Wasserstoffperoxid erhöht [132, 133]. In diesem Zusammenhang ist eine Studie von japanische Wissenschaftler von Interesse, die den Einfluss von oxidativen Stress auf die Entstehung des MetS in fettleibigen Menschen und Mäusen untersuchten und zu der Schlussfolgerung kamen, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ein wichtiger Einflussfaktor für die Ausbildung von Adipositas sind [134]. Denkbar wäre, dass in adipösen WOKW-Ratten auf Grund oxidativen Stresses vermehrt ROS gebildet werden, die die *Cygb* mRNA-Expression aktivieren. Eine Beziehung zwischen

Insulin bzw. Leptin und der *Cygb*-Expression ist noch nicht beschrieben, wäre aber auf Grund des Phänotyps der DA.10W- und WOKW-Ratten sowie der erhöhten mRNA-Expression dieses Gens vorstellbar.

4.6. Die Repin1-Proteinkonzentration ist abhängig von den TTT-Repeats in der 3'UTR

Repin1 (Ap4, RIP60) besteht aus 15 C_2H_2 Zinkfingern (ZFs), die in den drei Clustern Z1 (ZFs 1-5), Z2 (Zfs 6-8) und Z3 (Zfs 9-15) organisiert sind. Zwischen Z2 und Z3 befindet sich eine prolinreiche Region, die mit dem Cluster Z2 für die DNA-Bindung verantwortlich ist [26].

Repin1 befindet sich auf dem Chromosom 4 der Ratte an Position 76,6 Mb innerhalb eines QTLs für Serumtriglyceride, Gesamtcholesterol und Körpergewicht [27, 28]. In der vorliegenden Arbeit wurden immer zwei Repin1-Isoformen detektiert, was an Hand der Doppelbande im WB zu erkennen ist. Des Weiteren wurde eine altersabhängige Repin1-Proteinkonzentration mit einer Konzentrationszunahme über einen Zeitraum von 4 bis 30 Wo festgestellt (Abb. 24-26). Repin1 kommt in hoher Konzentration im epididymalen sowie subkutanen Fettgewebe vor. Klöting et al. konnten die Repin1-Expression außerdem im Blut und in der Leber belegen [29]. Außerdem ist Repin1 auch in der Milz, im Thymus, im Hypothalamus sowie im Großhirn vorhanden (nicht veröffentlichte Information von Klöting et al.), was eine weite Verbreitung dieses Proteins zeigt.

In der vorangehenden Arbeit von Klöting et al. wurde eine unterschiedliche Anzahl von TTT-Repeats in der 3'UTR von *Repin1* in verschiedenen Rattenstämmen gefunden. U. a. wurden in SHR 5, in DA 7, in BB/OK 9 und in WOKW 11 Repeats sequenziert. Korrelationen zwischen phänotypischen Veränderungen und der TTT-Repeatlänge zeigen, dass *Repin1* ein mögliches Kandidatengen für die Entstehung einzelner Facetten des MetS sein könnte [29].

Ausgehend davon, dass die Repeatanzahl von 7 bzw. 9 in Wilden Ratten als WT gelten, dann sind die 5 Repeats in SHR und 11 Repeats in WOKW Mutantenallele.

In der vorliegenden Arbeit ist sowohl im subkutanen als auch im epididymalen Fettgewebe eine Abhängigkeit der Repin1-Proteinkonzentration von der Repeatlänge zu erkennen. Die drei Rattenstämme BB.4W, BB.4S und WOKW haben in einem Alter von 30 Wochen eine höhere Repin1-Proteinkonzentration als DA-Ratten (Abb. 24 B, 25 B, 29 B, 30 B). DA-

Ratten können als Kontrolle angesehen werden, da sie mit 7 Repeats in der 3'UTR das WT-Allel tragen. In BB.4W liegt *Repin1* im kongenen WOKW-Bereich und umfasst folglich 11 Repeats, währenddessen dieses Gen in BB.4S im SHR spezifischen Bereich liegt und somit 5 Repeats enthält. Von den Ergebnissen ist abzuleiten, dass die Proteinkonzentration von Repin1 im Fettgewebe zunimmt, wenn die Anzahl der TTT-Repeats von 7 abweicht. Dafür spricht auch, dass DA.3aW-Ratten die das *Repin1* WT-Allel tragen, keine erhöhte Proteinkonzentration im Vergleich mit DA-Ratten besitzen (Abb. 27 B, 28 B).

Die 3'UTR eines Gens liegt downstream der CDS und beginnt hinter dem Translationsstop-Codon der mRNA und beeinhaltet regulatorische Nukleotidsequenzen, die neben dem Transport der mRNA aus dem Zellkern sowie ihrer Stabilität auch als Bindestellen für Proteine oder micro (mi) RNAs dienen. Dadurch kann die Translationseffizienz beeinflusst werden [135]. Vorstellbar für *Repin1* ist eine verbesserte Bindeaffinität von Proteinen im Fettgewebe, die die Translation steigern, wenn die Ratten Mutantenallele tragen und somit die Repeatlänge vom WT-Allel abweicht und die Nukleotidsequenz der 3'UTR entweder verkürzt oder verlängert wird.

Passend dazu zeigten Mbella et al. in ihrer Studie über die Amyloid precursor protein (APP) mRNA, dass das Einfügen von 8 Nukleotiden in die 3'UTR der kurzen APP-mRNA, deren Translationsrate steigerte. Dafür scheinen GG Nukleotide verantwortlich zu sein [136]. Weitere Arbeitsgruppen stellten fest, dass eine veränderte Nukleotidfolge in der 3'UTR die Entstehung von Krankheiten beeinflusst. Danckwardt et al. entdeckten eine G→A Mutation (G20210A) in der an die 3'UTR angrenzenden pre-mRNA Cleavage Site (CS) in der Prothrombin mRNA, die die Gefahr einer Thrombose erhöht. Dieser Nukleotidaustausch führt zu einer vermehrten Akkumulation der Prothrombin mRNA im Cytoplasma und steigert somit deren Translation. In der Studie haben Träger des A-Allels eine erhöhte mRNA-Expression, die mit der gesteigerten Proteinsynthese korreliert. Auch eine C→T Mutation (C20221T) in der Prothrombin mRNA, 11 Nukleotide von der CS entfernt, spiegelt das gleiche Bild wider [135, 137]. Interessanterweise wurden SNPs in der 3'UTR von Adipokinen definiert. Wang et al. identifizierten einen SNP (C→G) in der 3'UTR von *Adipor1* in kaukasischen und afroamerikanischen Probanden. Dabei haben Träger des C-Allels im Vergleich zu den Trägern des G-Allels eine gesteigerte *Adipor1*-Expression. In der Studie wurde auch festgestellt, dass innerhalb der afroamerikanischen Gruppe die *Adipor1* mRNA-Expression in Zelllinien diabetischer Probanden reduziert ist [138].

Die Arbeit von Pizzuti et. al ist ebenfalls von Bedeutung für die vorliegende Diskussion. Die Wissenschaftler identifizierten ATG-Repeats unterschiedlicher Länge (6, 7, 8 Repeats) in der 3'UTR von *Retn*. Außerdem entdeckten sie, dass die Träger des 6-Repeat-Allels ein geringeres Risiko haben, eine IR zu entwickeln. Sie stellten die Hypothese auf, dass diese Probanden auf Grund einer geringeren *Retn*-Expression und Resistin-Sekretion sensitiver auf Insulin reagieren [139]. In der Publikation von Klöting et al. ist ein Zusammenhang zwischen der Repeatlänge in der 3'UTR von *Repin1* und phenotypischen Merkmalen in verschiedenen Rattenstämmen beschrieben. Die Serumtriglyceridkonzentration nimmt mit der Länge der TTT-Repeats von 5 bis 11 zu, während die Körpermasse, Seruminsulin sowie Serumleptin, die Gesamtcholesterol-, HDL- und VLDL-Konzentration von 7 bis 11 Repeats ansteigt. Allerdings ist kein Zusammenhang zwischen der Repeatlänge in der 3'UTR von *Repin1* und der relativen *Repin1* mRNA-Expression im Fettgewebe, Blut und Leber festgestellt worden [29]. Auch in der vorliegenden Arbeit ist in WOKW-Ratten mit erhöhter Repin1-Proteinkonzentration keine gleichzeitig höhere *Repin1* mRNA-Expression zu erkennen (Abb.29, 30), was wiederum für eine erhöhte Bindeaffinität von Proteinen, die die Translationsrate erhöhen, spricht. Vorstellbar ist auch ein erhöhter Transport der Repin1 mRNA in das Cytoplasma oder eine verbesserte Stabilität der mRNA.

Da Repin1 ein Zinkfingerprotein ist, liegt die Vermutung nahe, dass es als Aktivator oder Repressor an die DNA bindet und so die Transkription von Zielgenen in zahlreichen Geweben beeinflusst. Vermutlich hat Repin1 keine Transaktivierungsdomäne und scheint deshalb kein Transkriptionsfaktor zu sein, könnte aber eine Funktion in der Origin Identifikation vor dem Zusammenbau des Pre-Initiationskomplexes der Replikation haben, was aus Ergebnissen mit Plasmid Assays ableitbar ist [26]. Zinkfingerproteine binden jedoch nicht nur an DNA, sondern auch an RNA sowie an RNA/DNA-Hybride und vermitteln Protein-Protein-Interaktionen, so dass Repin1 in eine Vielzahl zellulärer Prozesse eingreifen könnte.

Die vorliegende Studie demonstriert, dass eine vom WT-Allel abweichende Anzahl der TTT-Repeats in der 3'UTR von *Repin1* die Repin1-Proteinkonzentration sowohl im subkutanen als auch im epididymalen Fettgewebe verschiedener Rattenstämme erhöht. Die Korrelation der Repeatlänge mit verschiedenen phänotypischen Merkmalen macht *Repin1* als mögliches Kandidatengen für das MetS interessant. Dafür sprechen auch Mutationen in der 3'UTR von *Retn* und *Adipor1*, zwei Gene die als mögliche Kandidatengene der Krankheit gelten.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe kongener Rattenmodelle versucht, mögliche Kandidatengene für die Entstehung des MetS zu identifizieren. Als Basis dienten dafür Kreuzungen von WOKW-Ratten, die ein komplettes MetS entwickeln, mit gesunden DA-Ratten. Dadurch wurden kongene DA.WOKW-Ratten generiert, die den genetischen Hintergrund der DA-Ratte sowie einen kongenen WOKW-Bereich auf einen der Chromosomen 3, 5, 10 oder 16 tragen.
Die kongenen DA.WOKW-Ratten, die DA.3aW (Chr. 3; *D3Mgh5-D3Rat1*), DA.3bW (Chr. 3; *D3Mit10-D3Rat189*), DA.5W (Chr. 5; *D5Mgh6-D5Mit5*), DA.10W (Chr. 10; *D10Mgh2-D10Rat4*) und DA.16W (Chr. 16; *D16Rat88-D16Wox7*) genannt wurden, variieren genetisch hinsichtlich des kongenen Chromosomenstücks, sind aber ansonsten genetisch identisch mit der DA-Ratte.

Die longitudinale Charakterisierung zeigte, dass die kongenen Ratten Facetten des MetS entwickeln und somit Gene in den kongenen WOKW-Bereichen auf den Chromosomen 3, 5, 10 und 16 der Ratte den AI, die Körpermasse, die Seruminsulin- und Serumleptinwerte sowie die Serumlipide in Abhängigkeit des Chromosoms und des Geschlechts der Ratten beeinflussen.

Zur Identifikation möglicher Kandidatengene wurde die mRNA-Expression einzelner Gene, die innerhalb der kongenen Bereiche liegen, mittels qRT-PCR untersucht. Basierend auf der Tatsache, dass DA.3aW phänotypisch besonders von DA abweicht, lag der Fokus der Genexpressionsanalysen auf Genen, die innerhalb des kongenen Bereiches auf dem distalen Chromosom 3 (*D3Mgh5-D3Rat1*) kartieren. Interessanterweise konnte eine signifikant geringere mRNA-Expression von *Pck1* in Leber und Niere von DA.3aW sowie WOKW im Vergleich mit DA nachgewiesen werden. In der daran anknüpfenden Sequenzierung konnte ein SNP in der CDS von *Pck1* (4384T/C) dokumentiert werden. WOKW sowie DA.3aW, Ratten die ein komplettes bzw. Facetten des MetS entwickeln, sind Träger des C-Allels. Somit könnte dieser SNP das Risiko, an Facetten des MetS zu erkranken, in Ratten beeinflussen.
Obwohl DA.3aW mehr Fettmasse als DA besitzt, wurden im subkutanen Fettgewebe keine signifikanten Differenzen in der mRNA-Expression ausgesuchter Gene zwischen DA,

WOKW und DA.3aW gefunden. Auch im epididymalen Fettgewebe war von den hier untersuchten Genen nur die Expression von *Snta1*, *Pofut1* und *Dlgap4* signifikant zwischen DA.3aW und DA verschieden, drei Gene die bis dato nicht im Zusammenhang mit dem MetS erwähnt wurden. Da das Expressionsmuster von *Snta1* und *Pofut1* im epididymalen Fettgewebe und Hypothalamus von WOKW-Ratten ähnlich dem der DA.3AW-Ratten war, sind diese beiden Gene mögliche Kandidaten für die Entstehung des MetS in WOKW. Auch *Pltp* könnte auf Grund der signifikant geringeren Expression in der Leber von DA.3aW und WOKW ein mögliches Kandidatengen sein. Allerdings wurden keine SNPs in der CDS von *Snta1*, *Pofut1* sowie *Pltp* identifiziert.

Auch die auf dem Chromosom 10 liegenden Gene *Acox1*, *Galr2* und *Cygb* könnten auf Grund der Expressionsergebnisse in der Entstehung von Hyperleptinämie und Hyperinsulinämie in DA.10W bzw. WOKW involviert sein.

Des Weiteren wurde mittels Genexpressionsanalyse festgestellt, dass Gene innerhalb des kongenen Bereiches auf dem Chromosom 5 die Expression von *Pparg* und *Adipoq* im Fettgewebe beeinflussen, da die Expression dieser Adipokine in DA.5W-Ratten signifikant erhöht ist im Vergleich mit DA. Außerdem müssen Gene in den kongenen Regionen auf den Chromosomen 5 und 16 für eine veränderte Expression von *Fasn*, *Glut4* und *Lpl* verantwortlich sein.

Zum Schluss konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl von TTT-Repeats in der 3'UTR von *Repin1* und der Proteinmenge nachgewiesen werden. Weicht die Anzahl der TTT-Repeats vom WT-Allel ab, dann ist die Repin1-Konzentration im subkutanen sowie epididymalen Fettgewebe verschiedener Rattenstämme erhöht.

6. Literatur

1. **Terán-García M, and Bouchard C.** Genetics of the metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 89 – 114, 2007. Review
2. **Alberti KG, Zimmet P, and Shaw J.** Metabolic Syndrome-a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med.* 23: 469 – 480, 2006.
3. **Alberti KG, and Zimmet PZ.** Definiton, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* 15: 539 – 553, 1998.
4. **National Cholesterol Education Program.** Executive summary of the third report of the NCEP expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treat panel III). *JAMA* 285: 2486 – 2497, 2002.
5. **Hanefeld M.** Metabolisches Syndrom – Quo vadis et cui bono? The metabolic syndrome: future perspectives and resulting benefits. *Dtsch Med Wochenschr* 131: 236 – 239, 2006.
6. **Moller DE, and Kaufmann KD.** Metabolic syndrome: A clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med* 56: 45 – 62, 2005.
7. **Huang TT, Ball GD, and Franks PW.** Metabolic syndrome in youth: current issues and challenges. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 13 – 22, 2007. Review
8. **Laclaustra M, Corella D, and Ordovas JM.** Metabolic syndrome pathophysiology: The role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17: 125 – 139, 2007. Review
9. **Fulop T, Tessier D, and Carpentier A.** The metabolic syndrome. *Patho Biol* 54: 375 – 386, 2006.
10. **Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, and Häring H-U.** Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistence. *Endocr Rev* 21: 585 – 618, 2000.
11. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, and Matsuzawa Y.** Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 79 – 83, 1999.

12. **Okamoto Y, Kihara S, Funashi T, Matsuzawa Y, and Libby P.** Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clinical Science* 110: 267 – 278, 2006. Review

13. **Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, and Lazer MA.** The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 292 – 293, 2001.

14. **Arner P.** Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19: 471 – 482, 2005.

15. **Després J-P and Lemieux I.** Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444: 881 – 887, 2006. Review

16. **Groop L.** Genetics of metabolic syndrome. *Br J Nutr* 83: 39 – 48, 2000.

17. **Kyriakou T, Collins LJ, Spencer-Jones NJ, Malcolm C, Wang X, Snieder H, Swaminathan R, Burling KA, Hart DJ, Spector TD, and O`Dell SD.** Adiponectin gene ADIPOQ SNP associations with serum adiponectin in two female populations and effects of SNPs on promoter activity. *J Hum Genet* 53: 718 – 727, 2008.

18. **Bouatia-Naji N, Meyre D, Lobbens S, Séron K, Fumeron F, Balkau B, Heude B, Jouret B, Scherer PE, Dina C, Weill J, and Froguel P.** ACDC/Adiponectin polymorphisms are associated with severe childhood and adult obesity. *Diabetes* 55: 545 – 550, 2006.

19. **Vasseur F, Helbecque N, Lobbens S, Vasseur-Delannoy V, Dina C, Clément K, Boutin P, Kadowaki T, Scherer PE, and Froguel P.** Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role of ACDC in diabesity. *Diabetologia* 48: 892 – 899, 2005.

20. **Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, Berg AH, Warram JH, Scherer PE, Trischitta V, and Doria A.** A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance sindrome. *Diabetes* 52: 2306 – 2312, 2002.

21. **Vozarova de Courten B, Hanson RL, Funahashi T, Lindsay RS, Matsuzawa Y, Tanaka S, Thameem F, Gruber JD, Froguel P, and Wolford JK.** Common polymorphisms in the adiponectin gene ACDC are not associated with diabetes in Pima Indians. *Diabetes* 54: 284 – 289, 2005.

22. **Filippi E, Sentinelli F, Trischitta V, Romeo S, Arca M, Leonetti F, Di Mario U, and Baroni MG.** Association of the human adiponectin gene and insulin resistance. *Eur J Hum Genet* 12: 199 – 205, 2004.

23. **Paracchini V, Pedotti P, and Taioli E.** Genetics of leptin and obesità: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 162: 101 – 114, 2005. Review

24. **Hu Y, Liu W, Huang R, and Zhang X.** A systematic review and meta-analysis of the relationship between lipoprotein lipase Asn291Ser variant and diseases. *J Lipid Res* 47: 1908 – 1914, 2006. Review

25. **Rosmond R.** The glucocorticoid receptor gene and its association to metabolic syndrome. *Obes Res* 10: 1078 – 1086, 2002. Review

26. **Houchens CR, Montigny W, Zeltser L, Dailey L, Gilbert JM, and Heintz NH.** The *dhfr* oriβ-binding protein RIP60 contains 15 zinc fingers: DNA binding and looping by the central three fingers and an associated praline-rich region. *Nucleic Acids Res* 28: 570 – 581, 2000.

27. **Kovács P, and Klöting I.** Mapping of quantitative trait loci for body weight on chromosome 1 and 4 in the rat. *Biochem Mol Biol Int* 44: 399 – 405, 1998.

28. **Kovács P, and Klöting I.** Quantitative trait loci on chromosomes 1 and 4 affect l ipid phenotypes in the rat. *Arch Biochem Biophys* 354: 139 – 143, 1998.

29. **Klöting N, Wilke B, and Klöting I.** Triplet repeat in the Repin1 3`-untranslated region on rat chromosome 4 correlates with facets of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab Res Rev* 23: 406 – 410, 2007.

30. **Barker DJ.** The Wellcome Foundation lecture, 1994. The fetal origins of adult disease. *Proc R Soc B* 262: 37 – 43, 1995.

31. **Levin BE.** Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1107 – 1121, 2006. Review

32. **Dahlhoff C, Fürst RW, Ruhling K, Sedlmeier E-M, and Bader BL.** Epigenetik und Ernährung. *Ernährung-Wissenschaft und Praxis* 2: 116 – 124, 2008.

33. **Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, and Spencer TE.** Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr* 134: 2169 – 2172, 2004. Review

34. **Kovács P, Voigt B, Berg S, Vogt L, and Klöting I.** WOK.1W rats. A potential animal model of the insulin resistence syndrome. Ann N Y Acad Sci 827: 94 – 9, 1997.

35. **van den Brandt J, Kovács P, and Klöting I.** Features of the metabolic syndrome in the spontaneously hypertriglyceridemic Wistar Ottawa Karlsburg W (RT1u Haplotype) rat. *Metabolism* 49: 1140 – 4, 2000.

36. **van den Brandt J, Kovács P, and Klöting I.** Metabolic features in disease-resistent as well as in spontaneously hypertensive rats and newly established obese Wistar Ottawa Karlsburg inbred rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 1618 – 22, 2000.

37. **van den Brandt J**, **Kovács P, and Klöting I.** Metabolic syndrome and aging in Wistar Ottawa Karlsburg W rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 573 – 6, 2002.

38. **Barton NH, and Keightley PD.** Understanding quantitative genetic variation. *Nat Rev Genet* 3: 11 – 21, 2002. Review

39. **Kovács P, van den Brandt J, and Klöting I.** Genetic dissection of the syndrome X in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 660 – 5, 2000.

40. **Klöting I, Kovács P, van den Brandt J.** Sex-specific and sex-independent quantitative trait loci for facets of the metabolic syndrome in WOKW rats. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 150 – 6, 2001.

41. **Moran TH, and Bi S.** Hyperphagia and obesity in OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1211 – 1218, 2006. Review

42. **Gilbert M**, **Magnan C**, **Turban S**, **André J**, **and Guerre-Millo M**. Leptin receptor-deficient obese Zucker rats reduce their food intake in response to a systemic supply of calories from glucose. *Diabetes* 52: 277 – 282, 2003.

43. **Kurtz TW**, **Morris RC, and Pershadsingh HA**. The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension* 13: 896 – 901, 1989.

44. **Klöting N, Wilke B, and Klöting I.** Alleles on rat chromosome 4 (D4Got41-Fabp1/Tacr1) regulate subphenotypes of obesity. Obes Res 13: 589 – 595, 2005.

45. **Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis, T.** Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. *Cold Spring Habour Laboratory Press, New York,* 1989.

46. **Klöting I, Voigt B, Vogt L.** 47 polymorphic microsatellite loci in different inbred rat strains. *J Exp Anim Sci* 37: 42 – 47, 1995.

47. **Klöting N, Klöting I.** Genetic variation in the multifunctional transcription factor Yy1 and type 1 diabetes mellitus in the BB rat. *Mol Genet Metab* 82: 255 – 259, 2004.

48. **Cali AM, and Caprio S.** Obesity in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 31 – 36, 2008. Review

49. **Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, Hayman L, Lustig RH, McCrindle B, and Mietus-Snyder ML.** Progress and challenges in metabolic syndrome in children and adolescents: a scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 119: 628 – 647, 2009. Review

50. **Pape D, Schwarz R, and Gillessen H.** Mit Beiträgen von Uhlenbruck G und Mader A. Gesund - Vital- Schlank: Fettverbrennung, der Königsweg zur dauerhaften Fitness; raus aus der Insulinfalle. Köln: *Deutscher Ärzte-Verlag* , 2001, S.117 – 119.

51. **Edwards KL, Hutter CM, Wan JY, Kim H, and Monks SA.** Genome-wide linkage scan for the metabolic syndrome: the GENNID study. *Obesity* 16: 1596 – 1601, 2008.

52. **Loos RJ**, **Katzmarzyk PT**, **Rao DC**, **Rice T**, **Leon AS**, **Skinner JS**, **Wilmore JH**, **Rankinen T**, **and Bouchard C**. Genome-wide linkage scan for the metabolic syndrome in the HERITAGE Family Study. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5935 – 5943, 2003.

53. **Hoffmann K**, **Mattheisen M**, **Dahm S**, **Nürnberg P**, **Roe C**, **Johnson J**, **Cox NJ**, **Wichmann HE**, **Wienker TF**, **Schulze J**, **Schwarz PE**, **and Lindner TH**. A German genome-wide linkage scan for type 2 diabetes supports the existence of a metabolic syndrome locus on chromosome 1p36.13 and a type 2 diabetes locus on chromosome 16p12.2. *Diabetologia* 50: 1418 – 1422, 2007.

54. **Deng HW, Deng H, Liu YJ, Liu YZ, Xu FH, Shen H, Conway T, Li JL, Huang QY, Davies KM, andRecker RR.** A genomewide linkage scan for quantitative-trait loci for obesity phenotypes. *Am J Hum Genet* 70: 1138–1151, 2002.

55. **Hunt SC, Abkevich V, Hensel CH, Gutin A, Neff CD, Russell DL, Tran T, Hong X, Jammulapati S, Riley R, Weaver-Feldhaus J, Macalma T, Richards MM, Gress R, Francis M, Thomas A, Frech GC, Adams TD, Shattuck D, and Stone S.** Linkage of body mass index to chromosome 20 in Utah pedigrees. *Hum Genet* 109: 279 – 285, 2001.

56. **Lee JH, Reed DR, Li WD, Xu W, Joo EJ, Kilker RL, Nanthakumar E, North M, Sakul H, Bell C, and Price RA.** Genome scan for human obesity and linkage to markers in 20q13. *Am J Hum Genet* 64: 196 – 20, 1999.

57. **Perusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Snyder E, Sands J, and Bouchard C.** The human obesity gene map: the 2000 update. *Obes Res* 9:135 – 169, 2001.

58. **Dong C, Wang S, Li WD, Li D, Zhao H, and Price RA.** Interacting genetic loci on chromosomes 20 and 10 influence extreme human obesity. *Am J Hum Genet* 72: 115 – 24, 2003.

59. **Drudik DK, Pomp D, Zeng ZB, and Eisen EJ.** Identification of major genes controlling body weight and fat percentage on mouse Chromosome 2. *J Anim Sci* 73: 110 (Abstr.), 1995.

60. **Lembertas AV, Pérusse L, Chagnon YC, Fisler JS, Warden CH, Purcell-Huynh DA, Dionne FT, Gagnon J, Nadeau A, Lusis AJ, and Bouchard C.** Identification of an obesity quantitative trait locus on mouse chromosome 2 and evidence of linkage to body fat and insulin on the human homologous region 20q. *J Clin Invest* 100: 1240 –7, 1997.

61. **Taylor BA, Wnek C, Schroeder D, and Phillips SJ.** Multiple obesity QTLs identified in an intercross between the NZO (New Zealand obese) and the SM (small) mouse strains. *Mamm Genome* 12: 95 – 103, 2001.

62. **Warden CH, Stone S, Chiu S, Diament AL, Corva P, Shattuck D, Riley R, Hunt SC, Easlick J, Fisler JS, and Medrano JF.** Identification of a congenic mouse line with obesity and body length phenotypes. *Mamm Genome* 15: 460 –71, 2004.

63. **Allan MF, Eisen EJ, and Pomp D.** Genomic mapping of direct and correlated responses to long-term selection for rapid growth rate in mice. *Genetics* 170: 1863 – 77, 2005.

64. **Falchi M, Forabosco P, Mocci E, Borlino CC, Picciau A, Virdis E, Persico I, Parracciani D, Angius A, and Pirastu M.** A genomewide search using an original pairwise sampling approach for large genealogies identifies a new locus for total and low-density lipoprotein cholesterol in two genetically differentiated isolates of Sardinia. *Am J Hum Genet* 75: 1015 – 31, 2004.

65. **Lyons MA, Wittenburg H, Li R, Walsh KA, Churchill GA, Carey MC, and Paigen B.** Quantitative trait loci that determine lipoprotein cholesterol levels in DBA/2J and CAST/Ei inbred mice. *J Lipid Res* 44: 953 – 67, 2003.

66. **Mehrabian M, Castellani LW, Wen PZ, Wong J, Rithaporn T, Hama SY, Hough GP, Johnson D, Albers JJ, Mottino GA, Frank JS, Navab M, Fogelman AM, and Lusis AJ.** Genetic control of HDL levels and composition in an interspecific mouse cross (CAST/Ei x C57BL/6J). *J Lipid Res* 41: 1936 – 46, 2000.

67. **Ueno T, Tremblay J, Kunes J, Zicha J, Dobesova Z, Pausova Z, Deng AY, Sun Y-L, Jacob HJ, and Hamet P.** Rat model of familial combined hyperlipidemia as a result of comparative mapping. *Physiol Genomics* 17: 38 – 47, 2004.

68. **Seidelmann SB, De Luca C, Leibel RL, Breslow JL, Tall AR, and Welch CL.** Quantitative trait locus mapping of genetic modifiers of metabolic syndrome and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice: identification of a locus for metabolic syndrome and increased atherosclerosis on chromosome 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 204 – 10, 2005.

69. **Asahina M**, **Sato M, and Imaizumi K.** Genetic analysis of diet-induced hypercholesterolemia in exogenously hypercholesterolemic rats. J Lipid Res 46: 2289 – 2294, 2005.

70. **Peralta S, Carrascosa JM, Gallardo N, Ros M, and Arribas C.** Ageing increases SOCS-3 expression in rat hypothalamus: effects of food restriction. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 425 – 8, 2002.

71. **Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos, Walts B, Pérusse L, and Bouchard C.** The human obesity gene map: The 2005 update. *Obesity* 14: 529 – 644, 2006.

72. **Almind K, Kulkarni RN, Lannon SM, and Kahn CR.** Identification of interactive Loci linked to insulin and leptin in mice with genetic insulin resistance. *Diabetes* 52: 1535 – 43, 2003.

73. **Brockmann GA, Kratzsch J, Haley CS, Renne U, Schwerin M, and Karle S.** Single QTL effects, epistasis, and pleiotropy account for two-thirds of the phenotypic F(2) variance of growth and obesity in DU6i x DBA/2 mice. *Genome Res* 10: 1941 – 57, 2000.

74. **Cheverud JM, Vaughn TT, Pletscher LS, Peripato AC, Adams ES, Erikson CF, and King-Ellison KJ.** Genetic architecture of adiposity in the cross of LG/J and SM/J inbred mice. *Mamm Genome* 12: 3 – 12, 2001.

75. **Kenney-Hunt JP, Vaughn TT, Pletscher LS, Peripato A, Routman E, Cothran K, Durand D, Norgard E, Perel C, and Cheverud JM.** Quantitative trait loci for body size components in mice. *Mamm Genome* 17: 526 – 37, 2006.

76. **Lehrke M, and Lazar MA.** The many faces of PPARgamma. *Cell* 123: 993 – 999, 2005. Review

77. **Armoni M, Harel C, Karni S, Chen H, Bar-Yoseph F, Ver MR, Quon MJ, and Karnieli E.** FOXO1 represses peroxisome proliferators-activated receptor-gamma1 and -gamma2 gene promoters in primary adipocytes. A novel paradigm to increase insulin sensitivity. *J Biol Chem* 281: 19881 – 19891, 2006.

78. **Miard S**, **and Fajas L**. Atypical transcriptional regulators and cofactors of PPARgamma. *Int J Obes* 29: 10 – 12, 2005. Review

79. **Delerive P**, **Fruchart JC**, **and Staels B**. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* 169: 453 – 459, 2001. Review

80. **Arita Y**, **Kihara S**, **Ouchi N**, **Takahashi M**, **Maeda K**, **Miyagawa J**, **Hotta K**, **Shimomura I**, **Nakamura T**, **Miyaoka K**, **Kuriyama H**, **Nishida M**, **Yamashita S**, **Okubo K**, **Matsubara K**, **Muraguchi M**, **Ohmoto Y**, **Funahashi T**, **Matsuzawa Y**. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 79 – 83, 1999.

81. **Hu E, Liang P, and Spiegelmann BM.** AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271: 10697 – 10703, 1996.

82. **Ajuwon KM, and Spurlock ME**. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1220 – R1225, 2005.

83. **Norikazu Maeda, Masahiko Takahashi, Tohru Funahashi, Shinji Kihara, Hitoshi Nishizawa, Ken Kishida, Hiroyuki Nagaretani, Morihiro Matsuda, Ryutaro Komuro, Noriyuki Ouchi, Hiroshi Kuriyama, Kikuko Hotta, Tadashi Nakamura, Iichiro Shimomura, and Yuji Matsuzawa.** PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50: 2094 – 2099, 2001.

84. **Sharma AM, and Staels B.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. J Clin Endocrinol Metab 92: 386 – 395, 2007. Review

85. **Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S.** Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome

proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 50: 2199 – 2202, 2001.

86. **Armoni M, Harel C, and Karnieli E.** Transcriptional regulation of the *GLUT4* gene: from PPAR-γ and FOXO1 to FFA and inflammation. *Trends Endocrinol Metab* 18: 100 – 107, 2007.

87. **Benomar Y, Naour N, Aubourg A, Bailleux V, Gertler A, Djiane J, Guerre-Millo M, and Taouis M.** Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase- dependent mechanism. *Endocrinology* 147: 2550 – 2556, 2006.

88. **Zorzano A, Palacín M, and Gumà A.** Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 183: 43 – 58, 2005.

89. **Cha HC, Oak NR, Kang S, Tran TA, Kobayashi S, Chiang SH, Tenen DG, and MacDougald OA.** Phosphorylation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha regulates GLUT4 expression and glucose transport in adipocytes. *J Biol Chem* 283: 18002 – 18011, 2008.

90. **Yap CC, Liang F, Yamazaki Y, Muto Y, Kishida H, Hayashida T, Hashikawa T, and Yano R.** CIP98, a novel PDZ domain protein, is expressed in the central nervous system and interacts with calmodulin-dependent serine kinase. *J Neurochem* 85: 123 – 134, 2003.

91. **Wang Y, Li R, Du D, Zhang C, Yuan H, Zeng R, and Chen Z.** Proteomic analysis reveals novel molecules involved in insulin signaling pathway. J Proteome Res 5: 846 – 855, 2006.

92. **Mead JR**, **Irvine SA**, **and Ramji DP**. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 80: 753 – 769, 2002. Review

93. **von Eynatten M, Schneider JG, Humpert PM, Rudofsky G, Schmidt N, Barosch P, Hamann A, Morcos M, Kreuzer J, Bierhaus A, Nawroth PP, and Dugi KA.** Decreased plasma lipoprotein lipase in hypoadiponectinemia: an association independent of systemic inflammation and insulin resistance. *Diabetes Care* 27: 2925 – 2929, 2004.

94. **Combs TP**, **Pajvani UB**, **Berg AH**, **Lin Y**, **Jelicks LA**, **Laplante M**, **Nawrocki AR**, **Rajala MW**, **Parlow AF**, **Cheeseboro L**, **Ding YY**, **Russell RG**, **Lindemann D**, **Hartley A**, **Baker GR**, **Obici S**, **Deshaies Y**, **Ludgate M**, **Rossetti L**, **and**

Scherer PE. A Transgenic Mouse with a Deletion in the Collagenous Domain of Adiponectin Displays Elevated Circulating Adiponectin and Improved Insulin Sensitivity. *Endocrinology* 145: 367 – 383, 2004.

95. **Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, and Kuhajda FP.** Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288: 2379–2381, 2000.

96. **Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, and Lane MD.** Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1921–1925, 2002.

97. **Kovacs P, Harper I, Hanson RL, Infante AM, Bogardus C, Tataranni PA, and Baier LJ.** A novel missense substitution (Val1483Ile) in the fatty acid synthase gene (FAS) is associated with percentage of body fat and substrate oxidation rates in nondiabetic Pima Indians. *Diabetes* 53:1915–1919, 2004.

98. **Moreno-Navarrete JM, Botas P, Valdés S, Ortega FJ, Delgado E, Vázquez-Martín A, Bassols J, Pardo G, Ricart W, Menéndez JA, and Fernández-Real JM.** Val1483Ile in FASN Gene is linked to central obesity and insulin sensitivity in adult white men. *Obesity (Silver Spring),* 2009. Epub ahead of print

99. **Berndt J, Kovacs P, Ruschke K, Klöting N, Fasshauer M, Schön MR, Körner A, Stumvoll M, and Blüher M.** Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 50: 1472 – 1480, 2007.

100. **Fliers E, Kreier F, Voshol PJ, Havekes LM, Sauerwein HP, Kalsbeek A, Buijs RM, and Romijn JA.** White adipose tissue: getting nervous. *J Neuroendocrinol* 15: 1005 – 1010, 2003. Review

101. **Kindler S, Rehbein M, Classen B, Richter D, Böckers TM.** Distinct spatiotemporal expression of SAPAP transcripts in the developing rat brain: a novel dendritically localized mRNA. *Mol Brain Res* 126: 14 – 21, 2004.

102. **Peters MF, Adams ME, Froehner SC.** Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol* 138: 81 – 93, 1997.

103. **Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara A, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, Kioka N, Ueda K.** Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. *J Biol Chem* 279: 15091 – 15095, 2004.

104. **Loriol C, Dupuy F, Rampal R, Dlugosz MA, Haltiwanger RS, Maftah A, and Germot A.** Molecular evolution of protein O-fucosyltransferase genes and splice variants. *Glycobiology* 16: 736 – 747, 2006.

105. **Garcés C, Ruiz-Hidalgo MJ, Font de Mora J, Park C, Miele L, Goldstein J, Bonvini E, Porrás A, and Laborda J.** Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis. *J Biol Chem* 272: 29729 – 29734, 1997.

106. **Wang Y, Shao L, Shi S, Harris RJ, Spellmann MW, Stanley P, and Haltiwanger RS.** Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J Biol Chem* 276: 40338 – 40345, 2001.

107. **Tu AY, and Albers JJ**. Glucose regulates the transcription of human genes relevant to HDL metabolism: responsive elements for peroxisome proliferators-activated receptor are involved in the regulation of phospholipids transfer protein. *Diabetes* 50: 1851 – 1856, 2001.

108. **Bossé Y, Bouchard L, Després JP, Bouchard C, Pérusse L, and Vohl MC.** Haplotypes in the phospholipids transfer protein gene are associated with obesity-related phenotypes: the Québec Family Study. *Int J Obes (Lond)* 29: 1338 – 1345, 2005.

109. **Hanson RW, and Reshef L.** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 66: 581 – 611, 1997.

110. **Quinn PG, and Yeagley D.** Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5: 423 – 437, 2005.

111. **Thorburn AW, Baldwin ME, Rosella G, Zajac JD, Fabris S, Song S, and Proietto J.** Features of syndrome X develop in transgenic rats expressing a non-insulin responsive phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Diabetologia* 42: 419 – 426, 1999.

112. **Valera A, Pujol A, Pelegrin M, and Bosch F.** Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9151 – 9154, 1994.

113. **Sun Y, Liu S, Ferguson S, Wang L, Klepcyk P, Yun JS, and Friedeman JF.** Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin

signalling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J Biol Chem* 277: 23301 – 23307, 2002.

114. **Olswang Y, Cohen H, Papo O, Cassuto H, Croniger CM, Hakimi P, Tilghman SM, Hanson RW, Reshef L.** A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 625 – 630, 2002.

115. **Franckhauser S, Muñoz S, Pujol A, Casellas A, Riu E, Otaegui P, Su B, Bosch F.** Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* 51: 624 – 630, 2002.

116. **Mathey-Prevot B, Andrews NC, Murphy HS, Kreissman SG, Nathan DG.** Positive and negative elements regulate human interleukin 3 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 5046 – 5050, 1990.

117. **Engeland K, Andrews NC, Mathey-Prevot B.** Multiple proteins interact with the nuclear inhibitory protein repressor element in the human interleukin-3 promoter. *J Biol Chem.* 270: 24572 – 24579, 1995.

118. **Cao H, van der Veer E, Ban MR, Hanley AJ, Zinman B, Harris SB, Young TK, Pickering JG, and Hegele RA.** Promoter polymorphism in PCK1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase gene) associated with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 898 – 903, 2004.

119. **Dong Y, Zhang H, Wang X, Feng Q, Chen X, and Su Q.** A Leu184Val polymorphism in PCK1 gene is associated with type 2 diabetes in Eastern Chinese population with BMI<23 kg/m2. *Diabetes Res Clin Pract* 83: 227 – 232, 2009.

120. **Willer CJ, Bonnycastle LL, Conneely KN, Duren WL, Jackson AU, Scott LJ, Narisu N, Chines PS, Skol A, Stringham HM, Petrie J, Erdos MR, Swift AJ, Enloe ST, Sprau AG, Smith E, Tong M, Doheny KF, Pugh EW, Watanabe RM, Buchanan TA, Valle TT, Bergman RN, Tuomilehto J, Mohlke KL, Collins FS, and Boehnke M.** Screening of 134 single nucleotide polymorphisms (SNPs) previously associated with type 2 diabetes replicates association with 12 SNPs in nine genes. *Diabetes* 56: 256 – 264, 2007.

121. **Shin HD, Park BL, Kim LH, Cheong HS, Kim JH, Cho YM, Lee HK, and Park KS.** Association of a polymorphism in the gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 with high-density lipoprotein and triglyceride levels. *Diabetologia* 48: 2025 – 2032, 2005.

122. **Wegner L, Andersen G, Albrechtsen A, Sparsø T, Glümer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Hansen T, and Pedersen O.** Large-scale study of the -232C > G polymorphism of PCK1 in Type 2 diabetes. Diabet Med 23: 1140 – 1144, 2006.

123. **Gouni-Berthold I, Giannakidou E, Faust M, Berthold HK, and Krone W.** Association of the promoter polymorphism -232C/G of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene (PCK1) with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 23: 419 – 425, 2006.

124. **Sutton BS, Langefeld CD, Campbell JK, Haffner SM, Norris JM, Scherzinger AI, Wagenknecht LE, and Bowden DW.** Genetic mapping of a 17q chromosomal region linked to obesity phenotypes in the IRAS family study. *Int J Obes (Lond)* 30: 1433- 1441, 2006.

125. **Talbert ME, Langefeld CD, Ziegler J, Mychaleckyj JC, Haffner SM, Norris JM, and Bowden DW.** Polymorphisms near SOCS3 are associated with obesity and glucose homeostasis traits in Hispanic Americans from the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Hum Genet* 125: 153 – 162, 2009.

126. **Long YC, and Zierath JR.** AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116: 1776 . 1783, 2006. Review

127. **Prieur X, Tung YC, Griffin JL, Farooqi IS, O'Rahilly S, and Coll AP.** Leptin regulates peripheral lipid metabolism primarily through central effects on food intake. *Endocrinology* 149: 5432 – 5439, 2008.

128. **Heilbronn L, Smith SR, and Ravussin E.** Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 12 – 21, 2004.

129. **Gottsch ML, Zeng H, Hohmann JG, Weinshenker D, Clifton DK, and Steiner RA.** Phenotypic analysis of mice deficient in the type 2 galanin receptor (GALR2). *Mol Cell Biol* 25: 4804 – 4811, 2005.

130. **Yang YS, Song HD, Li RY, Zhou LB, Zhu ZD, Hu RM, Ha ZG, and Chen JL.** The gene expression profiling of human visceral adipose tissue and its secretory functions. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 839 – 846, 2003.

131. **Li RY**, **Song HD**, **Shi WJ**, **Hu SM**, **Yang YS**, **Tang JF**, **Chen MD**, **and Chen JL**. Galanin inhibits leptin expression and secretion in rat adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *J Mol Endocrinol* 33: 11 – 19, 2004.

132. **Shivapurkar N, Stastny V, Okumura N, Girard L, Xie Y, Prinsen C, Thunnissen FB, Wistuba II, Czerniak B, Frenkel E, Roth JA, Liloglou T, Xinarianos G, Field JK, Minna JD, and Gazdar AF.** Cytoglobin, the newest member of the globin family, functions as a tumor suppressor gene. *Cancer Res* 68: 7448 – 7456, 2008.

133. **Li D, Chen XQ, Li WJ, Yang YH, Wang JZ, and Yu AC.** Cytoglobin up-regulated by hydrogen peroxide plays a protective role in oxidative stress. *Neurochem Res* 32: 1375 – 1380, 2007.

134. **Furukawa S**, **Fujita T**, **Shimabukuro M**, **Iwaki M**, **Yamada Y**, **Nakajima Y**, **Nakayama O**, **Makishima M**, **Matsuda M**, **and Shimomura I**. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752 – 1761, 2004.

135. **Chen JM, Férec C, and Cooper DN.** A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Hum Genet* 120: 1 – 21, 2006. Review

136. **Mbella EG, Bertrand S, Huez G, and Octave JN.** A GG nucleotide sequence of the 3' untranslated region of amyloid precursor protein mRNA plays a key role in the regulation of translation and the binding of proteins. *Moll Cell Biol* 20: 4572 – 4579, 2000.

137. **Danckwardt S, Gehring NH, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Pforsich M, Frede U, Hentze MW, and Kulozik AE.** The prothrombin 3'end formation signal reveals a unique architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations. *Blood* 104: 428- 435, 2004.

138. **Wang H, Zhang H, Jia Y, Zhang Z, Craig R, Wang X, and Elbein SC.** Adiponectin receptor 1 gene (ADIPOR1) as a candidate for type 2 diabetes and insulin resistance. *Diabetes* 53: 2132 – 2136, 2004.

139. **Pizzuti A, Argiolas A, Di Paola R, Baratta R, Rauseo A, Bozzali M, Vigneri R, Dallapiccola B, Trischitta V, and Frittitta L.** An ATG repeat in the 3'-untranslated region of the human resistin gene is associated with a decreased risk of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4403 – 4406, 2002.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, 05.03.2010

Lebenslauf

Name:	Romy Baguhl
geboren:	31.07.1980 in Güstrow
Familienstand:	ledig, 2 Kinder

Promotion

04/06 – 03/09	Promotion am Institut für Pathophysiologie, Abt. Versuchstierkunde Gefördert mit dem Landesgraduiertenstipendium Thema: „Identifikation von Genen für Facetten des Metabolischen Syndroms bei WOKW-Ratten und ihren kongenen Derivaten“

Studium

10/00 – 02/06	Studium der Biologie an der Universität Greifswald Hauptfach: Biochemie, Nebenfächer: Virologie, Ökologie Diplomarbeit: „Allele des ARO80-Gens und ihre Wirkung auf die Expression von ARO9 in *Saccharomyces cerevisiae*“ Abschlussnote: „sehr gut“
10/99 – 10/00	Studium der Biochemie an der Universität Greifswald

Schulbildung

1993 – 1999	Gymnasium Barth, Abschluss: Abitur (*2,2*)
1991 – 1993	Orientierungsstufe Zingst
1987 – 1991	Grundschule Zingst

Elternzeit

seit 04/09

Publikation und Tagungsbeiträge

Baguhl R, Wilke B, Klöting N, and Klöting I. Genes on rat chromosomes 3, 5, 10 and 16 are linked with facets of metabolic syndrome. *Obesity* 17: 1215-1219, 2009.

43. Jahrestagung der DDG in München (2008): Two subcongenic BB.4S strains - identical genetic characterization but different facets of metabolic syndrome. Baguhl R, Lutze P, Wilke B, and Klöting I.

42. Jahrestagung der DDG in Hamburg (2007): Genes for obesity map on chromosome 3: lessons from congenic DA.WOKW rats. Baguhl R, Lutze P, Wilke B, and Klöting I.

Berufsbezogenes Praktikum

25.08.03-02.10.03 Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, AG Hefegenetik

Greifswald, 05.03.2010

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Doktormutter Prof. Dr. Dr. Ingrid Klöting, Leiterin der Abteilung für Versuchstierkunde, für die Bereitstellung des interessanten Themas und der Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Barbara Wilke für die konstruktiven Gespräche bedanken, die zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Einen lieben Dank richte ich an alle Mitarbeiter der Abteilung für Versuchstierkunde, besonders an Silvia Sadewasser und Kathrin Stabenow für die experimentielle Unterstützung bei den Laborarbeiten und den aufmunternden Gesprächen sowie an Susanne Schuldt, Martina Kube und Edeltraut Lübke für die Hilfe im Umgang mit den Versuchstieren sowie deren Anzucht.

Schließlich danke ich meinen Eltern, meinem Freund und meinen Kindern, die mir eine große Motivationshilfe waren.

Der Landesgraduiertenförderung danke ich für die Bereitstellung des Promotionsstipendiums.

Genes on Rat Chromosomes 3, 5, 10, and 16 Are Linked With Facets of Metabolic Syndrome

Romy Baguhl[1], Barbara Wilke[1], Nora Klöting[1,2] and Ingrid Klöting[1]

WOKW (Wistar Ottawa Karlsburg W) rats develop metabolic syndrome closely resembling human disorder. In crossing studies between disease-prone WOKW and disease-resistant DA (Dark Agouti) rats, several quantitative trait loci (QTLs) were mapped. To prove the *in vivo* relevance of QTLs, congenic DA.WOKW rats, briefly termed DA.3aW, DA.3bW, DA.5W, DA.10W, and DA.16W, were generated by transferring chromosomal regions of WOKW chromosomes 3, 5, 10, and 16 onto DA genetic background. Male (n = 12) and female (n = 12) rats of each congenic strain and their parental strain DA were characterized for adiposity index (AI), serum leptin, and serum insulin as well as serum cholesterol and serum triglycerides as single facets of metabolic syndrome at the age of 30 weeks. The data showed a significant higher AI for male and female DA.3aW and female DA.16W compared with DA. Serum leptin was significantly elevated in male and female DA.3aW, DA.10W, and DA.16W rats in comparison with DA. Rats of both sexes of DA.10W and female DA.16W showed significantly elevated serum insulin in comparison to DA. Female rats of all congenics had significantly higher serum cholesterol compared with DA, while males did not differ. Finally, triglycerides were only elevated in male DA.16W. The results demonstrate an involvement of WOKW chromosomes 3, 5, 10, and 16 in developing facets of the metabolic syndrome.

Obesity (2009) **17,** 1215–1219. doi:10.1038/oby.2008.658

INTRODUCTION

The metabolic syndrome, also known as Deadly Quartet and Syndrome X, is a polygenic complex disease with single facets like obesity, glucose intolerance, dyslipidemia, and hypertension. A uniform definition is yet not fixed.

It is well known that besides environmental factors, genetic predisposition plays a crucial role in developing the metabolic syndrome (1). Despite extensive efforts, genetic determinants of the metabolic syndrome remain unclear (2,3). Prevalence of the metabolic syndrome is increasing not only in adults but also at early stages of life (4–7), which is also associated with higher risk of type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. This results in a huge financial burden for the health-care system. Therefore, clarifying the genetics of metabolic syndrome appears to be a crucial task. Animal models developing facets of the metabolic syndrome are a useful tool to study the interaction of genetic and environmental factors. One excellent model is the WOKW (Wistar Ottawa Karlsburg W) rat developing polygenic inherited metabolic syndrome resembling the human disorder with obesity, dyslipidemia, impaired glucose tolerance, hyperinsulinemia, and hyperleptinemia (8–12). In crossing studies between disease-prone WOKW and disease-resistant DA (Dark Agouti) rats, several quantitative trait loci (QTLs) were mapped for facets of metabolic syndrome (13). For example, QTLs for total cholesterol were detected on chromosomes 3, 4, 5, and 10. For serum leptin, a male-specific QTL was found on chromosome 8 and a female-specific QTL was found on chromosome 16. Moreover, QTLs for body weight, BMI, and adiposity index (AI) were mapped on chromosomes 1 and 5.

To study the *in vivo* relevance of QTLs, congenic rat strains were generated by transferring chromosomal regions of WOKW onto DA background on chromosomes 3, 5, 10, and 16 founding the congenic DA.WOKW rat strains. These regions represent QTLs of facets of the metabolic syndrome in WOKW rats termed *Q3MS1, Q3MS2, Q5MS1, Q10MS1,* and *Q16MS2* (13) (shown in **Figure 1** and in the **Supplementary Table S1** online). The established congenic rat strains might be helpful in identifying candidate genes and so, in understanding the underlying mechanisms leading to this complex disease. Therefore, each congenic DA.WOKW strain was characterized for AI, serum leptin, and insulin as well as serum lipids to cover main facets of the metabolic syndrome in the chromosomal donor WOKW.

[1]Department of Laboratory Animal Science, Medical Faculty, University Greifswald, Karlsburg, Germany; [2]Internal Medical Clinic III, University of Leipzig, Leipzig, Germany. Correspondence: Ingrid Klöting (kloeting@uni-greifswald.de)

Received 11 July 2008; accepted 10 December 2008; published online 19 February 2009. doi:10.1038/oby.2008.658

METHODS AND PROCEDURES

Generation of congenic DA.WOKW rats

Male DA rats were crossed with female WOKW rats to produce (DA × WOKW) F1 hybrids. The resulting cross hybrids were repeatedly backcrossed onto DA genetic background. To accelerate the generation of congenics, we selected animals that were heterozygous at loci *D3Mgh1*, *D3Mit3*, and *D3Mgh5* alternatively *D3Mit9* and *D3Mit10* within the exchanged regions on chromosomes 3, at loci *D5Mit5* and *D5Mgh6* within the exchanged region on chromosome 5, at loci *D10Mgh2*, *D10Mgh4*, *D10Rat4*, and *D10Rat88* within the exchanged region on chromosome 10 and at loci *D16Mgh3* and *D16Mit4* within the exchanged region on chromosome 16 and homozygous for DA alleles at background loci to generate speed congenics. Therefore, ((DA × WOKW) F1 × DA) first backcross (BC) hybrids were genotyped with 180 markers located on 20 autosomes and the X chromosome. BC1 hybrids that were heterozygous for selected loci on chromosome 3 alternatively 5, 10, or 16 and most homozygous for background loci were backcrossed onto DA background. The same procedure was carried out for rats of BC2, BC3, and BC4. After five backcross generations, the animals were intercrossed. Congenic animals homozygous for WOKW alleles on chromosome 3 for loci *D3Mgh1*, *D3Mit3*, and *D3Mgh5* were termed DA.3aW and homozygous for *D3Mit9* and *D3Mit10* were termed the DA.3bW Alternatively, animals homozygous for *D5Mit5* and *D5Mgh6* on chromosome 5, *D10Mgh2, D10Mgh4*, *D10Rat4*, and *D10Rat88* on chromosome 10 or *D16Mgh3* and *D16Mit4* on chromosome 16 founded the congenics termed DA.5W, DA.10W and DA.16W.

Animals were kept separately in groups of three in Macrolon cages (Size3; Ehret, Emmendingen, Germany) under strict hygienic conditions and were free of major pathogens as described previously (14). They had free access to food (Ssniff, Soest, Germany) and water and were maintained at 12-h light and dark cycle (5 AM/5 PM).

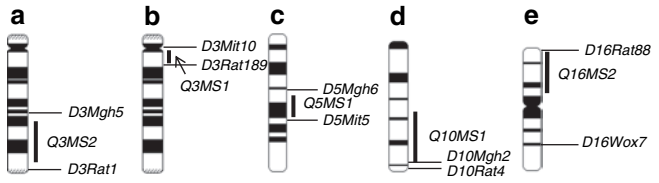

Figure 1 Genotypical characteristics of congenic chromosomes 3, 5, 10, and 16. Markers define WOKW-specific regions on chromosome 3 in (**a**) DA.3a and (**b**) DA.3bW, on chromosome 5 in (**c**) DA.5W, on chromosome 10 in (**d**) DA.10W and on chromosome 16 in (**e**) DA.16W. Black bars show the QTLs mapped in a (WOKW × DA) F2 cross on chromosomes 3 (*Q3MS1, Q3MS2*), 5 (*Q5MS1*), 10 (*Q10MS1*), and 16 (*Q16MS2*) (13).

Genetic markers and genotyping

Congenic animals were mapped with markers polymorphic between WOKW and DA to define the chromosomal region homozygous for WOKW on chromosomes 3, 5, 10, and 16 as summarized in **Figure 1**. All markers are shown in the **Supplementary Table S1** online. Primers were generated by Invitrogen (Karlsruhe, Germany) and PCR was performed as described previously (15).

Phenotype characterization

Blood samples were obtained from nonfasted male and female DA (12) rats as well as from DA.3aW (12), DA.3bW (12), DA.5W (12),

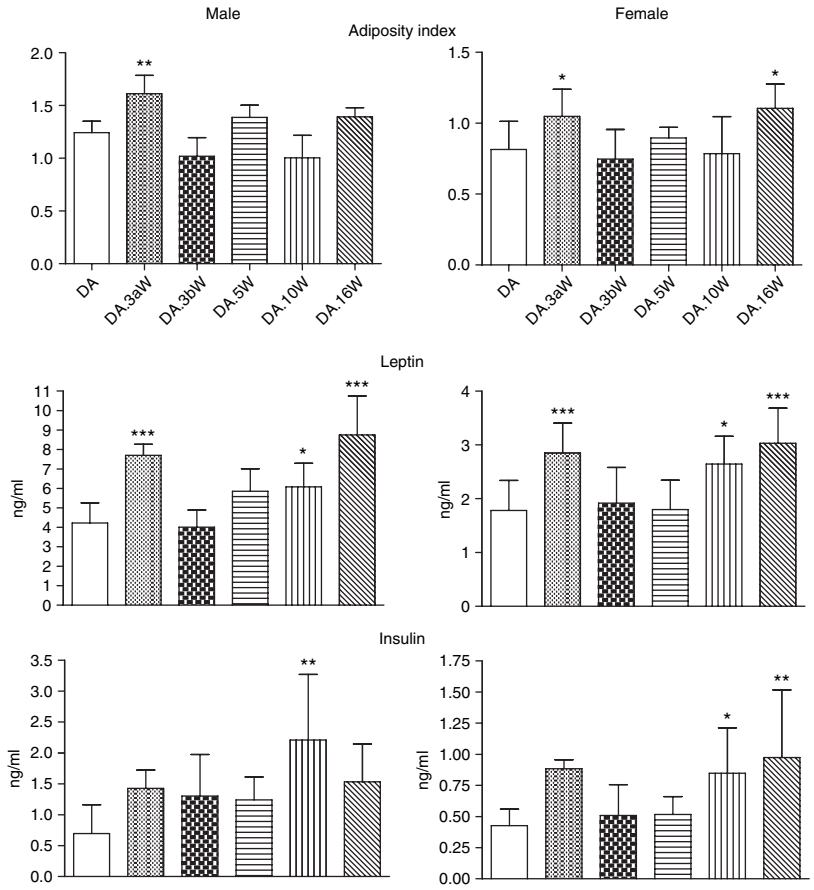

Figure 2 Adiposity index, serum leptin and serum insulin in male and female congenics and in their parental strain DA. Asterisks show significant differences to DA, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$. The congenics and their parental strain DA were characterized for adiposity index, serum leptin, and serum insulin levels at an age of 30 weeks.

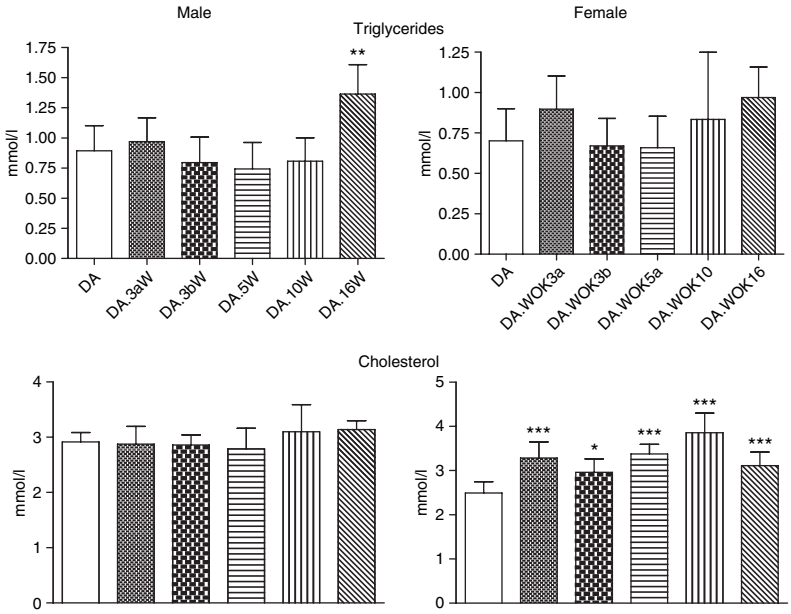

Figure 3 Triglyceride and cholesterol level of congenics and their parental strain DA. Asterisks show significant differences to DA, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. The congenics and their parental strain DA were characterized for triglyceride and cholesterol levels at an age of 30 weeks.

DA.10W (12), and DA.16W (12) by puncturing the ophthalmic venous plexus at an age of 30 weeks to determine serum leptin and serum insulin using a radioimmunoassay kit (Rat Leptin RIA Kit; Linco Research, St Charles, MO) or ELISA (Rat Insulin ELISA; Mercodia, Uppsala, Sweden). Serum cholesterol and serum triglycerides were analyzed by lipid electrophoresis. Rats were killed at the age of 30 weeks and the body weight was determined. In addition, left and right inguinal adipose pads were removed and weighted to determine the AI as ratio between fat pads and body weight × 100.

Statistical analysis

The data are presented as means ± s.d. Differences were assessed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's multiple comparison test.

RESULTS

The phenotypic data showed significant differences between the parental strain DA and the congenic DA.WOKW strains as demonstrated in **Figures 2** and **3**.

The AI as an indicator for obesity was significantly increased in male and female DA.3aW as well as in female DA.16W compared to DA. Female DA.16W also showed significantly elevated serum insulin and serum leptin levels, whereas male DA.16W rats only significantly differ from DA in serum leptin levels. Serum leptin levels were also significantly increased in male and female DA.3aW and DA.10W in comparison to DA. Moreover, DA.10W rats of both sexes showed significant higher serum insulin levels (**Figure 2**).

In **Figure 3**, it is shown that all female congenics had significantly different serum cholesterol levels compared to DA, whereas male congenics did not differ. Furthermore, only male DA.16W had significantly higher serum triglycerides than DA (**Figure 3**).

DISCUSSION

The WOKW rat is a well established animal model to study facets of the metabolic syndrome. Congenic DA.WOKW rat lines were generated to prove the *in vivo* relevance of QTLs. For this reason, regions of DA chromosomes 3, 5, 10, and 16 were replaced by WOKW chromosomal regions. These congenic lines differ genetically from DA only in the exchanged regions on the named chromosome.

The results of phenotypic characterization indicate that WOKW alleles of genes within the exchanged regions of chromosomes 3, 5, 10, and 16 influence insulin, leptin and AI as well as cholesterol and triglyceride levels according to chromosomal region and sex.

In a previous study with (WOKW × DA) F2 progeny, male-specific QTLs for serum insulin and AI were mapped on chromosome 1 and for serum leptin on chromosome 8. QTLs for cholesterol were found on proximal chromosome 3 and on chromosome 10. In addition, a female-specific QTL for serum leptin was mapped on chromosome 16 (ref. 13). The present results indicate further QTLs.

As shown in **Figures 2** and **3**, the distal region of chromosome 3 between *D3Mgh5* and *D3Rat1* suggests QTLs for leptin, AI and also a female-specific QTL for cholesterol. This region might be of interest because a part of the chromosome, 3q42, is syntenic to human chromosome 20q13.1, which is associated with diabetes and obesity (16–19). In addition, Dong *et al.* reported linkage of the region on human chromosome 20 flanked with markers D20S178 and D20S149 with obesity (20).

The distal region of rat chromosome 3 between *D3Mgh5* and *D3Rat1* is syntenic to distal region of mouse chromosome 2, where QTLs for AI, body weight, and body fat were found (21–24). Linkage analysis with (ICR × M16) F2 intercross showed a plasma leptin QTL (Mlepq1) on syntenic mouse chromosome 2 (ref. 25).

The homology to mouse chromosome 2 and human chromosome 20, especially 20q13.1, together with phenotypic data of

DA.3aW clearly demonstrate the potential physiologic relevance of genes located on distal rat chromosome 3 in developing obesity with hyperleptinemia and elevated cholesterol. The importance of this chromosomal region is underlined by the fact, that a number of genes within this region like *Ptpn1*, *Tkt* or *Ghrh* are candidates involved in the pathophysiology of human obesity as reported in the human obesity gene map (26).

DA.3bW and DA.5W rats deserve attention because of higher cholesterol levels detected in female rats. The proximal region of rat chromosome 3 between *D3Mit10* and *D3Rat189* is syntenic to human and mouse chromosome 2. Interestingly, QTLs for serum cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and high-density lipoprotein cholesterol in syntenic regions point to genes involved in dyslipidemia, as one single facet of metabolic syndrome (27–29). These findings are in line with the cholesterol QTL on chromosome 3 found in our cross between DA and WOKW (13).

Furthermore, a QTL for serum cholesterol (Slc20) is located in exchanged region on chromosome 5 (ref. 30). Moreover, the Mbsyd locus in this region was shown to be linked to several traits of the metabolic syndrome like insulin, leptin, or triglyceride levels in a cross between B6 and PERA mice (31).

The phenotypic data (**Figures 2** and **3**) indicate QTLs for leptin and insulin as well as a female-specific QTL for cholesterol in the region between *D10Mgh2* and *D10Rat4* on rat chromosome 10. These data confirm the QTL for cholesterol on chromosome 10 (ref. 13). Interestingly, *Socs3,* a candidate gene for obesity (26) which is also linked with leptin resistance is located in this region (32).

The region on rat chromosome 16 narrowed by *D16Rat88* and *D16Wox7* suggests QTLs for leptin level in both sexes and female-specific QTLs for AI and insulin as well as a male-specific QTL for triglycerides. Worth mentioning, QTLs for hyperinsulinemia, leptin, and adiposity were mapped in syntenic regions to rat chromosome 16 on mouse chromosomes 8 and 14 (refs. 33–36).

In conclusion, the present study demonstrates the physiologic relevance of genes on rat chromosomes 3, 5, 10, and 16 in developing facets of metabolic syndrome partly with different expression in males and females. The results clearly show that genes on different chromosomes affect facets of metabolic syndrome in WOKW rats with sex-specific regulation. The sex specificity is demonstrated in cholesterol levels which were significantly elevated in all female congenics but not in male rats. The generated DA.WOKW congenics suggest QTLs for leptin, insulin, AI, cholesterol, and triglycerides and are helpful animal models to identify candidate genes causing obesity with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, and dyslipidemia.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at http://www.nature.com/oby

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Silvia Sadewasser, Susanne Schuldt, Edeltraut Lübke, Martina Kube, and Kathrin Stabenow for their excellent technical assistance. This research is partially supported by grant no. KL 771/11-2 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

DISCLOSURE

The authors declared no conflict of interest.

© 2009 The Obesity Society

REFERENCES

1. Ferrannini E. The insulin resistance syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1992;1:291–298.
2. Groop L. Genetics of the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 2000;83:39–48.
3. Terán-García M, Bouchard C. Genetics of the metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007;32:89–114.
4. Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL *et al*. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999–2002. *JAMA* 2004;292:1304.
5. Huang TT, Ball GD, Franks PW. Metabolic syndrome in youth: current issues and challenges. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007;32:13–22.
6. Saland JM. Update on the metabolic syndrome in children. *Curr Opin Pediatr* 2007;19:183–191.
7. Weiss R, Dziura J, Burgert TS *et al*. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004;350:2362–2374.
8. Kovács P, Voigt B, Berg S, Vogt L, Klöting I. WOK.1W rats. A potential animal model of the insulin resistence syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1997;827:94–99.
9. Kovács P, van den Brandt J, Klöting I. Genetic dissection of the syndrome X in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:660–665.
10. van den Brandt J, Kovács P, Klöting I. Features of the metabolic syndrome in the spontaneously hypertriglyceridemic Wistar Ottawa Karlsburg W (RT1u Haplotype) rat. *Metabolism* 2000;49:1140–1144.
11. van den Brandt J, Kovács P, Klöting I. Metabolic features in disease-resistent as well as in spontaneously hypertensive rats and newly established obese Wistar Ottawa Karlsburg inbred rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:1618–1622.
12. van den Brandt J, Kovács P, Klöting I. Metabolic syndrome and aging in Wistar Ottawa Karlsburg W rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:573–576.
13. Klöting I, Kovács P, van den Brandt J. Sex-specific and sex-independent quantitative trait loci for facets of the metabolic syndrome in WOKW rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:150–156.
14. Klöting I, Vogt L. BB/O(ttawa)K(arlsburg) rats: features of a subline of diabetes-prone BB rats. *Diabetes Res* 1991;18:79–87.
15. Klöting I, Voigt B, Vogt L. 47 polymorphic microsatellite loci in different inbred rat strains. *J Exp Anim Sci* 1995;37:42–47.
16. Deng HW, Deng H, Liu YJ *et al*. A genomewide linkage scan for quantitative-trait loci for obesity phenotypes. *Am J Hum Genet* 2002;70:1138–1151.
17. Hunt SC, Abkevich V, Hensel CH *et al*. Linkage of body mass index to chromosome 20 in Utah pedigrees. *Hum Genet* 2001;109:279–285.
18. Lee JH, Reed DR, Li WD *et al*. Genome scan for human obesity and linkage to markers in 20q13. *Am J Hum Genet* 1999;64:196–209.
19. Perusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ *et al*. The human obesity gene map: the 2000 update. *Obes Res* 2001;9:135–169.
20. Dong C, Wang S, Li WD *et al*. Interacting genetic loci on chromosomes 20 and 10 influence extreme human obesity. *Am J Hum Genet* 2003;72:115–124.
21. Drudik DK, Pomp D, Zeng ZB, Eisen EJ. Identification of major genes controlling body weight and fat percentage on mouse Chromosome 2. *J Anim Sci* 1995;73:110 (Abstract).
22. Lembertas AV, Pérusse L, Chagnon YC *et al*. Identification of an obesity quantitative trait locus on mouse chromosome 2 and evidence of linkage to body fat and insulin on the human homologous region 20q. *J Clin Invest* 1997;100:1240–1247.
23. Taylor BA, Wnek C, Schroeder D, Phillips SJ. Multiple obesity QTLs identified in an intercross between the NZO (New Zealand obese) and the SM (small) mouse strains. *Mamm Genome* 2001;12:95–103.
24. Warden CH, Stone S, Chiu S *et al*. Identification of a congenic mouse line with obesity and body length phenotypes. *Mamm Genome* 2004;15:460–471.
25. Allan MF, Eisen EJ, Pomp D. Genomic mapping of direct and correlated responses to long-term selection for rapid growth rate in mice. *Genetics* 2005;170:1863–1877.
26. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC *et al*. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* 2006;14:529–644.
27. Falchi M, Forabosco P, Mocci E *et al*. A genomewide search using an original pairwise sampling approach for large genealogies identifies a new locus for total and low-density lipoprotein cholesterol in two genetically differentiated isolates of Sardinia. *Am J Hum Genet* 2004;75: 1015–1031.

28. Lyons MA, Wittenburg H, Li R *et al*. Quantitative trait loci that determine lipoprotein cholesterol levels in DBA/2J and CAST/Ei inbred mice. *J Lipid Res* 2003;44:953–967.
29. Mehrabian M, Castellani LW, Wen PZ *et al*. Genetic control of HDL levels and composition in an interspecific mouse cross (CAST/Ei × C57BL/6J). *J Lipid Res* 2000;41:1936–1946.
30. Ueno T, Tremblay J, Kunes J *et al*. Rat model of familial combined hyperlipidemia as a result of comparative mapping. *Physiol Genomics* 2004;17:38–47.
31. Seidelmann SB, De Luca C, Leibel RL *et al*. Quantitative trait locus mapping of genetic modifiers of metabolic syndrome and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice: identification of a locus for metabolic syndrome and increased atherosclerosis on chromosome 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:204–210.
32. Peralta S, Carrascosa JM, Gallardo N, Ros M, Arribas C. Ageing increases SOCS-3 expression in rat hypothalamus: effects of food restriction. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:425–428.
33. Almind K, Kulkarni RN, Lannon SM, Kahn CR. Identification of interactive Loci linked to insulin and leptin in mice with genetic insulin resistance. *Diabetes* 2003;52:1535–1543.
34. Brockmann GA, Kratzsch J, Haley CS *et al*. Single QTL effects, epistasis, and pleiotropy account for two-thirds of the phenotypic F(2) variance of growth and obesity in DU6i × DBA/2 mice. *Genome Res* 2000;10:1941–1957.
35. Cheverud JM, Vaughn TT, Pletscher LS *et al*. Genetic architecture of adiposity in the cross of LG/J and SM/J inbred mice. *Mamm Genome* 2001; 12:3–12.
36. Kenney-Hunt JP, Vaughn TT, Pletscher LS *et al*. Quantitative trait loci for body size components in mice. *Mamm Genome* 2006;17:526–537.