

**Assoziations- und Funktionsanalysen von
Polymorphismen ausgewählter Gene des Fettstoffwechsels
im Hinblick auf Insulinresistenz**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Inka Lindner

Kiel

April 2008

Referent/in: Prof. Dr. Thomas Roeder

Korreferent/in: Prof. Dr. Frank Döring

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2008

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

Diese Arbeit entstand am Max-Rubner-Institut (ehem. Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel), Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung in Kiel und dem Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Abteilung Molekulare Ernährung unter der Anleitung von Prof. Frank Döring.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Mechanismen der Insulinresistenz – Rolle von Fettstoffwechsel und Inflammation	4
1.1.1 Insulinwirkung und Insulinsignalkaskade	4
1.1.2 Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz	7
1.2 Untersuchte Gene	11
1.2.1 Acyl-CoA Synthetasen <i>medium-chain</i> (ACSM)	11
1.2.2 Prostaglandin E Synthase 2 (PTGES2)	15
1.3 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Kohorten und Probanden	20
2.2 Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1 Nukleinsäurequantifizierung	22
2.2.2 Agarosegelelektrophorese	23
2.2.3 RNA-Isolation	23
2.2.4 Reverse Transkription	23
2.2.5 Quantitative <i>Realtime</i> -PCR (TaqMan)	24
2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion	27
2.2.7 Klonierung und Transformation	29

2.2.8 Gezielte Mutagenese	31
2.2.9 Proteinexpression in <i>E. coli</i>	32
2.3 Zellbiologische Methoden	33
2.3.1 Zellkultur	33
2.3.2 Transfektion	34
2.3.3 Färbung und Mikroskopie	35
2.3.4 Proteinexpression in Säugerzellen	36
2.3.5 <i>Ex vivo</i> Stimulation	36
2.3.6 Promotorassay	36
2.4 Biochemische Methoden	37
2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung	37
2.4.2 Proteinisolation	38
2.4.3 SDS-PAGE	39
2.4.4 Western Blot	40
2.4.5 Proteinaufreinigung	41
2.4.6 Enzymaktivität	41
2.4.7 ELISA	42
2.5 Statistische Methoden	42
3 Ergebnisse	44
3.1 Acyl-CoA Synthetasen <i>medium-chain</i>	44
3.1.1 Assoziationsstudien	44
3.1.2 Nachweis von ACSMs	53
3.1.3 Versuch der heterologen Expression von ACSM2	58
3.2 Prostaglandin E Synthase 2	60
3.2.1 Assoziationsstudien	60

3.2.2 Vorkommen des PTGES2-Proteins	63
3.2.3 PTGES2 transaktivierende Funktion	63
3.2.4 PTGES2 <i>ex vivo</i> Untersuchung	64
4 Diskussion	69
4.1 Acyl-CoA Synthetasen <i>medium-chain</i>	69
4.2 Prostaglandin E Synthase 2	76
5 Zusammenfassung	81
6 <i>Summary</i>	83
7 Anhang	85
7.1 Literaturverzeichnis	85
7.2 Verwendete Materialien und Kits	101
7.3 Verwendete Geräte	107
7.4 Verwendete Programme	108
7.5 Zusätzliche Informationen	109
8 Danksagung	115
9 Lebenslauf	116
10 Erklärung	117

Abbildungsverzeichnis

Abb. #	Titel	Seite
Abb. 1	Prävalenz von Diabetes weltweit und nach Regionen im Jahr 2000 und Schätzungen für 2030	2
Abb. 2	Normale Insulinwirkung und Auswirkungen der Insulinresistenz	5
Abb. 3	Schematische Darstellung der Insulinsignalkaskade	6
Abb. 4	Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz - Störungen der intrazellulären Insulinsignalkaskade und deren Auslöser	9
Abb. 5	Lokalisation der ACSMs auf Chromosom 16	13
Abb. 6	Vergleich der Proteinsequenzen der ACSM-Familie	14
Abb. 7	Prostaglandin- und Thromboxansynthese	16
Abb. 8	EP3-vermittelte PGE ₂ -Wirkung	17
Abb. 9	Prinzip des TaqMan-Assays	25
Abb. 10	Prinzip der TOPO-Klonierung	30
Abb. 11	Prinzip der gezielten Mutagenese	32
Abb. 12	Verbindung zwischen den gewählten ACSM SNPs mit LD-Maß r^2	45
Abb. 13	Verlauf der Triglycerid- und Glucosespiegel nach einer Testmahlzeit (oMTT) abhängig vom ACSM2 L513S SNP	52
Abb. 14	Vergleich der relativen Transkriptmengen von ACSMs in verschiedenen Zelllinien und humaner Leber	54
Abb. 15	Vergleich der einzelnen ACSM-Transkriptmengen in humaner Leber	55
Abb. 16	Nachweis von ACSM2 in Leberzelllinien und humaner Leber	56
Abb. 17	Expression und subzelluläre Lokalisation von ACSM2-GFP in HuH-7	57
Abb. 18	Expression und subzelluläre Lokalisation des N-terminal verkürzten ACSM2t47-GFP in HuH-7	58
Abb. 19	Expressionsanalyse von drei ACSM2-Expressionskonstrukten in <i>E. coli</i> mit SDS-PAGE	59
Abb. 20	Nachweis des ACSM2.pET-DEST42 Expressionsproduktes nach Affinitätschromatographie	59
Abb. 21	Aufreinigung von rekombinantem ACSM2-Protein aus transient transfizierten HEK293T mittels Affinitätschromatographie	60
Abb. 22	Nachweis von PTGES2 in Zelllinien und humanen Monocyten	63
Abb. 23	Promotoraktivität eines murinen GATE-Elementes mit verschiedenen PTGES2 Konstrukten in HeLa	64
Abb. 24	Prostaglandin E ₂ -Spiegel nach 24h ohne LPS-Zugabe abhängig vom Genotyp bei Frauen und Männern	67

Abb. 25	Prostaglandin E ₂ -Spiegel nach 24h Stimulation mit 200 und 2000ng LPS, nur Frauen	68
Abb. 26	3D-Darstellung des ACSM2 Proteins alleine und im Komplex mit ATP	73
Abb. 27	3D-Struktur von PTGES2 im Komplex mit Indomethacin	78

Tabellenverzeichnis

Tab. #	Titel	Seite
Tab. 1	Definitionen des Metabolischen Syndroms	1
Tab. 2	Bezeichnungen der Acyl-CoA Synthetasen <i>medium-chain</i>	13
Tab. 3a	Zusammensetzung des oMTT	20
Tab. 3b	Fettsäurezusammensetzung der oMTT-Triglyceride	21
Tab. 4	Verwendete Primer und Sonden für die TaqMan Genotypisierung	22
Tab. 5	Verwendete TaqMan-Assays	25
Tab. 6	Einsatz von cDNA in den TaqMan-Assays	26
Tab. 7	Verwendete Oligonukleotide	27
Tab. 8	PCR-Ansätze	28
Tab. 9	PCR-Programme	28
Tab. 10	Verwendete Vektoren	29
Tab. 11	Verwendete Bakterienstämme	30
Tab. 12	Verwendete Oligonukleotide zur Mutagenese	32
Tab. 13	Verwendete Zelllinien	33
Tab. 14	Transfektionsbedingungen FuGENE 6	34
Tab. 15	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	35
Tab. 16	Verwendete Antikörper	40
Tab. 17	Allelfrequenzen der untersuchten ACSM SNPs in MICK	44
Tab. 18a	Assoziationen von ACSM1 A/G mit metabolischen Parametern in MICK	47
Tab. 18b	Assoziationen von ACSM2 D463N mit metabolischen Parametern in MICK	48
Tab. 18c	Assoziationen von ACSM2 L513S mit metabolischen Parametern in MICK	49
Tab. 18d	Assoziationen von ACSM3 G/A mit metabolischen Parametern in MICK	50
Tab. 18e	Assoziationen von ACSM5 T533M mit metabolischen Parametern in MICK	51
Tab. 19	Assoziationen von ACSM SNPs mit gestörtem Glucosemetabolismus / Typ 2 DM in MICK	53

Tab. 20	Allelfrequenzen des PTGES2 R298H Polymorphismus in MICK	61
Tab. 21	Assoziationen von PTGES2 R298H mit metabolischen Parametern in MICK	62
Tab. 22	Assoziation des PTGES2 R298H SNP mit gestörtem Glucose-metabolismus / Typ 2 DM in MICK	63
Tab. 23	Angaben zu den PTGES2 R298H Probandengruppen	65
Tab. 24	PGE2-Spiegel nach 24h, abhängig von Genotyp und Geschlecht	66
Tab. A1	Vektorkarten und Restriktionsenzyme	109

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACSM	Acyl-CoA Synthetase <i>medium-chain</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
ATP III	<i>Adult Treatment Panel III</i>
AUC	<i>area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C/EBP- β	CCAAT/ <i>enhancer binding protein-β</i>
cAMP	cyclisches AMP
CAP	<i>Cbl-associated protein</i>
Cbl	<i>c-Cbl proto-oncogene</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CoA	Coenzym A
CRP	c-reaktives Protein
ddH ₂ O	<i>aqua bidest</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dias	diastolischer Blutdruck
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxy-ribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
EP	Prostaglandin E Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACoA	<i>fatty acyl-Coenzyme A</i>
FCS	<i>foetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FFA	<i>free fatty acids</i> (freie Fettsäuren)

FOXO	<i>forkhead transcription factor family</i>
GATE	<i>gamma-activated transcriptional element</i>
GBF-1	<i>GATE-binding factor 1</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLUT4	Glucosetransporter 4
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3	Glykogensynthasekinase 3
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HOMA BCF	<i>homeostasis model assessment beta-cell function</i>
HOMA IR	<i>homeostasis model assessment</i> Insulinresistenz
HPRT1	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HXM	<i>human xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase</i>
IDF	<i>International Diabetes Foundation</i>
IFG	<i>impaired fasting glucose</i> (gestörte nüchtern-Glucose)
IGM	<i>impaired glucose metabolism</i> (gestörter Glucosemetabolismus)
IGT	<i>impaired glucose tolerance</i> (gestörte Glucosetoleranz)
IKK β	<i>Inhibitor of NF-κB kinase-β</i>
IL-6	Interleukin 6
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
IR	Insulinrezeptor
IRF-9	<i>Interferon gene regulatory factor 9</i>
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KI	Konfidenzintervall
KOPS	<i>Kiel Obesity Prevention Study</i>
LB	<i>Luria Broth</i>
LD	<i>linkage disequilibrium</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MEM	<i>minimum essential media</i>
MICK	<i>Metabolic Intervention Cohort Kiel</i>

mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> (nicht-essentielle Aminosäuren)
NET	NaCl-EDTA-Tris Puffer
Ni-IDA	<i>nickel-iminodiacetic acid</i>
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
oGTT	oraler Glucosetoleranztest
oMTT	oraler Metabolischer Toleranztest
OR	<i>Odds Ratio</i>
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDK	<i>Phosphatidylinositol-dependent kinase</i>
PGC-1	PPAR γ Co-Aktivator 1
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PHLPP	<i>PH-domain leucine-rich-repeat protein phosphatase</i>
PI(3)K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat
PKA	cAMP abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
pp	postprandial
PP2A	phosphatase-2A
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator associated receptor γ</i>
pSer	Serinphosphorylierung
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue</i>
PTGES	Prostaglandin E Synthase
PTGES2	Prostaglandin E Synthase 2
PTGES3	cytosolische Prostaglandin E Synthase
PTP1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B
pTyr	Tyrosinphosphorylierung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	<i>sodium-dodecylsulfate</i> Polyacrylamidgelelektrophorese
SFM	Standardfehler des Mittelwerts
Shc	<i>Src-homolgy-2-containing protein</i>
SHIP2	<i>src-homology-2 domain-containing inositol phosphatase-2</i>
SHR	<i>spontaneously hypertensive rats</i>
SHRSP	SHR <i>stroke prone</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>
SREBP1c	<i>sterol regulatory element binding protein 1c</i>
SV40	Simianvirus Typ 40
Sys	systolischer Blutdruck
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBST	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i>
TC10	<i>small GTP-binding protein</i>
TCF7L2	<i>transcription factor 7-like 2</i>
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethyl-ethylendiamin
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TRB3	<i>Tribbles-3</i>
Typ 2 DM	Typ 2 Diabetes mellitus
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WHR	<i>waist to hip ratio</i>
WKY	Wistar Kyoto Ratten
XL	<i>xenobiotic/medium-chain ligase</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Eine Reihe von metabolischen Störungen die gehäuft auftreten und mit einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Typ 2 Diabetes mellitus (Typ 2 DM) verbunden sind, werden unter dem Begriff des Metabolischen Syndroms (auch als Syndrom X, Insulinresistenzsyndrom oder Tödliches Quartett bezeichnet) zusammengefasst [Reaven, 1988]. Die Diagnose des Metabolischen Syndroms beinhaltet je nach Definition Übergewicht (BMI oder Hüftumfang), Störungen des Lipidstoffwechsels (erhöhte Triglycerid-, erniedrigte HDL-Cholesterinspiegel), Störungen des Glucosestoffwechsels und der Insulinwirkung, erhöhten Blutdruck und Hyperalbuminurie (Tab. 1).

Tab. 1: Definitionen des Metabolischen Syndroms

	IDF (2006)	ATP III (2002)	WHO (1999)
Zentrales Übergewicht	Hüftumfang $\geq 94\text{cm}$ ♂ , $\geq 80\text{cm}$ ♀	$> 102\text{cm}$ ♂ , $> 88\text{cm}$ ♀	BMI > 30 oder WHR $> 0,9$ ♂ , $> 0,85$ ♀
Erhöhte Triglyceridspiegel	$\geq 150\text{mg/dl}$	$\geq 150\text{mg/dl}$	$\geq 150\text{mg/dl}$
Erniedrigtes HDL-Cholesterin	$< 40\text{mg/dl}$ ♂ , $< 50\text{mg/dl}$ ♀	$< 40\text{mg/dl}$ ♂ , $< 50\text{mg/dl}$ ♀	$< 35\text{mg/dl}$ ♂ , $< 39\text{mg/dl}$ ♀
Erhöhter Blutdruck	Sys ≥ 130 oder Dias $\geq 85\text{mm Hg}$	Sys ≥ 130 Dias $\geq 85\text{mm Hg}$	Sys ≥ 140 oder Dias $\geq 90\text{ mm Hg}$
Erhöhte Nüchtern-Glucosespiegel	$\geq 100\text{mg/dl}$ oder diagnostizierter Typ 2 DM	$\geq 110\text{mg/dl}$	Typ 2 DM, IFG, IGT
Albumine	-	-	$\geq 20\mu\text{g/min}$ oder Albumin:Creatinin $\geq 30\text{mg/g}$
Diagnose Metabolisches Syndrom wenn:	Zentrales Übergewicht + 2 weitere Merkmale	3 Merkmale	Insulinresistenz + 2 weitere Merkmale

IDF: International Diabetes Foundation [Zimmet *et al.*, 2005], ATP III: Adult Treatment Panel III [NCEP, 2001] WHO: World Health Organization [WHO, 1999]. Als vorhandenes Merkmal werden auch medikamentös behandelte Triglycerid- und HDL-Cholesterinspiegel und Bluthochdruck gewertet. BMI: *body mass index* [kg/m^2], WHR: *waist to hip ratio*, Sys: systolischer Blutdruck, Dias: diastolischer Blutdruck, IFG: *impaired fasting glucose*, IGT = *impaired glucose tolerance*

Trotz der zum Teil abweichenden Schwellenwerte und Voraussetzungen für die Diagnose des Metabolischen Syndroms spielen bei allen angegebenen Definitionen Übergewicht und damit verbundene Störungen des Fettstoffwechsels und Störungen

des Glucosestoffwechsels und der Insulinwirkung eine zentrale Rolle. Eine Hauptfolge solcher Störungen ist Typ 2 DM. Schätzungen sagen eine Steigerung der weltweiten Diabetesprävalenz in den nächsten 20 Jahren von 2,8 auf 4,4% voraus [Wild *et al.*, 2004]. Dies entspricht mehr als einer Verdoppelung der Diabetesfälle von 171 auf 366 Millionen (Abb. 1). Den Hauptteil (85 bis 95%) macht hierbei Typ 2 DM aus [IDF, 2003].

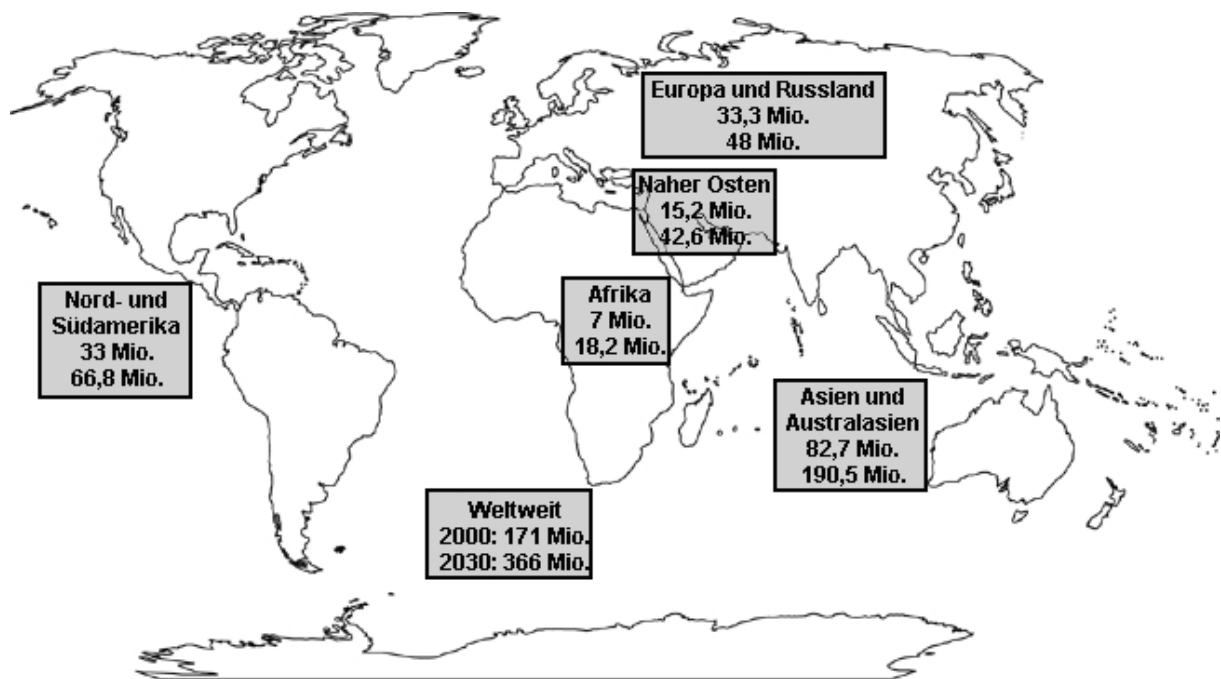


Abb. 1: Prävalenz von Diabetes weltweit und nach Regionen im Jahr 2000 und Schätzungen für 2030 [Wild *et al.*, 2004]

Den Lebensumständen, mit den Faktoren Ernährung und Bewegung, kommt eine große Bedeutung bei der Entstehung dieser Störungen zu, jedoch gibt es ebenfalls eine ausgeprägte genetische Komponente. Dies konnte in zahlreichen Familien- und Zwillingsstudien gezeigt werden. So wird zum Beispiel die Heritabilität des Körpergewichts zwischen 0,4 und 0,8 angegeben [Feinleib *et al.*, 1977; Katzmarzyk *et al.*, 2000; Selby *et al.*, 1989; Stunkard, Foch *et al.*, 1986; Stunkard *et al.*, 1990; Stunkard, Sorensen *et al.*, 1986], während die Angaben zu nüchternen und postprandialen Glucose- und Insulinspiegeln zwischen 0,1 und 0,7 liegen [Bergman *et al.*, 2003; Freeman *et al.*, 2002; Hanson *et al.*, 2001; Henkin *et al.*, 2003; Hsueh *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2004; Poulsen *et al.*, 1999; Watanabe R. M., Valle *et al.*, 1999]. Bei der Suche nach den genetischen Grundlagen muss davon ausgegangen werden, dass es sich hier nicht um monogenetische Faktoren handelt, sondern eine Vielzahl

von Genen konzentriert an der Entwicklung der komplexen Krankheitsbilder beteiligt sind (polygenetische Erkrankung). Von großem Interesse für ihre Erforschung sind hier *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), die einen großen Teil der Variation des menschlichen Genoms ausmachen. SNPs werden als genetische Marker und mögliche ursächliche Variationen für die Untersuchung der Verbindung einzelner Gene mit bestimmten Phänotypen genutzt. Die Suche nach solchen genetischen Faktoren wird in Form von Assoziationsstudien durchgeführt. Hierbei werden in Fall-Kontroll-Studien Gruppen von Trägern eines bestimmten Phänotyps wie z.B. Typ 2 DM mit einer Kontrollgruppe ohne dieses Merkmal verglichen.

Es werden grundsätzlich zwei Arten von Assoziationsstudien unterschieden. Zum einen der Kandidatengenansatz, wobei Gene und SNPs aufgrund ihrer Funktion oder chromosomalen Lokalisation als Kandidaten für Assoziationsstudien ausgewählt werden. Im Gegensatz hierzu stehen *whole genome association studies*, wobei in einem Gesamtansatz das Genom unabhängig von bestehenden Hypothesen mittels Hochdurchsatzverfahren untersucht wird. Die größten Herausforderungen bei der Identifizierung relevanter SNPs bestehen darin, dass einzelne Varianten isoliert betrachtet nur einen sehr geringen Einfluss auf den Phänotyp haben und möglichst große Kohorten untersucht werden müssen, um Effekte darstellen zu können. Der starke Einfluss der jeweiligen Lebensumstände als Störvariablen ist ebenfalls schwierig zu berücksichtigen. Daher gibt es trotz einer großen Anzahl publizierter Studien bisher nur wenige genetische Varianten, für die mehrere unabhängige Untersuchungen Assoziationen mit bestimmten Merkmalen bestätigen konnten [Hirschhorn *et al.*, 2002].

Als Beispiele für robuste Assoziationen seien hier der Prolin/Alanin Austausch an Position zwölf des Transkriptionsfaktors *peroxisome proliferator associated receptor- γ* (PPAR γ) im Zusammenhang mit Übergewicht und Typ 2 DM [Altshuler *et al.*, 2000; Deeb *et al.*, 1998; Ek *et al.*, 1999; Kao *et al.*, 2003; Robitaille *et al.*, 2003] und das erst kürzlich als neues Typ 2 DM-Kandidatengen beschriebene *transcription factor 7-like 2* (TCF7L2)-Gen genannt [Cauchi *et al.*, 2006; Damcott *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2006; Groves *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2006; Zhang C. *et al.*, 2006].

1.1 Mechanismen der Insulinresistenz – Rolle von Fettstoffwechsel und Inflammation

Der Insulinresistenz kommt eine zentrale Bedeutung bei der Entwicklung des Typ 2 DM zu. Im Folgenden sollen die Wirkungen des Hormons im Organismus dargelegt und die intrazelluläre Insulinsignalkaskade vorgestellt werden. Hierauf aufbauend werden die wichtigsten bekannten molekularen Mechanismen der Insulinresistenz bzw. der gestörten Insulinsignalweiterleitung und ihre Auslöser besprochen.

1.1.1 Insulinwirkung und Insulinsignalkaskade

Dem Insulin als Hormon, das die Senkung des Blutglucosespiegels bewirkt, kommt eine zentrale Bedeutung im Metabolismus zu. Die Wirkungen des Hormons werden in den verschiedenen peripheren Geweben zum Teil unterschiedlich vermittelt (Abb. 2). Die Senkung des Blutglucosespiegels beruht auf der Aktivierung des Glucosetransporters 4 (GLUT4) über die Insulinsignalkaskade im Fettgewebe und in der Skelettmuskulatur. Die Phosphorylierung der Glykogensynthasekinase-3 (GSK3) durch die Kinase Akt und die daraus folgende Aktivierung der Glykogensynthase bewirken eine Steigerung der Glykogenese in Leber und Skelettmuskel. Über Akt kann ebenfalls eine Phosphodiesterase aktiviert werden, was die Senkung der intrazellulären cAMP-Spiegel zur Folge hat. Hierauf kommt es zu einer Inaktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA). Dies führt sowohl zur Hemmung der hormonsensitiven Lipase und damit der Lipolyse im Fettgewebe und der Hemmung cAMP-abhängig regulierter Enzyme der Gluconeogenese in der Leber als auch zur Hemmung der Glykogenolyse in Leber und Skelettmuskel.

Zur Wirkung von Insulin gehört außerdem die Steuerung der Expression wichtiger Gene des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels, die über die Transkriptionsfaktoren der *forkhead family* FOXO [Nakae *et al.*, 1999], den PPAR γ Co-Aktivatoren PGC-1 [Yoon *et al.*, 2001] und das *sterol regulatory element binding protein 1c* SREBP1c [Foretz *et al.*, 1999] vermittelt werden. Hierzu gehört die Induktion der Lipoproteinlipase, die die Spaltung von VLDL (*very low density lipoproteins*) vermittelt. Ebenfalls sind die Induktion von Enzymen der Glykolyse und Lipogenese und die Inhibierung von Enzymen der Gluconeogenese als Ziele der durch Insulin regulierten Genexpression zu nennen.

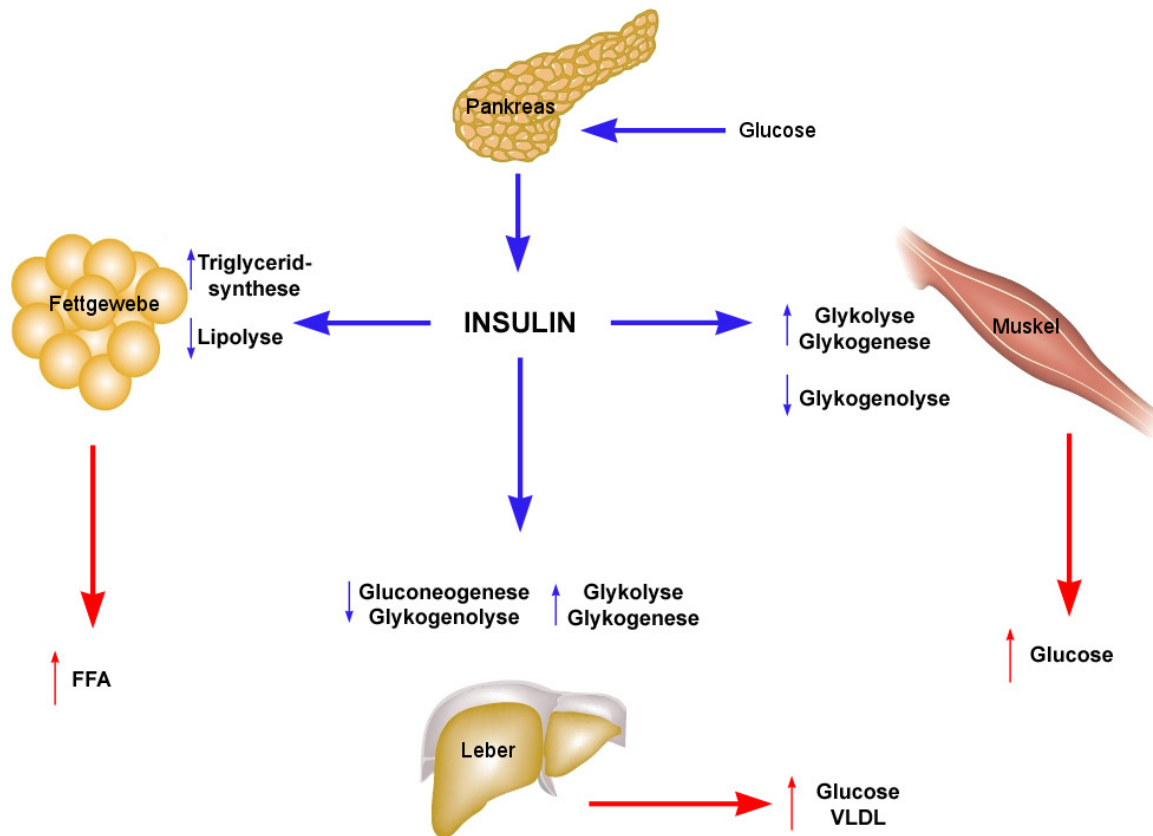


Abb. 2: Normale Insulinwirkung (blaue Pfeile) und Auswirkungen der Insulinresistenz (rote Pfeile), modifiziert nach [Stumvoll *et al.*, 2005]

FFA: *free fatty acids* (freie Fettsäuren), VLDL: *very low density lipoprotein*

Im Zustand der Insulinresistenz, das heißt der verringerten Wirkung von Insulin auf die peripheren Gewebe, kommt es jedoch trotz ausreichender oder auch übermäßiger Insulinproduktion (Hyperinsulinämie) zu Hyperglykämie und Dyslipidämie wie in Abb. 2 dargestellt. Der Endpunkt dieser Entwicklung manifestiert sich in der Zerstörung der pankreatischen β -Zellen und damit in Typ 2 DM.

Die Insulinwirkung wird in insulinresistiven Geweben über eine intrazelluläre Signalkaskade vermittelt, diese ist in Abb. 3 schematisch dargestellt [Taniguchi *et al.*, 2006]. Die Beeinträchtigung einer oder mehrerer Komponenten dieses Signalwegs führt zu verminderter Signalweiterleitung und damit zur Insulinresistenz.

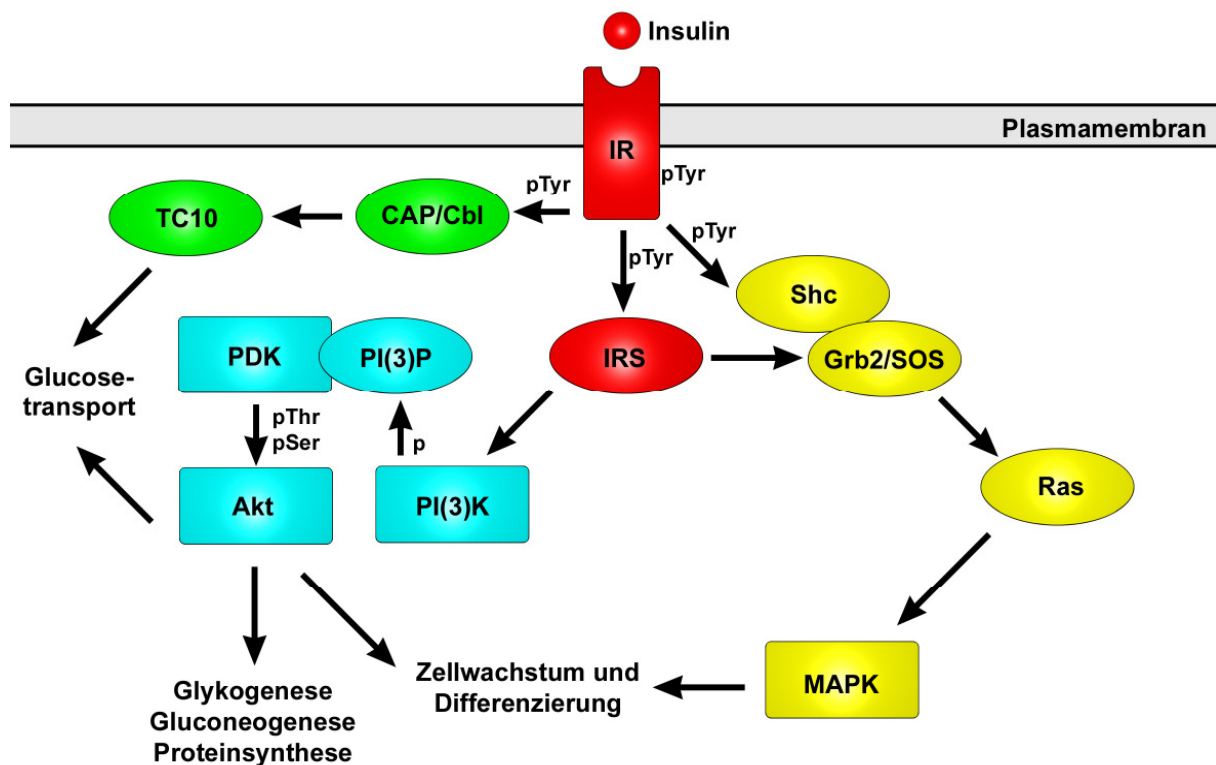


Abb. 3: Schematische Darstellung der Insulinsignalkaskade

IR: Insulinrezeptor, IRS: Insulinrezeptorsubstrat, PI(3)K: Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI(3)P: Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat, PDK: *Phosphatidylinositol-dependent Kinase*, Akt: Proteinkinase B (PKB), CAP: *Cbl-associated protein*, Cbl: *c-Cbl proto-oncogene*, TC10: *small GTP-binding protein*, Shc: *Src-homology-2-containing protein*, Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*, SOS: *son of sevenless*, MAPK: *mitogen activated protein kinase*, pTyr: Tyrosinphosphorylierung, pSer: Serinphosphorylierung, p: Phosphorylierung

Mit Hilfe von murinen *knockout*-Modellen einzelner Komponenten der Insulinsignalkaskade konnte bereits eine Vielzahl von Phänotypen der Insulinresistenz charakterisiert werden. Ein *knockout* des Insulinrezeptors führt innerhalb kurzer Zeit zum Tod, während gewebsspezifische *knockouts* zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen. Das Fehlen des Insulinrezeptors im Skelettmuskel führt zwar zu einer vermehrten Fettmasse und erhöhten Triglyceriden und freien Fettsäuren, jedoch nicht zu einer gestörten Glucosetoleranz [Bruning *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000]. Im Gegensatz hierzu führt das Fehlen des Insulinrezeptors in der Leber zu gestörter Glucosetoleranz und Hyperinsulinämie [Michael *et al.*, 2000], in pankreatischen β -Zellen zu einer verminderten glucosestimulierten Insulinsekretion und Glucosetoleranz [Kulkarni *et al.*, 1999] und im Gehirn unter anderem zu gesteigertem Appetit und Insulinresistenz [Bruning *et al.*, 2000].

Die Untersuchung verschiedener Insulinrezeptorsubstrat-Isoformen (IRS) zeigt, dass diese scheinbar sehr unterschiedliche Wirkungen vermitteln. Der *knockout* von IRS-1 führte zu Insulinresistenz und gestörter Glucosetoleranz [Araki *et al.*, 1994; Kido *et al.*, 2000; Tamemoto *et al.*, 1994] und von IRS-2 zu Insulinresistenz, vermindertem β -Zellwachstum und Typ 2 DM [Kido *et al.*, 2000; Withers *et al.*, 1998]. Im Gegensatz hierzu weisen IRS-3/4 *knockouts* normales Wachstum und Glucosetoleranz auf [Fantin *et al.*, 2000; Tsuruzoe *et al.*, 2001]. Der *knockout* der Kinase Akt2 führte zu Insulinresistenz in Leber und Skelettmuskel [Cho *et al.*, 2001]. Das Fehlen des insulinabhängigen Glucosetransporters GLUT4 sowohl im Skelettmuskel als auch im Fettgewebe führte unter anderem zu Insulinresistenz in der Leber [Abel *et al.*, 2001; Zisman *et al.*, 2000]. Diese Ergebnisse zeigen, dass abhängig von der betrachteten Komponente der Signalkaskade und des Gewebes unterschiedliche Störungen des Glucose- und Fettstoffwechsels und Ausprägungen der Insulinresistenz zu beobachten sind.

1.1.2 Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz

Die molekularen Mechanismen, die zu einer verminderten Signalweiterleitung ausgehend vom Insulinrezeptor führen können, sind in Abb. 4 dargestellt. Der Insulinrezeptor, der durch Autophosphorylierung an Tyrosinresten aktiviert wird, kann durch Phosphatasen wieder dephosphoryliert und somit inaktiviert werden. Dies wurde für die Proteintyrosinphosphatase 1B (PTP1B) gezeigt [Elchebly *et al.*, 1999]. Insulinrezeptorsubstrate können durch die Phosphorylierung an Serinresten inhibiert werden. Dies führt am Ser307 des IRS-1 der Ratte dazu, dass die Interaktion des Insulinrezeptorsubstrats mit dem Insulinrezeptor gestört ist. Als Serinkinasen, die an diesen Vorgängen beteiligt sind, werden die c-jun N-terminale Kinase (JNK), die *Inhibitor of NF κ B-Kinase* (IKK) und die Proteinkinase C θ (PKC θ) diskutiert [Aguirre *et al.*, 2000; Aguirre *et al.*, 2002; Gao Z. *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2004; Paz *et al.*, 1997]. Als weiterer hemmender Mechanismus auf Ebene von Insulinrezeptor und -substrat wurden die *suppressor of cytokine signalling* (SOCS) Proteine beschrieben, die Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus von Cytokinsignalen sind [Krebs und Hilton, 2000]. Es konnte gezeigt werden, dass SOCS-1, -3 und -6 direkt an den Insulinrezeptor binden und damit die Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate 1 und 2 hemmen können [Emanuelli *et al.*, 2001; Mooney *et al.*, 2001; Ueki *et al.*, 2004]. SOCS-1 und -3 scheinen auch in

der Lage zu sein, den ubiquitinvermittelten Abbau der Insulinrezeptorsubstrate 1 und 2 zu steigern [Rui *et al.*, 2002].

Auch die dem Insulinrezeptor und -substrat nachgeschalteten Komponenten der Insulinsignalkaskade können gehemmt werden. So führt eine Dephosphorylierung des vom Phosphatidylinositol-(3)-Kinase gebildeten Phosphatidylinositol-3-phosphats zu einer verminderten Rekrutierung der PI-abhängigen Kinase und damit zu einer verminderten Aktivierung von Akt. Hieran sind die Phosphatasen *phosphatase and tensin homologue* (PTEN) und *src-homology-2 domain containing inositol phosphatase-2* (SHIP2) beteiligt [Maehama und Dixon, 1999; Sleeman *et al.*, 2005; Wada *et al.*, 1999; Wijesekara *et al.*, 2005]. Auch die Akt-Kinase selbst kann, ähnlich wie für den Insulinrezeptor beschrieben, durch Dephosphorylierung inaktiviert werden. Diese wird durch die Phosphatasen *PH-domain leucine-rich-repeat protein phosphatase* (PHLPP) und Phosphatase-2A (PP2A) vermittelt [Gao T. *et al.*, 2005; Resjo *et al.*, 2002]. Abschließend sei noch die mögliche Blockierung der Akt-Kinase durch Bindung des *tribbles homologue 3* (TRB3) genannt [Du *et al.*, 2003; Koo *et al.*, 2004].

Bei den Signalen, die zu einer Aktivierung der genannten inhibitorischen Mechanismen führen, handelt es sich vor allem um Fettsäuren bzw. deren Metabolite und proinflammatorische Signale wie die Interleukine *tumor necrosis factor- α* (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6) (Abb. 4).

Fettsäuren

Fettsäuren werden in Form von freien Fettsäuren durch Lipolyse der gespeicherten Triglyceride im Fettgewebe gebildet und gelangen so im Blut zu den Geweben, die nicht obligatorisch auf Glucose zur Deckung des Energiebedarfs angewiesen sind. Triglyceride, die im Blut in Form von Lipoproteinen transportiert werden, werden aus der Nahrung als Chylomikronen und von der Leber als VLDL in das Blut abgegeben. Durch die insulinabhängig aktivierbare Lipoproteinlipase werden diese Triglyceride an den Zielorganen wieder in freie Fettsäuren und Glycerin überführt, damit sie von den Geweben aufgenommen werden und dort abgebaut oder auch gespeichert werden können. Metabolite dieser Fettsäuren, die intrazellulär vorkommen, sind zum Beispiel Acyl-CoAs, Diacylglycerine und Ceramide.

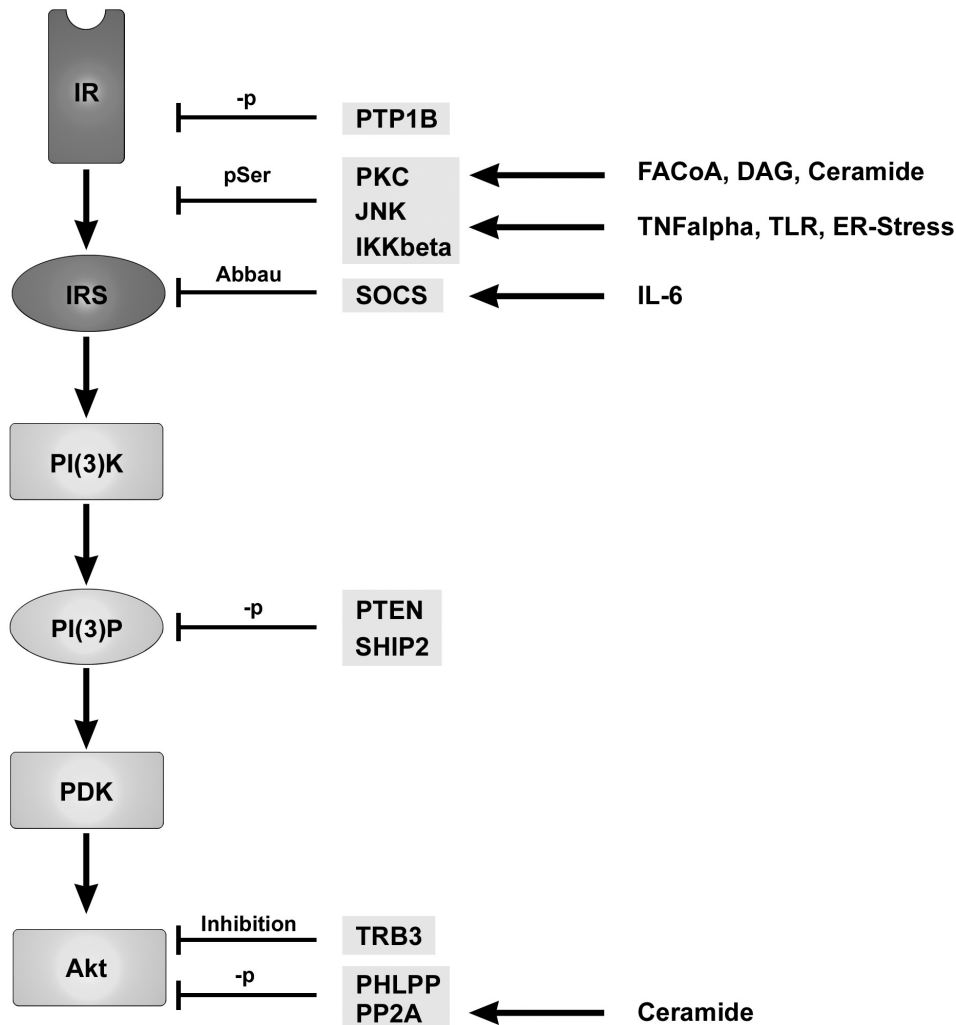


Abb. 4: Molekulare Mechanismen der Insulinresistenz - Störungen der intrazellulären Insulinsignalkaskade und ihre Auslöser

PTP1B: Protein Tyrosin Phosphatase 1B, PKC: Proteinkinase C, JNK: c-Jun-N-terminale Kinase, IKKbeta: *Inhibitor of NF- κ B kinase- β* , SOCS: *suppressor of cytokine signalling*, PTEN: *phosphatase and tensin homologue*, SHIP2: *src-homology-2 domain-containing inositol phosphatase-2*, TRB3: Tribbles-3, PHLPP: *PH-domain leucine-rich-repeat protein phosphatase*, PP2A: phosphatase-2A, FACoA: *fatty acyl-Coenzyme A*, TNFalpha: *tumor necrosis factor α* , TLR: *toll-like receptor*, ER: Endoplasmatisches Retikulum, IL-6: Interleukin-6

Nach einer Lipidinfusion konnte im Skelettmuskel von Ratten die Aktivierung der Proteinkinase C θ und eine damit verbundene verminderte IRS-1 Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden [Griffin *et al.*, 1999]. In späteren Experimenten konnte in diesem Zusammenhang ebenfalls die intrazelluläre Akkumulation von Acyl-CoA und Diacylglycerinen gezeigt werden [Yu *et al.*, 2002]. Auch für die Leber wurden ähnliche Mechanismen der Diacylglycerinakkumulation und die Aktivierung verschiedener Kinasen (Proteinkinase C δ und ϵ , JNK-1 und

IKK β) nach einer Lipidinfusion aufgezeigt [Boden *et al.*, 2005; Samuel *et al.*, 2004]. Die Aktivierung der IKK führt des Weiteren zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und infolgedessen zur verstärkten Expression weiterer proinflammatorischer Transkripte. Ceramide, die mit gesteigertem Fettsäureangebot aus Acyl-CoA gebildet werden, wurden als Aktivatoren von PKC ζ [Bourbon *et al.*, 2000] und der Phosphatase 2A [Dobrowsky und Hannun, 1992; Dobrowsky *et al.*, 1993] beschrieben. Die genannten Kinasen wurden bereits mit einer verminderten Insulinsignalweiterleitung in Verbindung gebracht.

Eine erhöhte Ausschüttung von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe wird vor allem bei vermehrter Fettmasse und im Besonderen aus visceralem Fettgewebe beobachtet [Despres *et al.*, 1985; Despres *et al.*, 1989]. Hierbei wird bei Übergewicht im visceralen Fett gleichzeitig eine Vergrößerung und vermehrte Anzahl von Adipocyten [Kissebah *et al.*, 1982; Krotkiewski *et al.*, 1983; Rebuffe-Scrive *et al.*, 1989], eine verringerte Insulinsensitivität [Bolinder *et al.*, 1983; Zierath *et al.*, 1998] und eine vermehrte Einwanderung von Makrophagen [Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003] beobachtet. Ein weiteres Merkmal, das mit Insulinresistenz in Skelettmuskel und Leber in Verbindung gebracht wird, ist eine ektopische Akkumulation von Triglyceriden in diesen Geweben. Dies kann bereits bei normalgewichtigen Personen festgestellt werden [Krssak *et al.*, 1999; Perseghin *et al.*, 1999; Seppala-Lindroos *et al.*, 2002]. Als eine weitere Ursache für die intrazelluläre Akkumulation von Fettsäuremetaboliten werden Funktionsstörungen der Mitochondrien diskutiert [Kelley *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2004].

Inflammatorische Signale

Eine Reihe der genannten Enzyme und Proteine, die bei der Unterdrückung des Insulinsignals eine Rolle spielen, können durch proinflammatorische Signale angesprochen werden. Es ist bekannt, dass bei Übergewicht das Fettgewebe und eingewanderte Makrophagen verstärkt solche Signale in Form von Cytokinen bilden und auf diesem Weg zur Insulinresistenz beitragen können [Hotamisligil *et al.*, 1995; Hotamisligil *et al.*, 1993; Kern *et al.*, 1995; Rotter *et al.*, 2003; Vozarova *et al.*, 2001]. Zu diesen gehört zum Beispiel der *tumor necrosis factor α* (TNF α), der über eine Signalkaskade die bereits erwähnten Kinasen JNK und IKK aktivieren kann. Diese können des Weiteren auch durch den Signalweg des *toll-like receptor 4* (TLR4), der an der unspezifischen Immunantwort beteiligt ist, aktiviert werden. Für diese Arbeit

interessant ist hierbei, dass der TLR4 auch durch freie Fettsäuren angesprochen werden kann. Hierbei wirken vor allem gesättigte Fettsäuren und solche der Kettenlänge C12 bis C18 [Lee *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2006]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen kann zum Beispiel durch Unterdrückung der TNF α -Expression [Uysal *et al.*, 1997; Ventre *et al.*, 1997] und Inhibition von IKK durch hohe Dosen von Salicylaten [Kim *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2001] ein protektiver Effekt erzielt werden.

Ein weiteres Cytokin, das in diesem Zusammenhang wirkt, ist Interleukin-6 (IL-6). Über dessen Rezeptor und einen Janus-Kinase/*signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) vermittelten Signalweg werden die bereits erwähnten SOCS-Proteine induziert [Starr *et al.*, 1997], die an der Hemmung der Insulinsignalkaskade beteiligt sind.

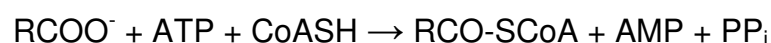
Eine weitere erst kürzlich beschriebene Verbindung zwischen akkumulierten Fettsäuren und deren Metaboliten, inflammatorischen Signalen und Insulinresistenz stellt Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER) dar. Dieser wird durch eine Anflutung von Metaboliten und inflammatorische Signale ausgelöst, wodurch wiederum die beschriebenen JNK und IKK/NFKB Signalwege angesprochen werden können [Hu P. *et al.*, 2006; Ozcan *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2005]. Eine Verminderung von ER-Stress durch Chaperone führt hingegen zu verbesserter Insulinresistenz und Glucosehomeostase [Ozawa *et al.*, 2005; Ozcan *et al.*, 2006].

Insulinresistenz ist ein komplexer Mechanismus der von vielen Faktoren beeinflusst wird. Es zeigt sich jedoch, dass vor allem der Fettstoffwechsel und inflammatorische Signale eine zentrale Rolle bei ihrer Entstehung spielen.

1.2 Untersuchte Gene

1.2.1 Acyl-CoA Synthetasen *medium-chain* (ACSM)

Acyl-CoA Synthetasen katalysieren die ATP-abhängige Aktivierung von Fettsäuren zu deren Thioestern, der initialen Reaktion des Fettstoffwechsels.



Bereits in den 50er Jahren wurde von Mahler aus Rinderlebern eine Acyl-CoA Synthetase mit Substratspezifitäten für C₃–C₁₃ Fettsäuren und xenobiotische Carboxylsäuren (Benzoessäure, Phenyllessigsäure und Dichlorophenoxyessigsäure) isoliert [Mahler *et al.*, 1953]. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass nur ein Enzym an diesen Reaktionen beteiligt sei („Mahler-Enzym“). In späteren Arbeiten konnten jedoch aus Mitochondrien der Lebern von Rindern und Meerschweinchen weitere Acyl-CoA Synthetasen isoliert werden [Groot, 1976; Killenberg *et al.*, 1971]. Diese setzen neben mittelkettigen Fettsäuren auch Salicylate („Salicyl-CoA Ligase“) bzw. kurzkettige Fettsäuren („Propionyl-CoA Ligase“) um. Eine genauere Charakterisierung der einzelnen Enzyme und ihrer codierenden Gene gelang erst über 40 Jahre nach der ersten Beschreibung. Aus den Mitochondrien von Rinderlebern konnten drei distinkte Acyl-CoA Synthetasen mit Molekulargewichten zwischen 53 und 55,5 kDa isoliert werden (*xenobiotic/medium-chain ligases*; XL-I, XL-II und XL-III), die Substratspezifitäten für mittelkettige Fettsäuren und xenobiotische Carboxylsäuren aufwiesen [Vessey und Hu, 1995]. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte im Folgenden auch in humaner Leber zwei homologe Acyl-CoA Synthetasen nachweisen, die von ihnen *human xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase* HXM-A und HXM-B genannt wurden [Vessey *et al.*, 1999]. Die partielle Sequenzierung der Aminosäuresequenz der bovinen XL-I Form ergab eine starke Homologie zu einem Protein, das zuvor als Kandidatengen (SA-Gen) für Bluthochdruck beschrieben wurde, da es vermehrt in den Nieren hypertensiver Ratten nachgewiesen werden konnte [Vessey und Kelley, 1997]. Anhand der cDNA-Sequenz des in der Ratte identifizierten SA-Gens wurde das humane Gen identifiziert. Die Aminosäuresequenz beider Proteine wies eine 84%ige Übereinstimmung auf und es konnten ebenfalls Sequenzhomologien zur Acetyl-CoA Synthetase festgestellt werden [Iwai *et al.*, 1994]. Insgesamt wurden bisher vier Acyl-CoA Synthetasen der *medium-chain* Familie identifiziert werden. Sie werden hauptsächlich in Niere und Leber exprimiert und die Gene sind auf Chromosom 16p12–13 lokalisiert [Fujino *et al.*, 2001; Iwai *et al.*, 2003; Samani *et al.*, 1994], Tab. 2. Eine Besonderheit bildet hier das ACSM2-Gen, das aufgrund einer chromosomalen Duplikation in zwei Formen (ACSM2A und B) vorkommt (Abb. 5), die in gegensätzlicher Orientierung auf Chromosom 16 angeordnet sind [Cao *et al.*, 1999; Loftus *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2004]. Ihre mRNA-Sequenz unterscheidet sich hauptsächlich im Bereich der 5'-UTR. Des Weiteren wurde ein spezifisch im

olfaktorischen Epithel exprimiertes Mitglied dieser Familie identifiziert, das auf Chromosom 12 lokalisiert ist [Oka *et al.*, 2003], jedoch in den Untersuchungen dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt wurde (in Tab. 2 grau unterlegt).

Tab. 2: Bezeichnungen der Acyl-CoA Synthetasen *medium-chain*

HGNC	Synonyme	mRNA und Protein	Datenbank-Identifikation
ACSM1	MACS1, BUCS1	2051 nt 577 AS	NM_052956.2 NP_443188.2
ACSM2A	ACSM2, loc123876	2969 nt 577 AS	NM_001010845.2 NP_001010845.1
ACSM2B	MACS2, HXMA, ACSM2	2444 nt 577 AS	NM_182617.3 NP_872423.3
ACSM3	SA, SAH	2158 nt 586 AS	NM_005622.3 NP_005613.2
ACSM4	O-MACS	1743 nt 580 AS	NM_001080454.1 NP_001073923.1
ACSM5	MACS3, FLJ20581	2428 nt 579 AS	NM_017888.2 NP_060358.2

Das nicht auf Chromosom 16 lokalisierte ACSM4-Gen ist grau unterlegt. HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee, HUGO: Human Genome Organisation, AS: Aminosäuren, nt: Nukleotid



Abb. 5: Lokalisation der ACSMs auf Chromosom 16

In der Abbildung sind weitere bekannte Gene im chromosomalen Bereich 16p12/13 (schwarz unterlegter Bereich auf dem Chromosom) dargestellt, die in der Nähe der ACSMs lokalisiert sind (hellgrau).

Die Aminosäuresequenzen aller ACSMs weisen eine Ähnlichkeit von 51 bis 60% (im Fall von ACSM2A und B 97%) auf (ClustalW2 Alignment Scores, nach [Myers und Miller, 1988]). Ein wichtiges Motiv dieser Proteinfamilie bildet die AMP-bindende Domäne, deren Konsensus-Sequenz (Prosite PS00455) lautet:

[LIVMFY]-{E}-{VES}-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-x-[PASLIVM]-[KR]

(in Abb. 6 grau unterlegt).

ACSM3	MLARVTRKMLRHAACFQRLAIFGVSVALHKDNRTATPQNFNSYESMKQDFKLGIPYFNF	60
ACSM4	-----MKIFFRYQTRFRFJWLTKPPGRRLHKDHQLWTLPLTLADFEAINRCNRP-LPKNFNF	54
ACSM5	-----MRPWLRLHLVLQALRNSRAFCSHGKPAFLPVQKIVATWEAISLGRQLVPEYFNF	55
ACSM2A	-----MHWLKRVQGLCTLWGTQMSRTLYINSRQLVSLQWG-----HQEVPKFNF	46
ACSM2B	-----MHWLKRVQGLCTLWGTQMSRTLYINSRQLVSLQWG-----HQEVPKFNF	46
ACSM1	-----MQWLMRFRTLWGIHKSFHNIHPAPSQRLRCRSLSEFG-----APRWNDYEVPEEFNF	51
	: : : *	
ACSM3	AKDVLDDQWTDKEKAGKPPSNPAFWWINRNGEEMRWSFEELGSLSRKFANILSEACSLQRG	120
ACSM4	AADVLDDQWSQKEKTGERPANPALWVWNGKGDEVKWSFRELGSLSRKAANVLTQPCGLQRG	114
ACSM5	AHDVLDVWSRLEEAGHRPPNPAFWVWNGTGAEIKWSFEELGKQSRKAANVLGGACGLQPG	115
ACSM2A	ASDVLDDHWADMEKAGKRLPSPALWVWNGKGKELMNFRELSSENSQQAANVLSGACGLQRG	106
ACSM2B	ASDVLDDHWADMEKAGKRLPSPALWVWNGKGKELMNFRELSSENSQQAANVLSGACGLQRG	106
ACSM1	ASYVLDYWAQKEKEGKRGPNPAFWVWNGQGDEVKWSFREMGLTRRVANVFTQTCGLQQG	111
	* ** * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACSM3	DRVILILPRVPEWLANVAACLRTGTVLIPGTTQLTQKDILYRLQSSKANCITNDVLAPA	180
ACSM4	DRLAVILPRIPPEWLVNVACIRGTGIFMPGTIQLTAKDILYRLRASKAKCIVASEEVAPA	174
ACSM5	DRMMLVLPRLPEWLVSVACMRTGIVMIPGVTLTEKDLKYLQASRAKSIITSDSLAPR	175
ACSM2A	DRVAVVLPRVPEWLVILGICIRAGLIFMPGTIQMKSTDILYRLQMSKAKAIVAGDEVIQE	166
ACSM2B	DRVAVMLPRVPEWLVILGICIRAGLIFMPGTIQMKSTDILYRLQMSKAKAIVAGDEVIQE	166
ACSM1	DHLALMLPRVPEWLVAVGCMRTGIIIFPATILKAKDILYRLQMSKAKGIVTIDALASE	171
	* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACSM3	VDAVASKCENLHSLKLVSENSREGWNLKELMKHASDSHTCVKTKHNEIMAIFFTSGTSG	240
ACSM4	VESIVLECPDLKTKLLVSPQSWNGWLSFQELQFASEEHSCVETGSQPMIYFTSGTTG	234
ACSM5	VDAISAECPSLQTKLLVSDSRPGWLNFRRELLREASTEHCNMRKSRDPLAIYFTSGTTG	235
ACSM2A	VDTVASECPSLRILKLLVSEKSCDGLWLNFKKLLNEASTHHCVETGSQEASAIYFTSGTSG	226
ACSM2B	VDTVASECPSLRILKLLVSEKSCDGLWLNFKKLLNEASTHHCVETGSQEASAIYFTSGTSG	226
ACSM1	VDSIASQCPSLTKLLVSDHSREGWLDLFRSLVKSASPEHTCVKSKTLDPMVIFFTSGTTG	231
	* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACSM3	YPKMTAHTHSSFGLGLSVNGRFWLDLTPSDVMWNTSDTGWAKSAWSSVFSPIWQACVFT	300
ACSM4	FPKMAQHSQSSSLGIGFTLCGRYWLDLKSSDIIWNMSDTGWVKAAGISVFSWLCGACVVF	294
ACSM5	APKMVEHSQSSYGLGFVAGRRRVALTESDIFWNTTDTGWVKAAWT-LFSAWPNGSCIFV	294
ACSM2A	LPKMAEHSYSSSLGLKAKMDAG-WTGLQASDIMWTISDTGWILNLLCSLMEPWALGACTFV	285
ACSM2B	LPKMAEHSYSSSLGLKAKMDAG-WTGLQASDIMWTISDTGWILNLLCSLMEPWALGACTFV	285
ACSM1	FPKMAKHSGLALQSPFPGSRKRLSLKTSDVSWCLSDSGWIVATIWTLVEPWTAGCTVFI	291
	* * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACSM3	HHLPRFEPTSILQTLISKYPIVFCAPTYYRMLVQNDITSYKFKSLKHCVSAGEPITPDV	360
ACSM4	HRMAQFDTDTFLDTLTYPIITLCSPPTYRMLVQKDLKRYKFKSLRHCLTGGEPLNPEV	354
ACSM5	HELPRVDAKVLNLTLSKFPITLCCVPTIFRLLVQEDLTRYQFQSLRHCLTGGEALNPDV	354
ACSM2A	HLLPKFDPLVILKTLSSYPIKSMGAPIVYRMLLQDDLSSYKFPHLQNCVTVGESLLPET	345
ACSM2B	HLLPKFDPLVILKTLSSYPIKSMGAPIVYRMLLQDDLSSYKFPHLQNCVTVGESLLPET	345
ACSM1	HHLPQFDTKVLIQTLKYPINHFVWVSSIYRMLQDDFTSIRFPALHEHCYTGGEVVLPKD	351
	* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACSM3	TEKWRNKTGLDIYEGYQGTETVLCGNFKGMKIKPGSMGKPSPAFDVKIVDVNGNVLPPG	420
ACSM4	LEQWRVQTGLELYEGYQGTETVGMICANQKQGEIKPGSMGKMLPYDVQIIDENGNLPPG	414
ACSM5	REKWKHQGTGVELYEGYQGTETVVICANPKGMKIKSGSMGKASPPYDVQIVDEGNLPPG	414
ACSM2A	LENWRAQTGLDIRESYGQGTETGLTCMVSKTMKIKPGYMGTAASCYDVQIIDDKGNLPPG	405
ACSM2B	LENWRAQTGLDIREFYGQGTETGLTCMVSKTMKIKPGYMGTAASCYDVQIIDDKGNLPPG	405
ACSM1	QEEWKRRTGLLLYENYQSETGLICATYWGMIKPGFMGKATPPYDVQIIDDKGSILPPN	411
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACSM3	QEGDIGIQVLPNRPFFGLFTHYVDNPSKTAATLRGNFYITGDRGYMDKDGYPFVARADDV	480
ACSM4	KEGEIALRLKPTRPFCFFSKYVDNPKQTAATIRGDFYVITGDRGVMDSQGYFWFVGRADDV	474
ACSM5	EEGNVAVRIRPTRPFCFFNCYLDNPEKTAASEQGFYITGDRARMKDKGYFWMGRNDV	474
ACSM2A	TEGDIGIRVKPIRPIGIFSGYVDNPKTAANIRGDFWLLGDRGKDEDGYFQFMGRADDI	465
ACSM2B	TEGDIGIRVKPIRPIGIFSGYVDNPKTAANIRGDFWLLGDRGKDEDGYFQFMGRADDI	465
ACSM1	TEGNIGIRIKPVRPVSLFMCYVEGDPEKTAKVECGDYNTGDRGKMDEEGYICFLGRSDDI	471
	* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACSM3	ILSSGYRIGPFEVENALNEHPSVAESAVVSSPDPIRGEVVKAFVVLNPDYKSHDQEQLIK	540
ACSM4	IISSGYRIGPFEVESALIEHPAVVESAVVSSPDQIRGEVVKAFVVLAAFPKSYNPEKLT	534
ACSM5	INSSSYRIGPFEVESALAEHPAVLESAVVSSPDPIRGEVVKAFIVLTPAYSSHDPALTR	534
ACSM2A	INSSGYRIGPSEVENALMEHPAVVETAVISSPDVPRGEVVKAFVVLASQFLSHDPEQLTK	525
ACSM2B	INSSGYRIGPSEVENALMKHPAVVETAVISSPDVPRGEVVKAFVVLASQFLSHDPEQLTK	525
ACSM1	INASGYRIGPAEVESALVEHPAVAESAVVSSPDPIRGEVVKAFIVLTPQFLSHDKDQLTK	531
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
ACSM3	EIQEHVKKTTAPYKYPRKVEFIQELPKTISGKTKRNLKKEWKT----- 586	
ACSM4	ELQDHVKKSTAPYKYPRKVEFVQELPKTITGKIKRNLVLRDQEWGR----- 580	
ACSM5	ELQEHVKKRVTAPYKYPRKVAFVSELPKTVSGKIQRSKLRSQEWGK----- 579	
ACSM2A	ELQQHVKSVTAPYKYPRKIEFVNLNPKTVTGTGKIQRAKLRDKKEMKSGKARAQ 577	
ACSM2B	ELQQHVKSVTAPYKYPRKIEFVNLNPKTVTGTGKIQRAKLRDKKEMKSGKARAQ 577	
ACSM1	ELQQHVKSVTAPYKYPRKVEFVSELPKTITGKIERKELRKKETGQM----- 577	
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Abb. 6: Vergleich der Proteinsequenzen der ACSM-Familie

Die Relevanz dieser Genfamilie als Faktor bei der Entwicklung gestörter Insulinresistenz und Typ 2 DM begründet sich zunächst in der Identifizierung von ACSM3 als Kandidatengen für Bluthochdruck zu Beginn der 1990er Jahre. Nach der Untersuchung differenzieller Expressionsmuster der Nieren normotensiver (Wistar-Kyoto Ratten, WKY) und hypertensiver (*spontaneously hypertensive rats*, SHR) Rattenstämme [Iwai und Inagami, 1991] konnte gezeigt werden, dass das so genannte SA-Gen etwa zehnmals stärker in den Nieren der SH-Ratten exprimiert wurde. Nachfolgende Untersuchungen kamen jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen. Es konnte sowohl eine Cosegregation von SA-Allelen mit Blutdruck in Kreuzungen von SHR mit WKY und Lewis-Ratten [Iwai und Inagami, 1992; Iwai *et al.*, 1992] als auch eine signifikante Assoziation eines *PstI* Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus in einer Humanstudie gezeigt werden [Iwai *et al.*, 1994]. Andererseits konnten weder in congenischen Rattenstämmen aus SHRSP (*stroke-prone* SHR) und WKY [Hubner *et al.*, 1999] oder in SA *knockout* Mäusen [Walsh *et al.*, 2003] noch bei der Untersuchung von Mikrosatelliten- und SNP-Markern in einer Humanstudie hypertensiver Familien Assoziationen des SA-Gens mit Blutdruck beobachtet werden [Nabika *et al.*, 1995]. Der Einfluss von ACSM3 SNPs auf die Entstehung von Bluthochdruck ist deshalb umstritten.

Mit der Beschreibung weiterer ACSMs konnten diese ebenfalls als Kandidatengene in weiterführende Untersuchungen einbezogen werden. Hier ergaben sich in verschiedenen Arbeiten Assoziationen einzelner ACSM-Polymorphismen mit Übergewicht, Hypertriglyceridämie und HDL-Cholesterinspiegeln [Benjafeld *et al.*, 2003; Haketa *et al.*, 2004; Iwai *et al.*, 2002; Iwai *et al.*, 2003]. Die funktionellen Auswirkungen der signifikant assoziierten SNPs wurden bisher jedoch nicht experimentell untersucht. Vor allem ein Einfluss der ACSM-Familie auf das Körpergewicht, zirkulierende Fettsäuren und Triglyceride könnte hier eine Verbindung zur Insulinresistenz darstellen.

1.2.2 Prostaglandin E Synthase 2 (PTGES2)

Prostaglandin E₂ (PGE₂) ist ein Metabolit des Arachidonsäuremetabolismus. Phospholipase A₂ setzt aus Phospholipiden der Membran Arachidonsäure frei, diese wird durch Cyclooxygenasen zu Prostaglandin H₂ und nachfolgend durch spezifische Prostaglandinsynthasen zu den zellulär wirksamen Prostaglandinen umgesetzt (Abb. 7).

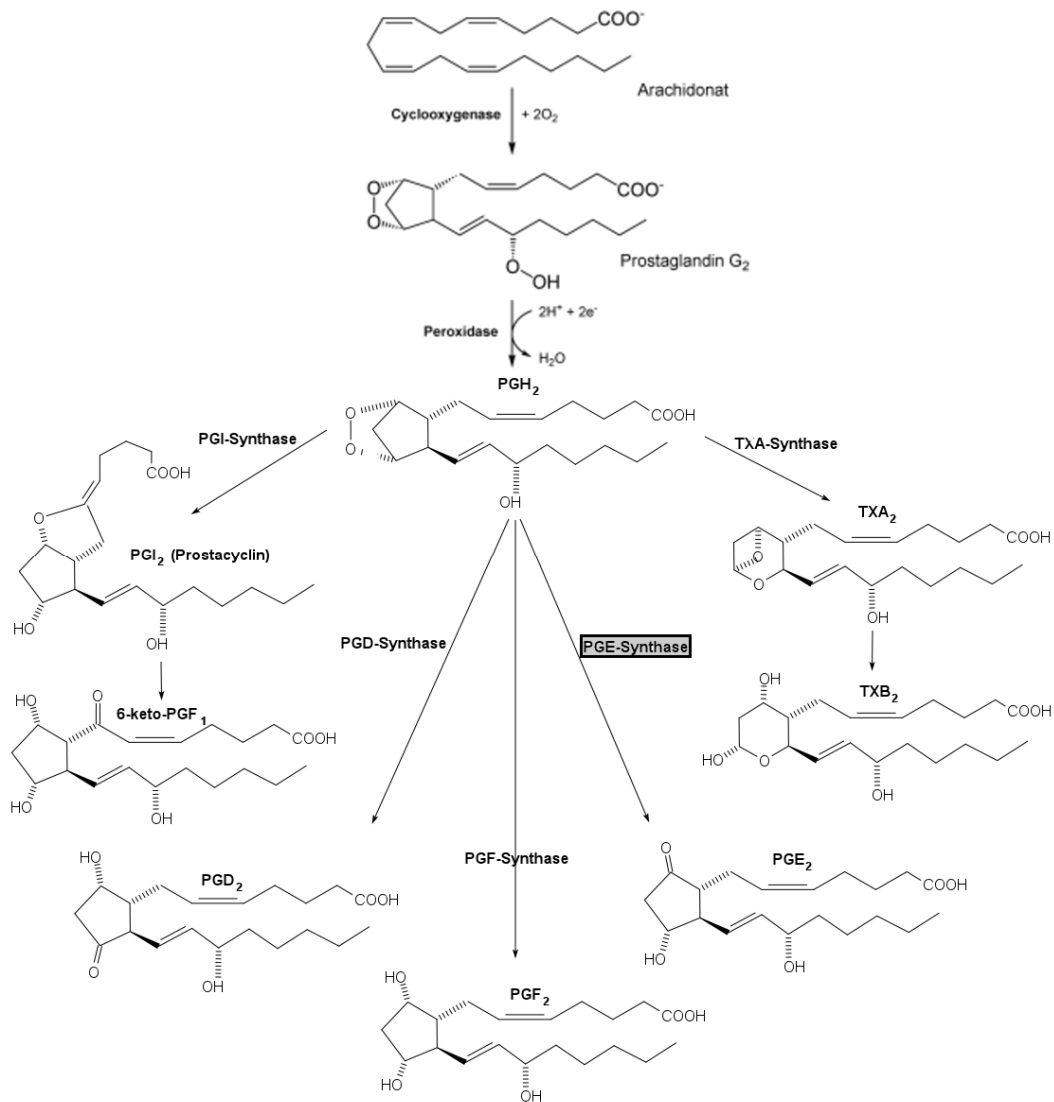


Abb. 7: Prostaglandin- und Thromboxansynthese

PGE_2 wird in vielen Geweben gebildet und wirkt aufgrund seiner geringen Halbwertszeit in der Nähe des Bildungsortes (auto- und parakrin). Die Wirkungen, die von PGE_2 vermittelt werden, sind vielfältig: unter anderem Na^+ -Sekretion [Vander, 1968], Regulation der Körpertemperatur [Milton und Wendlandt, 1971] und Fieberentstehung [Ushikubi *et al.*, 1998].

Neben diesen zeigt PGE_2 auch eine starke antilipolytische Wirkung im Fettgewebe [Hittelman und Butcher, 1973], hat einen Einfluss auf die Leptinsekretion des Fettgewebes [Fain, Leffler und Bahouth, 2000; Fain, Leffler, Bahouth *et al.*, 2000] und wird mit einer verringerten glucosestimulierten Insulinsekretion [Laychock und Bilgin, 1989] und verstärkter β -Zellapoptose [Oshima *et al.*, 2006] in Verbindung gebracht. Diese Funktionen unterstreichen die Relevanz dieser Verbindung für die vorliegenden Untersuchungen.

Die zelluläre Wirkung von PGE₂ wird über die PGE₂-Rezeptoren (EPs) vermittelt. Es sind vier Rezeptoren bekannt, die jeweils unterschiedliche Signalwege ansprechen (EP₁–4). Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist hierbei der PGE₂ Rezeptor 3 (EP₃). Es handelt sich um einen G_i-Protein gekoppelten Rezeptor, der eine Hemmung der Adenylat-Cyclase und nachfolgende Senkung der zellulären cAMP-Spiegel vermittelt [Aktories *et al.*, 1983; Olansky *et al.*, 1983; Strong *et al.*, 1992], Abb. 8. Dieser Rezeptor wird unter anderem in der Leber, ausdifferenzierten Adipocyten und pankreatischen β -Zellen exprimiert [Borglum *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 1995]. Im Fettgewebe beruht die antilipolytische Wirkung von PGE₂ auf der EP₃-vermittelten Senkung der cAMP-Spiegel und der damit verbundenen Hemmung der hormonsensitiven Lipase [Butcher und Baird, 1968; Stralfors und Belfrage, 1983]. Der Wirkmechanismus von PGE₂ auf die Glucosestimulierte Insulinsekretion der pankreatischen β -Zellen ist hingegen noch nicht vollständig geklärt.

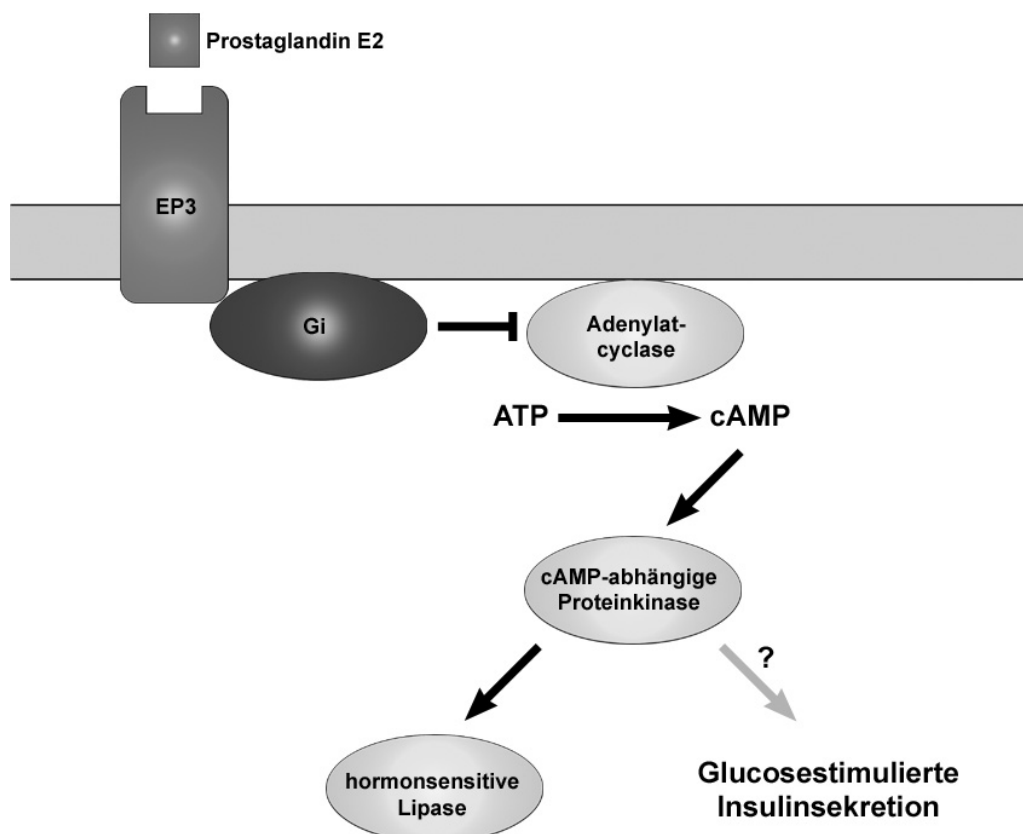


Abbildung 8: EP₃-vermittelte PGE₂-Wirkung (modifiziert nach [Richelsen, 1991])

EP₃: Prostaglandin E Rezeptor 3, G_i: inhibitorisches G-Protein

Bisher konnten drei verschiedene Prostaglandin E Synthasen identifiziert werden. Die strikt glutathionabhängige Prostaglandin E Synthase (PTGES) wurde zuerst aus humanem Gehirn isoliert [Ogorochi *et al.*, 1987]. Die nicht strikt glutathionabhängige Prostaglandin E Synthase 2 (PTGES2) konnte zuerst aus bovinem Herz isoliert werden [Watanabe K., Kurihara *et al.*, 1999]. Die cytosolische Prostaglandin E Synthase 3 (PTGES3) wurde zunächst in dem Gehirn von Ratten beschrieben [Tanioka *et al.*, 2000]. Die Expression von PTGES kann durch proinflammatorische Stimuli, wie zum Beispiel Interleukin-1 β , TNF α und bakterielle Lipopolysaccharide, induziert werden. Dies wurde in Zellkultur- und Tierexperimenten gezeigt [Jakobsson *et al.*, 1999; Mancini *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2000]. Im Gegensatz hierzu wird PTGES2 scheinbar konstitutiv exprimiert und nicht durch proinflammatorische Stimuli induziert [Murakami *et al.*, 2003]. Diese Unterschiede spiegeln sich auch in der gewebsspezifischen Expression der beiden Enzyme wider. PTGES2 wird in vielen Geweben exprimiert, in denen PTGES nur in sehr geringen Mengen oder gar nicht nachgewiesen werden kann. Unter anderem gehören hierzu Skelettmuskel, Leber, Pankreas und ausdifferenzierte Adipocyten [Nitz *et al.*, 2007; Tanikawa *et al.*, 2002]. Dies macht eine basale Funktion von PTGES2 im Metabolismus im Vergleich zur proinflammatorisch induzierbaren PTGES wahrscheinlich.

Kürzlich wurde eine weitere Funktion des PTGES2-Proteins aufgezeigt. Als *GATE-binding factor 1* (GBF-1) beschrieben, scheint es eine transaktivierende Funktion zu besitzen [Hu J. *et al.*, 2002]. Das *gamma-activated transcriptional element* (GATE) wurde im Promotor des für die Interferon- α/β Signaltransduktion wichtigen *Interferon gene regulatory factor 9* (IRF-9) Gens identifiziert [Weihua *et al.*, 1997]. Die transaktivierende Wirkung von GBF-1 wird möglicherweise in Kombination mit dem Transkriptionsfaktor C/EBP- β vermittelt [Meng *et al.*, 2005]. Durch eine Beeinflussung der interferonvermittelten Signaltransduktion und Genexpression könnten sich neue Ansätze für eine Assoziation dieses Proteins mit inflammatorischen Mechanismen ergeben.

Einen Hinweis auf die Relevanz von PTGES2 im Kontext dieser Arbeit lieferte zunächst eine *Linkage*-Studie, die die chromosomale Lokalisation 9q34 signifikant ($p=0,001$) mit Gewicht und Cholesterin assoziierte [Wilson *et al.*, 1991]. Kürzlich konnten außerdem in zwei unabhängigen Kohorten Assoziationen des R298H Polymorphismus zu gestörter Glucosetoleranz und Typ 2 DM bestätigt werden [Fisher *et al.*, 2007; Nitz *et al.*, 2007]. Diese Erkenntnisse, zusammen mit den

bekannten Funktionen von PGE₂, machen PTGES2 zu einem interessanten Kandidatengen für die Untersuchung der genetischen Grundlagen der Insulinresistenz.

1.3 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Gene der ACSM-Familie und das Prostaglandin E Synthase 2 Gen aufgrund ihrer Funktion und chromosomalen Lokalisation als Kandidatengene für Insulinresistenz und Typ 2 DM ausgewählt. Zunächst sollen relevante SNPs in diesen Genen in dem Probandenkollektiv der *Metabolic Intervention Cohort Kiel* (MICK), das umfangreich metabolisch charakterisiert wurde, mit phänotypischen Merkmalen der Insulinresistenz und Typ 2 DM assoziiert werden. Des Weiteren soll die Expression der ACSM-Transkripte in der Leber und in Leberzelllinien quantifiziert werden, um Aussagen über die vorherrschend auftretenden Formen treffen zu können. Anhand der Ergebnisse soll ein ACSM-Gen ausgewählt werden, das mittels biochemischer, molekular- und zellbiologischer Methoden funktionell charakterisiert wird. Für das PTGES2-Gen soll ein *ex vivo* Ansatz bei genotypisierten Personen eingesetzt werden, um funktionelle Unterschiede zwischen PTGES2-Genvarianten darzustellen. Die so erhaltenen Ergebnisse dienen zur Generierung von Hypothesen für den gefundenen Zusammenhang zwischen Polymorphismus und Merkmalen der Insulinresistenz und Typ 2 DM.

2 Material und Methoden

2.1 Kohorten und Probanden

Metabolic Intervention Cohort Kiel (MICK)

Für die MICK-Kohorte wurden zwischen Januar 2003 und März 2004 vom Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (Standort Kiel) 716 männliche Probanden im Alter zwischen 45 und 65 Jahren aus dem Einwohnermelderegister der Stadt Kiel rekrutiert. Als Ausschlusskriterien für die Rekrutierung galten bekannter Typ 1 oder Typ 2 Diabetes mellitus, Krankheiten die die Verdauung betrafen, Einnahme von Medikamenten oder Hormonen zur Senkung der Blutlipide, eine Operation des Magen-Darm-Traktes, Hypo- oder Hyperthyreose, chronische Nierenerkrankungen, Hepatitis, Cholestase, Alkoholismus oder Krebs. Zum Zeitpunkt der Rekrutierung wurde mittels standardisierter Methoden Blutdruck (systolisch und diastolisch), Körpergröße, Körpergewicht, Taillen- und Hüftumfang bestimmt. Des Weiteren wurde ein oraler Glucosetoleranztest (oGTT) durchgeführt. Mindestens drei Tage nach dem oralen Glucosetoleranztest wurde ein oraler metabolischer Toleranztest (oMTT) mittels einer standardisierten Hochfett-Mahlzeit durchgeführt (Tab. 3a). Die Zusammensetzung der verwendeten Fette ist in Tabelle 3b aufgeführt.

Tab. 3a: Zusammensetzung des oMTT

Bestandteil	Menge	kcal%
Energiegehalt	1017 kcal	100 kcal%
Protein	30g	11,9 kcal%
Kohlenhydrate	75g (93% Saccharose / 7% Lactose)	29,6 kcal%
Fett	58g (65% gesättigte und 35% ungesättigte Fettsäuren)	51,6 kcal%
Alkohol	10g	6,9 kcal%
Cholesterin	600mg	
Retinylpalmitat	30000 IU	

Tab. 3b: Fettsäurezusammensetzung der oMTT-Triglyceride

Fettsäure	Kettenlänge: Sättigung	% w/w
Capronsäure	6:0	2
Caprylsäure	8:0	1,2
Caprinsäure	10:0	2,7
Laurinsäure	12:0	3,0
Myristinsäure	14:0	10,9
Palmitinsäure	16:0	28,4
Stearinsäure	18:0	13,1
Palmitoleinsäure	16:1	2,4
Ölsäure	18:1	27,1
Linolsäure	18:2	2,4
Linoensäure	18:3	1,6
andere	-	5,2

Neben einer nüchternen Blutprobe wurden nach Einnahme der Testmahlzeit nach 30 min und von Stunde 1 bis 9 stündlich Blutproben entnommen. Als Laborparameter wurden Gesamt-Cholesterin, Serum HDL-Cholesterin, Serum LDL-Cholesterin, Plasmaglucoose, Plasmatriglyceride und Insulin bestimmt.

Kiel Obesity Prevention Study (KOPS)

Die *Kiel Obesity Prevention Study (KOPS)* rekrutierte zwischen 1996 und 1999 über 2000 Kinder zwischen 5 und 7 Jahren und deren Familien an Schulen in Kiel, Schleswig-Holstein [Muller *et al.*, 2001]. Neunzig Familien wurden später für eine Familienpfadstudie herangezogen [Bosy-Westphal *et al.*, 2007]. Von diesen Probanden wurden nicht verwandte Individuen mit den homo- und heterozygoten Genotypen des Prostaglandin E Synthase 2 R298H Polymorphismus ausgewählt und für die Untersuchungen in dieser Arbeit rekrutiert.

Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Probanden wurde aus 100µl *buffy coat* mit dem E.Z.N.A. Blood DNA MiniKit genomische DNA isoliert (Arbeiten durchgeführt vom Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Kiel) und mittels des TaqMan Systems [Livak, Marmaro *et al.*,

1995] der Genotyp bestimmt (Arbeiten durchgeführt vom Institut für klinische Molekularbiologie, Universitätsklinik Kiel).

Tab. 4: Verwendete Primer und Sonden für die TaqMan Genotypisierung

	Primer F	Primer R	Probe 1 (VIC)	Probe 2 (FAM)
ACSM1 A/G	GCCACCAGATCCC TTCCAT	TCAGTGACAGCC CCATACAAGTA	CCCAAGGAAGG TGAGTG	CCCAAGGAAAGT GAGTG
ACSM2 D463N	GGAGACTTTTGGC TCCTTGGA	GCTCACCCGCTG GAGTTAAT	ACGGGCAAATG ATAT	CGGGCAGATGAT AT
ACSM2 L513S	AGGTGGTGAAGGC ATTTGTGAT	CTGTTCTGGGTC ATGGGATAGG	CCTGGCCTCGC AGTT	CCTGGCCTTGCA GTT
ACSM3 G/A	CTCCTAGAACTCA AAAGTGACCAACA	TTGATGGATATG TGAATAAATAAA GGACTCTTTCA	CCCAACTTAAA TTTACTTAAAG	CCCAACTTTACT TAAAG
ACSM5 T533M	GAGCAGTCACCC TTTCACATG	TCCAGCCTACTC CTCTCATGAC	TTCCCGCATT GTGC	TCCCGCGTTAGT GC
PTGES2 R298H	CCTCGCGCACGTT GTC	GCTGGGCTGGGA GTGG	CCAGGCACCGC CTC	CCAGGCACCACC TC

Sequenzen sind in 5'→3' Orientierung angegeben

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Nukleinsäurequantifizierung

Die Konzentration von DNA- oder RNA-Lösungen wurde spektrophotometrisch bestimmt. Hierbei errechnet sich die Nukleinsäurekonzentration in einer Küvette mit 1cm Strahlengang mittels der Formel:

$$c = E_{260nm} \times V \times F$$

c = Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]

E = Extinktion bei 260nm

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (doppelsträngige DNA = 50, RNA = 40)

Nukleinsäurelösungen wurden im Verhältnis 1:50 oder 1:25 mit destilliertem Wasser verdünnt um eine Extinktion von mindestens 0,1 zu erhalten und zur Messung der Konzentration ein Gesamtvolumen von 50 μl eingesetzt. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Überprüfung von DNA-Fragmenten wurde mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt, bei der die Nukleinsäuren im elektrischen Feld größenabhängig aufgetrennt werden. Je nach Größe des nachzuweisenden Fragmentes wurden 1-3%ige (w/v) Agarosegele verwendet, wobei für maximal 60 min eine Spannung von 60-90V angelegt wurde.

Für die DNA-Gelelektrophorese wurde die benötigte Menge Agarose mit TAE-Puffer in der Mikrowelle zum Siedepunkt erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Nach Abkühlen der Flüssigkeit (ca. 60°C, „für 3sec in der Hand zu halten“) wurde Ethidiumbromid (1%ige Lösung [10mg/ml], 3µl Stock/50ml Agarosegel) zum anfärben der DNA zugesetzt und das Gemisch in eine vorbereitete Gelkammer mit Kamm gegossen. Nach fest werden des Gels wurden bis zu 15µl der mit Ladepuffer versetzten DNA-Lösung in die Taschen gegeben und der Elektrophoreselauf gestartet. Zur Kontrolle der Fragmentgröße wurden DNA-Größenmarker und zur Kontrolle der DNA-Konzentration definierte Mengen von λ-DNA eingesetzt.

Die Überprüfung des Gels erfolgte mittels eines UV-Tisches ($\lambda = 365\text{nm}$) und einer Geldokumentationsanlage (Alphamager HP, Alpha Innotech).

2.2.3 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus Säugerzellen erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen). Zellmaterial aus bis zu einer 75cm² Zellkulturflasche wurde nach waschen mit PBS direkt im Puffer RLT (mit β-Mercaptoethanol zur Inhibition von RNasen) aufgenommen (je nach Zellmenge 350µl oder 600µl). In einigen Fällen wurde diese Lösung bis zur RNA-Isolierung bei -80°C eingefroren.

Die Zellsuspension wurde in einer QIAshredder Säule homogenisiert und daraufhin mit dem RNeasy Mini Kit weiter verarbeitet. Im Verlauf der RNA-Isolation wurde des Weiteren ein DNase I Verdau direkt auf der Säule durchgeführt. Die isolierte RNA wurde mit 30-50µl RNase-freiem Wasser in ein 1,5ml Probengefäß eluiert, die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.4 Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA für die Quantifizierung der Expression verschiedener Transkripte (iScript) und Klonierungen (iScript und OmniScript) wurden jeweils 1µg isolierte gesamt-RNA aus verschiedenen Zelllinien bzw. kommerziell erworbene gesamt-RNA für die Reaktion eingesetzt.

Reaktionsansatz bei Verwendung von OmniScript:

10x RT Puffer	2µl
dNTPs [5mmol/l je NTP]	2µl
Oligo-dT Primer [10µmol/l]	2µl
RNase Inhibitor [10U/µl]	1µl
Omniscrypt reverse Transkriptase [4U/µl]	1µl
RNA	1µg (variables Volumen)
H ₂ O (RNase-frei)	<u>zu 20µl</u>
37 °C 60min	

Reaktionsansatz bei Verwendung von iScript:

5x iScript Reaction Mix	4µl
iScript Reverse Transkriptase	1µl
RNA	1µg (variables Volumen)
H ₂ O (RNase-frei)	<u>zu 20µl</u>
25 °C 5min	
42 °C 30min	
85 °C 5min	

Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.5 Quantitative *Realtime*-PCR (TaqMan)

Die relative Quantifizierung von mRNA-Transkripten erfolgte mittels der TaqMan-Methode [Livak, Flood *et al.*, 1995]. Hierbei wird ein exonübergreifendes Element des zu untersuchenden Transkripts in Anwesenheit einer fluoreszenzmarkierten Sonde und des sogenannten *Quenchers* mittels PCR amplifiziert. Bindet die Sonde an vorhandene Transkripte, so wird diese im Laufe der Amplifizierung aufgrund der 5'-Nuklease Aktivität der verwendeten *Taq*-Polymerase abgebaut, Reporter und Quencher werden voneinander getrennt und es kann ein Fluoreszenzsignal registriert werden.

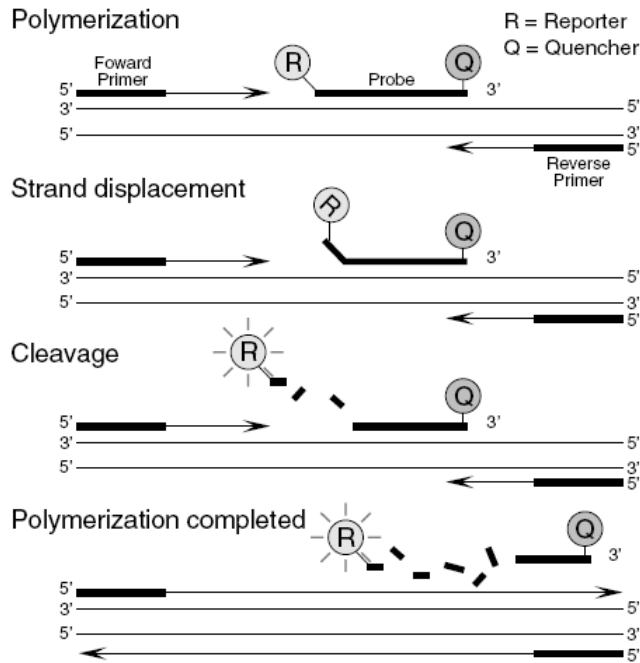


Abb.9: Prinzip des TaqMan-Assays

aus: Applied Biosystems – TaqMan® Gene Expression Assays Protocol, Rev F, Part # : 4333458

Als Standard für alle Assays wurde HuH-7 cDNA verwendet und als endogene Kontrolle zur Normalisierung der Ergebnisse diente Hypoxanthinphosphoribosyltransferase 1 (HPRT1).

Tab. 5: Verwendete TaqMan-Assays

Name	Assay ID / Sondensequenz	Zielregion / Primer F	Amplikongröße / Primer R
ACSM1	Hs00369504_m1	Exon 6-7	74bp
ACSM2 (gesamt)	Hs00415261_m1	Exon 4-5	70bp
ACSM2A	ACATCCTGAGAGGA CTTG	GTGGACGAAGCTCTC TCTAGAAAG	GTGTCTGACATTTCTG TCTCCTTTTTTT
ACSM3	Hs00194528_m1	Exon 2-3	61bp
ACSM5	Hs00194528_m1	Exon 1-2	86bp
HPRT1	Hs99999909_m1	Exon 6-7	100bp

Sequenzen sind in 5' → 3' Orientierung angegeben

Für alle verwendeten Assays wurde zusätzlich zu den Proben eine 6-stufige Standardkurve mit HuH-7 cDNA erstellt. Die eingesetzte cDNA stammt aus 20µl RT-Reaktionen (s.o.), die nochmals 1:5 verdünnt wurden.

Es wurden insgesamt 6 Verdünnungen erstellt, die jeweils um den Faktor 5 zur vorherigen Stufe verdünnt wurden.

I 13,33µl cDNA + 1,67µl DEPC-H₂O = 15,0µl

- 3,0µl (I)

= 12,0µl davon 11,25µl / Assay

II 3,0µl (I) + 12,0µl DEPC-H₂O = 15,0µl

- 3,0µl (II)

= 12,0µl davon 11,25µl / Assay

usw. bis VI

Tab. 6: Einsatz von cDNA in den TaqMan-Assays

Assay	cDNA 2,5µl / Ansatz	cDNA 1,25µl / Ansatz	Besonderes
ACSM1	jede getestete cDNA	-	-
ACSM2 (gesamt)	jede getestete cDNA, außer humane Leber	humane Leber	-
ACSM2A	-	-	á 5µl cDNA / Ansatz mit jeder getesteten cDNA
ACSM3	jede getestete cDNA, außer humane Leber	humane Leber	-
ACSM5	jede getestete cDNA, außer humane Leber	-	humane Leber cDNA nochmals 1:20 verdünnt Einsatz 3µl / Ansatz

Reaktionsansatz pro Well:

cDNA variabel

Mastermix 12,5µl

TaqMan-Assay 1,25µl

DEPC-H₂O ad 25µl

Um die Anzahl der Pipettiervorgänge zu minimieren, wurde zunächst ein Mastermix der einzelnen cDNAs mit DEPC-H₂O und dem TaqMan Mastermix für die benötigte Anzahl von Assays angesetzt und in eine 96-Well Mikrotiterplatte verteilt. Anschließend wurde in jedes Well 1,25µl des jeweiligen Assays zugefügt und der Lauf mit dem 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) gestartet.

Die relative Quantifizierung wurde mittels relativer Standardkurvenmethode und vergleichender C_T Methode ($\Delta\Delta C_T$) durchgeführt.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Zur sequenzspezifischen Vermehrung von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Hierbei werden die Zielsequenz flankierende, spezifische Primer eingesetzt. Die Auswahl der Primer erfolgte anhand von Sequenzinformationen aus öffentlich zugänglichen Datenbanken (NCBI) und mit Hilfe der Oligo-Software.

Tab.7: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz F	T_m	Sequenz R	T_m	Verwendung
ACSM2gw	CACCATGCAT TGGCTGCG	58	CTTCTGCGCA CGGGCTTT	58	ORF ohne Stop-Codon
ACSM2n1	GTGAATGGGA AGGGGAAG	56	CGGATGTCCA GTCCTGTG	58	Sequenzierungsprimer
ACSM2n2	TCCAGCCGCA CTCTCTAC	58	CAGCCGTTCC CATGTATC	56	Sequenzierungsprimer
ACSM2t47BX	TTAACGGATC CAGTGATGTG TTGG	70	TAGACTCTAG ACTGCGCACG GGC	74	verkürztes ORF mit BamHI und XbaI, ohne Stop-Codon
ACSM2gwt47	CACCATGAGT GATGTGTTGG	60	---		verkürztes ORF für Gateway-Klonierungen
PTGES2	CACCATGGAG CGCTCAGCCG CGCAG	86	TTTGTGCGCT GGGGAGGCCT CG	78	verkürztes ORF für Gateway-Klonierungen
PTGES2R298H	CTGGGAGAAG CCTGGAGC	60	TAGGGCAGGT GGGAAACG	58	Sequenzierungsprimer
PTGES2ges	CACCATGGAC CCGGCTGCGC	70	---		ORF für Gateway-Klonierung
PTGES2stop	---		TCAGTGCGCT GGGGAGGCCT C	72	ORF mit Stop-Codon

Sequenzen sind in 5' → 3' Orientierung angegeben T_m = Schmelztemperatur in °C

Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene DNA-Polymerasen eingesetzt. Für Sequenzüberprüfungen und PCR-Optimierungen wurde vor allem die *Taq*-Polymerase eingesetzt. Sollten die PCR-Fragmente für Klonierungen verwendet werden, wurden DNA-Polymerasen mit Korrekturaktivität (*proofreading*) eingesetzt

(*Pfu*-, Platinum *Pfx*- oder Phusion-Polymerase). Reaktionsansätze sind in Tab. 8 und Reaktionsbedingungen in Tab. 9 aufgeführt.

Tab. 8: PCR-Ansätze

<i>Taq</i>		<i>Pfu</i>		Platinum <i>Pfx</i>		Phusion	
10× PCR-Puffer	2,5µl	10× PCR-Puffer (enth. MgSO ₄)	2,5µl	10× PCR-Puffer	2,5µl	5× PCR-Puffer	8,0µl
MgCl ₂ [50mmol/l]	1,0µl	-	-	MgSO ₄ [50mM/l]	0,5µl	DMSO	3,2µl
dNTP [10mmol/l]	0,5µl	dNTP [10mmol/l]	0,5µl	dNTP	0,75µl	dNTP [10mmol/l]	0,8µl
Primer F [10pmol/µl]	0,5µl	Primer F [10pmol/µl]	0,5µl	Primer F [10pmol/µl]	0,5µl	Primer F [10pmol/µl]	2,0µl
Primer R [10pmol/µl]	0,5µl	Primer R [10pmol/µl]	0,2µl	Primer R [10pmol/µl]	0,5µl	Primer R [10pmol/µl]	2,0µl
<i>Taq</i> [5U/µl]	0,1µl	<i>Pfu</i> [2-3U/µl]	0,25µl	<i>Pfx</i> [2,5U/µl]	0,25µl	Phusion [2U/µl]	0,4µl
Template	var.	Template	var.	Template	var.	Template	var.
ddH ₂ O	ad 25µl	ddH ₂ O	ad 25µl	ddH ₂ O	ad 25µl	ddH ₂ O	ad 40µl

Tab. 9: PCR-Programme

	<i>Taq</i> (touchdown)	<i>Pfu</i>	Platinum <i>Pfx</i>	Phusion (2-step)
1 Initiale Denaturierung	94 °C 3min	95 °C 2min	94 °C 2min	98 °C 30sec
2 Denaturierung	94 °C 20sec	95 °C 30sec	94 °C 15sec	98 °C 10sec
3 Annealing	T _m +4/T _m +2/T _m 20sec	T _m 30sec	T _m 30sec	-
4 Elongation	72 °C 1min/kb	72 °C 2min/kb	68 °C 1min/kb	72 °C 15-30sec/kb
5 Finale Elongation	72 °C 10min	72 °C 5min	-	72 °C 10min
6 Ende	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C
Wiederholungen (2-4)	×3/×3/×25	×25	×25	×35

Als Ausgangsmaterial für die PCR dienten vor allem cDNA, Vektorkonstrukte und genomische DNA. In einigen Fällen wurde zur Überprüfung der Transformation eine sogenannte „colony-PCR“ durchgeführt, wobei mit einem Zahnstocher in eine Bakterienkolonie gestochen, und dieser daraufhin in einen fertigen PCR-Reagenzienmix getaucht wurde. Das so übertragene Material reicht in der Regel für eine erfolgreiche Amplifikation aus. Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte im Agarosegel.

Da für die Verwendung von PCR-Produkten für Klonierungen das Vorhandensein eines spezifischen Produktes nötig ist, wurde bei Vorkommen von multiplen Banden in einer Reaktion das Zielprodukt (anhand der Fragmentgröße im Agarosegel identifiziert) nach Auftrennung aus dem Agarosegel extrahiert. Hierzu wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet und nach Aufreinigung das PCR-Produkt nochmals im Agarosegel überprüft.

2.2.7 Klonierung und Transformation

Tab.10: Verwendete Vektoren

Name	Hersteller	Verwendungszweck
pENTR/D-TOPO	Invitrogen	Eingangsvektor für das Gateway-System mit Kozak-Sequenz für eukaryotische Expression
pENTR/SD/D-TOPO	Invitrogen	Eingangsvektor für das Gateway-System mit Shine-Dalgarno-Sequenz für prokaryotische Expression
pET102/D-TOPO	Invitrogen	prokaryotischer Expressionsvektor
pET-DEST42	Invitrogen	prokaryotischer Expressionsvektor mit 6xHis und V5-Fusionstag
pCold I	Takara Biosciences	prokaryotischer Expressionsvektor mit temperaturabhängigem Promotor
pcDNA-DEST40	Invitrogen	eukaryotischer Expressionsvektor mit 6xHis und V5-Fusionstag
pcDNA-DEST47	Invitrogen	eukaryotischer Expressionsvektor mit GFP-Fusionstag
pGL3-Promotor	Promega	Luciferase-Reportervektor
pGL3-Basic	Promega	Luciferase-Reportervektor
pGL3-Control	Promega	Luciferase-Reportervektor mit einem SV40 Promoter
pGL4.74[hRLuc/TK]	Promega	Renilla-Luciferase Reportervektor

Tab.11: Verwendete Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Hersteller	Genotyp
DH5α	Invitrogen	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ-
TOP10	Invitrogen	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>
XL1-Blue supercompetent cells	Stratagene	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIq</i> Δ <i>M15 Tn10</i> (Tetr)]
BL21 (DE3)	Invitrogen	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)
Arctic Express (DE3)	Stratagene	<i>E. coli</i> B F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm+</i> Tetr <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>cpn10cpn60</i> Gentr]

Die Herstellung von Vektorkonstrukten zur Klonierung und Transformation erfolgte zum größten Teil mit dem Gateway-System [Hartley *et al.*, 2000]. Die Klonierung erfolgte mittels einer Topoisomerase (TOPO Cloning) [Shuman, 1994] und in definierter Orientierung des PCR-Produktes anhand eines CACC-Überhangs am 5'-Ende, das mit dem Forward-Primer angefügt wurde.

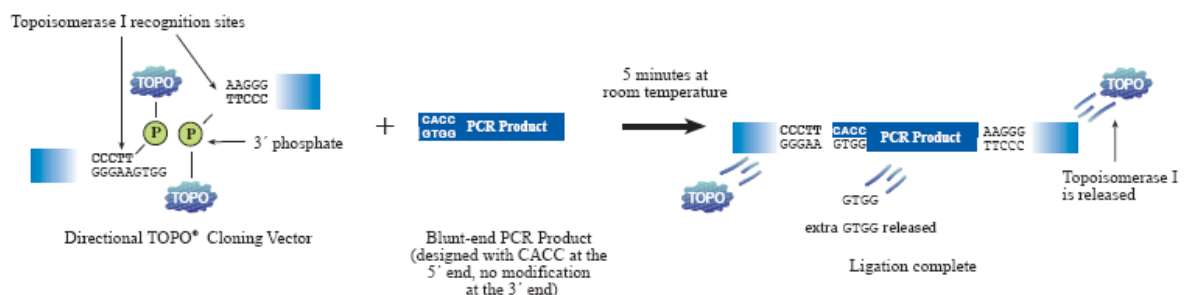


Abb.10: Prinzip der TOPO-Klonierung

aus: Invitrogen, TOPO Cloning Technology Brochure

Für die Klonierung mit dem Gateway-System wurden die verwendeten PCR-Produkte zunächst in einen sogenannten „Entry“-Vektor kloniert, der die Insertionsstelle flankierende Rekombinationssequenzen besitzt (*attL*). Die Herstellung von Expressionskonstrukten erfolgte daraufhin durch eine sequenzspezifische Rekombination des Entry-Klons mit einem sog. „Destination“-Vektor, der korrespondierende Rekombinationssequenzen besitzt (*attR*), mit Hilfe eines Bacteriophage Lambda Rekombinationsprotein Mixes (LR Clonase).

Alle verwendeten Entry-Vektoren wurden nach der Klonierung zunächst in chemisch kompetente TOP10 *E. coli* transformiert, über Nacht bei 37°C auf LB-Agar (mit

Kanamycin 50µg/ml) ausplattiert und anschließend mehrere Klone von jeder Platte gepickt und getestet.

Die LR-Rekombinationsreaktion wurde mit positiv getesteten Plasmiden der Entry-Klone nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, in chemisch kompetente DH5α *E. coli* transformiert, über Nacht bei 37°C auf LB-Agar (mit Ampicillin 50µg/ml) ausplattiert und anschließend mehrere Klone von der Platte gepickt und getestet. Die Klonierung mit dem pColdI-Vektor erfolgte mittels *Bam*HI und *Xba*I Restriktionsschnittstellen, die dem PCR-Produkt mit Hilfe der verwendeten Primer angefügt wurden. Nach Verdau des PCR-Produktes und des pColdI-Vektors wurde mittels T4-Ligase das PCR-Produkt in den Vektor ligiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* wie oben beschrieben transformiert.

Die Klone wurden mittels Colony-PCR mit spezifischen Primern, Restriktionsverdau (s. Anhang Tab. A1) und anschließende Sequenzierung (Service MWG Biotech) überprüft.

Die Präparation von Plasmiden aus LB-Bakterienkulturen erfolgte im Mini- bis Maxi-Maßstab. Für Mini-Präparationen aus 2-6ml Flüssigkultur wurde das QIAprep spin Miniprep Kit nach den Angaben des Herstellers zur alkalischen Lyse der Bakterien und anschließender Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine Silikamembran verwendet. Die DNA wurde jeweils in 50µl Tris-Puffer eluiert.

Für größere Mengen Plasmid-DNA (z.B. für Transfektionen) wurde das HiSpeed Plasmid Maxi Kit zur alkalischen Lyse der Bakterien und anschließende Aufreinigung der Plasmid-DNA über ein Ionenaustauscher-Material, Isopropanolfällung, Trocknung des DNA-Pellets und Resuspension in Reinstwasser verwendet.

Für die Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* (s.u.) wurden die entsprechenden prokaryotischen Expressionskonstrukte in den Bakterienstamm BL21(DE3) transformiert. Dieser enthält das Gen für die T7 RNA Polymerase unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *lacUV5* Promotors.

2.2.8 Gezielte Mutagenese

Die gezielte Mutagenese von Plasmiden wurde mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. Hierbei wurden Primer (Tab. 12), die die gewünschte Mutation beinhalten, an die zu mutagenisierenden Plasmide annealed, mit einer *proofreading*-Polymerase verlängert und anschließend die aus den

Bakterien stammende methylierte und hemimethylierte Plasmid-DNA verdaut (Abb. 11).

Tab.12: Verwendete Oligonukleotide zur Mutagenese

Name	Sequenz F	Sequenz R
ACSM2L	GTGATCCTGGCCT <u>T</u> GCAGTTCCTATC CC	GGGATAGGAACTGCA <u>A</u> GGCCAGGATC AC
PTGES2H	GAGCAGGCACCA <u>A</u> CCTCCAGGACAAC	GTTGTCCTGGAGG <u>T</u> GGTGCCTGCTC

Die zu mutierende Base ist jeweils Fett und unterstrichen dargestellt.

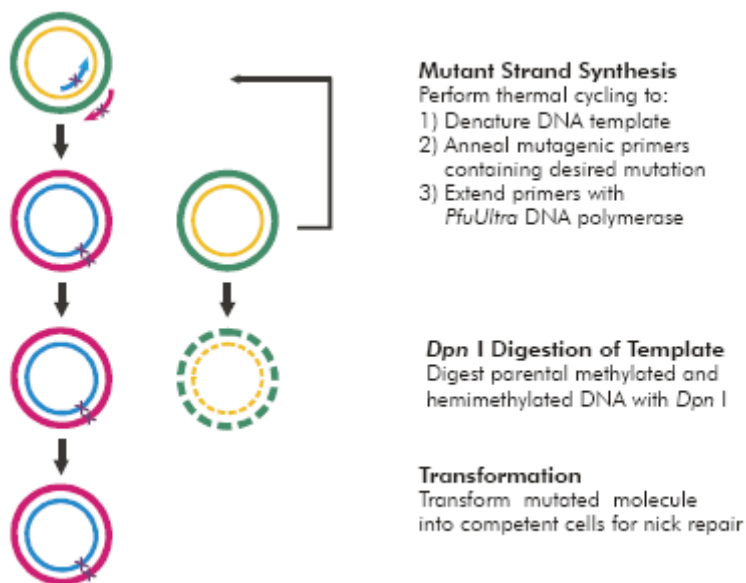


Abb.11: Prinzip der gezielten Mutagenese

aus: Stratagene – QuikChange® II Site Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual, Rev B

Die mutagenisierten Plasmide wurden daraufhin in chemisch kompetente XL1-Blue supercompetent *E. coli* oder DH5α *E. coli* transformiert und wie oben beschrieben vermehrt und getestet.

2.2.9 Proteinexpression in *E. coli*

Zur heterologen Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurden die verwendeten Konstrukte in BL21 Stämmen zunächst über Nacht bei 37°C und 180rpm in einer Vorkultur angezogen, anschließend im Verhältnis 1:10 bis 1:20 mit LB-Medium verdünnt und regelmäßig die OD_{600nm} der Kultur bestimmt, bis die exponentielle Wachstumsphase (OD_{600nm} 0,2-0,5) erreicht war. Daraufhin wurde die Proteinexpression mittels Zugabe von IPTG zu 0,5 bis 1mmol/l induziert und die

Bakterien nach 5 bis 12 Stunden Wachstum mittels Zentrifugation geerntet und Protein isoliert (s.u.).

Zur Erhöhung der Menge rekombinanten Proteins in der löslichen Fraktion wurden für die einzelnen Expressionskonstrukte verschiedene Inkubationsbedingungen getestet:

- Inkubationstemperatur 11, 15, 30°C
- Zugabe von Sorbitol zu 300, 600 und 1000mmol/l und Betain zu 2,5 und 10mmol/l (in Vorkultur und / oder Expressionskultur)
- Verwendung von Arctic Express DE3 *E. coli*

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultur

Tab.13: Verwendete Zelllinien

Name	Gewebe	Spezies	Zellkulturmedium / Trypsinierungsbedingungen
HuH-7	Leber	<i>Homo sapiens</i>	DMEM (ohne Pyruvat), 10% FCS, 1% NEAA Trypsin/EDTA 5min
HepG2	Leber	<i>Homo sapiens</i>	RPMI1640, 10% FCS Trypsin 7min
HeLa	Gebärmutterhals	<i>Homo sapiens</i>	MEM, 10% FCS Trypsin/EDTA 3-5min
HEK293T	Niere	<i>Homo sapiens</i>	DMEM (ohne Pyruvat), 10% FCS Trypsin/EDTA 3-5min
COS-7	Niere	<i>Cercopithecus aethiops</i>	DMEM (ohne Pyruvat), 10% FCS Trypsin/EDTA 5min

Die verwendeten Zelllinien erhielten während der Kultur alle 2-3 Tage frisches Medium und wurden bei ~80%iger Konfluenz trypsinisiert und in neue Zellkulturschalen ausgesät. Die Lagerung erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 90%.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer), wobei gleichzeitig durch eine Färbung mit Trypanblau der Anteil der abgestorbenen Zellen bestimmt wurde. Die Zellsuspension wurde mit einer 0,4%igen Trypanblaulösung versetzt und in das Hämocytometer eingebracht. Nach Auszählen von 4 Großquadraten á 16 Teilquadrate wurde die Zellzahl mittels der Formel:

$$\bar{x}_{\text{Großquadrat}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Gesamtvolumen} = \text{Gesamtzellzahl}$$

bestimmt.

2.3.2 Transfektion

Die transiente Transfektion von Säugerzellen erfolgte mittels Lipofektion mit dem FuGENE 6-Reagenz (Roche) oder mittels einer Calciumphosphatpräzipitation der zu transfizierenden Plasmide im Falle von HEK293T Zellen.

Transfektionen mit FuGENE 6 erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Hierbei wurden 24 Stunden vor der Transfektion die Zellen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ca. 50% erreicht hatten. Vor der Transfektion wurde nochmals ein Medienwechsel durchgeführt.

Für den Transfektionsansatz wurde zunächst FuGENE 6 in Serumfreiem Medium gelöst und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die zu transfizierende DNA wurde in Serumfreiem Medium verdünnt (gleiches Gesamtvolumen wie der FuGENE 6 Ansatz) und dem FuGENE 6 Ansatz zugegeben. Die Lösung wurde durch kurzes vortexen gemischt und anschließend 30min bei Raumtemperatur inkubiert, wonach er zu den Zellen gegeben wurde. Die verschiedenen FuGENE 6 : DNA Verhältnisse für alle verwendeten Zelllinien sind in Tab. 14 angegeben.

Tab.14: Transfektionsbedingungen FuGENE 6

Zelllinie	FuGENE 6	DNA	DNA-Mengen	
HuH-7	3	2	6-Well	2µg
HeLa	6	1	96-Well	100ng
COS7	6	1	6-Well	1µg

Die Transfektion von HEK293T mittels Calciumphosphatpräzipitation erfolgte nach [Jordan *et al.*, 1996]. HEK293T Zellen wurden zunächst in 10cm Zellkulturschalen mit 10ml Medium ausgesät (2×10^6 /Schale) und 24h inkubiert, bis sie ca. 50% Konfluenz erreicht hatten. Eine Stunde vor der Transfektion wurde nochmals ein Medienwechsel durchgeführt. Die für die Transfektion benötigten Lösungen wurden zunächst bei Raumtemperatur equilibriert (23°C).

Transfektionsansatz für eine 10cm Schale mit 10ml Medium:

CaCl ₂ [2,5mol/l]	50µl
Plasmid	25µg
TE 0,1×	zu 500µl

Anschließend Zugabe der DNA-Lösung zu 500µl HEPES 2×.

Die Lösung wurde kurz gevortext und daraufhin 1min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben (100µl Transfektionsansatz / ml Medium). Nach 6h erfolgte ein weiterer Medienwechsel und die Zellen wurden bis zur Ernte 24 bis 48h im CO₂-Schrank inkubiert.

2.3.3 Färbung und Mikroskopie

Zur Färbung von Organellen (Nukleus und Mitochondrien) wurden HuH-7 Zellen verwendet. Diese wurden in 6-Well Platten auf sterilen Deckgläschen ausgesät, nach 24h wie beschrieben transfiziert und nach weiteren 24h gefärbt. Für die Färbung der Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red CMXRos wurden die Zellen mit 2ml MitoTracker [100nmol/l] in Zellkulturmedium für 30min im CO₂-Schrank inkubiert und anschließend einmal mit frischem Medium gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen 15min mit 1ml 4% Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur inkubiert und danach 3x 5min mit PBS gewaschen. Um die DNA mit Hoechst 33258 (bis-Benzimid) anzufärben wurden die Zellen hiernach mit 0,2% TritonX100 in PBS 10min bei Raumtemperatur permeabilisiert und mit 200µl Hoechst 33258 [1ng/ml] in PBS weitere 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläschen mit *Fluorescence Mounting Medium* (Dako Cytomation) auf einem Objektträger fixiert.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Objekte wurden mit einem konfokalen Laser-scanning Mikroskop erstellt (TCS SP, Leica). Die verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen sind in Tab.15 zusammen gestellt.

Tab.15: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

	Anregung [nm]	Emission [nm]
MitoTracker Red CMXRos	579	599
Hoechst 33258	350	470
Cycle 3 GFP	395 (478)	507

2.3.4 Proteinexpression in Säugerzellen

Zur Expression rekombinanter Proteine in HEK293T wurden pro Versuchansatz 5 Zellkulturschalen (10cm Durchmesser) wie oben beschrieben mittels Calciumphosphatpräzipitation transient transfiziert und die Zellen nach 48h geerntet. Für die Transfektion wurden vier verschiedene ACSM2-Expressionskonstrukte verwendet:

- Gesamt-ORF (513Leu oder 513Ser) in pET/DEST40
- trunkiertes ORF (513Leu oder 513Ser) in pET/DEST40

Alle vier Konstrukte enthielten einen C-terminalen 6xHis-tag und das V5-Epitop.

Für die Proteinexpression in COS7 wurden diese zunächst wie beschrieben im 6-Well Format ebenfalls mit den vier beschriebenen Konstrukten transfiziert. Nach 48h Inkubation wurde dem Medium G418 (800µg/ml) zur Selektion der transfizierten Zellen zugegeben. Da der verwendete Vektor pcDNA-DEST40 einen SV40 Replikationsstartpunkt besitzt, kann das transfizierte Plasmid in den großes T-Antigen exprimierenden COS7 Zellen episomal repliziert und über viele Zellteilungen hinweg propagiert werden [Chittenden *et al.*, 1991]. Nach 2 Wochen Kultur der Zellen in Selektivmedium wurden diese zur Vermehrung zunächst in 25cm² und später in 75cm² Zellkulturflaschen überführt und weiter kultiviert. Für die Proteinisolation wurde Material aus bis zu fünf 75cm² Zellkulturflaschen verwendet.

2.3.5 *Ex vivo* Stimulation

Zur Untersuchung der Prostaglandin E₂ Produktion aus LPS-stimuliertem Vollblut wurde zunächst heparinisiertes Blut im mit RPMI-Medium 1:5 verdünnt und je 1ml hiervon in die Wells einer 24-Well Zellkulturplatte gegeben. Diese wurde zunächst 1h im CO₂-Schrank inkubiert und daraufhin LPS-Lösungen zu 200 oder 2000ng / Well bzw. RPMI als unbehandelte Probe in jeweils zwei Wells hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde weitere 24h im CO₂-Schrank inkubiert und anschließend 400µl des Überstandes (ohne abgesetztes Zellmaterial) abgenommen und bei -80°C bis zur PGE₂-Bestimmung gelagert.

2.3.6 Promotorassay

Promotoraktivitäten wurden mittels des dualen Luciferase-Assay Systems (Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System, Promega) bestimmt. HeLa wurden mit einem Renilla-Luciferase Expressionsvektor (pGL4.74[*hRluc*/TK], 5ng/Well) und

äquimolaren Mengen eines Promotor-Fireflyluciferase Konstruktes (pGL3-BasicP4 40ng oder als Negativkontrolle pGL3-Basic 37,6ng und als Positivkontrolle pGL3-Control 35ng) und eines PTGES2-Expressionsvektors (P2RD40 52ng, P2HD40 52ng, P2truncRD40 50ng, P2truncHD40 50ng oder als Kontrolle pcDNA-DEST40 ohne *ccdB* Kasette 42,4ng) co-transfiziert. Insgesamt wurden 100ng DNA/Well eingesetzt, bei Ansätzen mit weniger als 100ng Plasmid-DNA wurde das pcDNA-DEST40 ohne *ccdB* Kasette Plasmid zum Erreichen dieser Menge zugesetzt. 48h post-Transfektion wurden die Zellen nach Protokoll des Herstellers 15min bei Raumtemperatur in 20µl *Passive Lysis Buffer* lysiert und anschließend bei -20°C bis zur Luciferasemessung gelagert.

Die Messung der Luciferaseaktivitäten erfolgte mit dem GloMax™ 96 Luminometer. Jeweils 8µl Zellysate wurden in eine weiße Mikrotiterplatte überführt, die für die Luminometermessung verwendet wurde. Nach der Injektion von 40µl Luciferase Assay Reagent wurde die Fireflyluciferaseaktivität über 10sec gemessen und daraufhin durch Injektion von 40µl Stop & Glo Reagenz die Fireflyluciferase-Reaktion gestoppt und gleichzeitig die Renillaluciferase-Reaktion gestartet und ebenfalls über 10sec gemessen.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach Bradford im Standard- und Microverfahren im Format mit Halbmikroküvetten oder in Mikrotiterplatten. Als Standard diente jeweils eine in entsprechenden Puffern angesetzte BSA-Lösung in verschiedenen Verdünnungsstufen.

Für das Standardverfahren wurde das Bradford-Reagenz zunächst 1:5 mit ddH₂O verdünnt und einmal filtriert. Im Küvettenmaßstab wurden 20µl eines verdünnten Proteinlysats in eine Küvette vorgelegt (Verdünnung von 1:20 mit ddH₂O), anschließend 1ml des verdünnten Bradford-Reagenz hinzugegeben und nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion bei 595nm bestimmt und mit einer zuvor erstellten Standardkurve verglichen (BSA-Stock 10mg/ml, Meßbereich 0,2-0,9 mg/ml). Für das Standardverfahren im Mikrotiterformat wurden jeweils 10µl Probe vorgelegt und 200µl verdünntes Bradford-Reagenz hinzugefügt. Die Standardkurve wurde bei jeder Mikrotitermessung neu bestimmt (BSA-Stocklösung 5mg/ml, Meßbereich 0,05-0,5 mg/ml).

Bei Proteinlysaten mit sehr geringen Konzentrationen wurde das Bradford Microverfahren im Mikrotiterformat angewendet. Hierbei wird das Bradford-Reagenz unverdünnt eingesetzt. Zu einem Probenvolumen von 160µl (maximal 10µl Proteinlysat mit ddH₂O verdünnt) wurden 40µl konzentriertes Bradford-Reagenz gegeben, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595nm bestimmt. Auch hier wurde bei jeder Messung die Standardkurve neu bestimmt (BSA-Stocklösung 2,56 mg/ml, Meßbereich 5-80µg/ml).

2.4.2 Proteinisolation

Zur Proteinisolation aus Bakterien wurden die Zellen zunächst in Lysispuffer aufgenommen, mit Ultraschall behandelt (100W, 3 x 20sec mit jeweils 15sec Pause, auf Eis) und anschließend 2min bei 14.000 x g alle unlöslichen Bestandteile und nicht lysierte Zellen abzentrifugiert. Der so erhaltene Überstand, der alle löslichen Bestandteile enthielt (*soluble fraction*), wurde mit Proteaseinhibitor versetzt und die Proteinkonzentration mittels der Bradford-Methode (s.o.) bestimmt. Die im Zentrifugationspellet enthaltenen unlöslichen Bestandteile (*non-soluble fraction*) wurden zur späteren Untersuchung direkt in 1x SDS-PAGE Ladepuffer aufgenommen.

Zur Proteinisolierung aus Zellkultur wurde zunächst das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit kaltem PBS auf Eis gewaschen. Anschließend wurden die Zellen direkt in NET-Puffer (650µl für 75cm² Zellkulturflaschen, 500µl für 10cm Zellkulturschalen, 100µl für 6-Well Zellkulturplatten) mit einem Gummischaber abgeschabt, in ein 1,5ml oder 2ml Probengefäß überführt und mittels Ultraschall homogenisiert (100W, 3x 20sec mit jeweils 15sec Pause, auf Eis). Das homogenisierte Lysat wurde daraufhin 20min mit 14.000xg bei 4°C zentrifugiert, der Überstand mit der cytosolischen Proteinfraction abgenommen und nach Konzentrationsbestimmung bei -80°C gelagert. Um eine Fraktionierung der Proteine nach subzellulärer Lokalisation zu erreichen wurde in einigen Fällen mittels differentieller Zentrifugation zunächst intakte Zellen und Nuklei (5 min, 500 x g) und anschließend die Mitochondrien (20min, 14.000 x g) pelletiert und in Lysispuffer aufgenommen oder das Mitochondrial Isolation Kit for Cultured Cells (Pierce, Thermo Scientific) bzw. NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce, Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.4.3 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen nach Molekülgröße erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Es wurden SDS-PAGE Gele (von 7,5 bis 12% Konzentration) verwendet.

Ansatz für ein 10% SDS-PAGE Trenngel:

30% Acrylamid/ 0,8% Bis-

Acrylamid Lösung	2,15ml
Trenngel-Puffer 2,5x	2,6ml
ddH ₂ O	1,75ml
TEMED	5µl
APS 10%	50µl

Die noch flüssige Lösung wurde in eine Plastik-Gelkassette (Invitrogen) gegossen und mit 70% Ethanol überschichtet, um einen geraden Abschluss zu erhalten. Nach der Polymerisation des Gels wurde das überschichtete Ethanol vorsichtig mit etwas Filterpapier aufgesogen.

Ansatz für Sammelgel:

30% Acrylamid/ 0,8% Bis-

Acrylamid Lösung	0,28ml
Sammelgel-Puffer 5x	0,33ml
ddH ₂ O	1,0ml
TEMED	2µl
APS 10%	15µl

Das Sammelgel wurde auf das ausgehärtete Trenngel gegossen und darin ein Probenkamm mit 12 Zähnen gesteckt. Das Gel wurde in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt (XCell *SureLock*[™] Mini Cell, Invitrogen) und die äußere und innere Kammer mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt. Der Probenkamm wurde daraufhin entfernt und die Taschen mehrfach mit Elektrophoresepuffer gespült. Proteinlysate wurden mit 5x Ladepuffer und ddH₂O so verdünnt, dass ein Probenvolumen von 15µl mit 10-20µg Proteingehalt erreicht wurde. Die Proben wurden 5min bei 95°C denaturiert und anschließend mit einer Mikroliterspritze

(Hamilton) in die Probenaschen des SDS-PAGE Gels aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde des weiteren 10µl eine Proteingrößenstandards (See blue Plus 2, Invitrogen) ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

Der Gellauf wurde für 1h 15min bei 110V durchgeführt und das Gel daraufhin entweder direkt mit einer Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend entfärbt um Proteine unspezifisch sichtbar zu machen, oder das Gel wurde für Western Blot verwendet (s.u.).

2.4.4 Western Blot

Zum immunochemischen Nachweis spezifischer Proteine wurden Proteinlysate zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western Blotting auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese Membran wird mit spezifischen Antikörpern inkubiert und in einem zweiten Schritt diese mit einem sekundären HRP-konjugiertem Antikörper nachgewiesen.

Tab. 16: Verwendete Antikörper

Antikörper	aus	eingesetzte Konzentration
Anti-ACSM2	<i>rabbit</i>	1:2500
Anti-PTGES2	<i>rabbit</i>	1:2500
Anti-V5 HRP	<i>mouse</i>	1:20000
Anti-GFP	<i>rabbit</i>	1:2500
Anti-Rabbit HRP	<i>goat</i>	1:10000
Anti-Mouse HRP	<i>chicken</i>	1:10000

Das SDS-PAGE Gel wurde aus der Kassette entfernt, darauf eine passend zugeschnittene PVDF-Membran, die zuvor 2min in Methanol angefeuchtet und anschließend mit ddH₂O und Transferpuffer gewaschen wurde, gelegt und diese zwischen zwei mit Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere gelegt. In ein XCell II™ Blot Modul wurde dieses Gel-Membran-Filterpapier Sandwich zwischen je zwei mit Transferpuffer getränkte Blotting-Schwämme gebracht und das Blot Modul in die Elektrophoresekammer gespannt. Das Blot Modul wurde mit Transferpuffer und die äußere Kammer mit ddH₂O gefüllt und der Blotting-Lauf für 1h bei 30V gestartet. Nach Abschluss des blottens wurde die Membran entnommen und zunächst mit Ponceau S die erfolgreiche Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran

überprüft. Die Membran wurde daraufhin über Nacht bei 4°C mit einer 3%igen Milchpulverlösung in TBST geblockt.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte ebenfalls in einer 3%igen Milchlösung mit TBST für 1 bis 4h bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler. Anschließend wurde die Membran 3x 10min mit TBST gewaschen, dann mit dem sekundären Antikörper 1h auf einem Wippschüttler inkubiert und zum Schluss nochmals 3x 10min mit TBST gewaschen. Der Nachweis erfolgte mittels ECL+ (Amersham) mit Röntgenfilm (Amersham) oder ChemiGlow™ (Alpha Innotech) mit einer Dokumentationsanlage (AlphaImager HP, Alpha Innotech) nach den Angaben der Hersteller.

2.4.5 Proteinaufreinigung

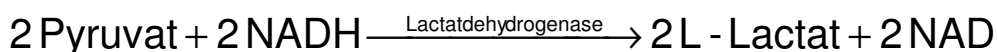
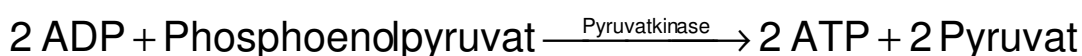
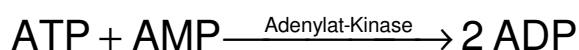
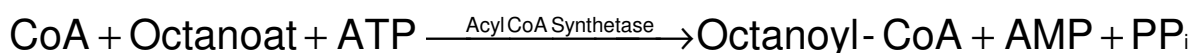
Die Isolierung von rekombinantem Protein aus *E. coli* oder Säugerzellen erfolgte mittels *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC). Als Material diente hierbei Ni-NTA Agarose (Qiagen) und Protino Ni-IDA Agarosesäulen (Macherey & Nagel).

Proteinlysate wurden wie beschrieben mit IMAC Lysispuffer aus *E. coli* oder Säugerzellen hergestellt. *E. coli* Lysate wurden mit Protino Ni-IDA Agarosesäulen aufgereinigt. Das Proteinlysate wurde auf die Säule gegeben, mit Waschpuffer 3 Mal gewaschen und anschließend in 3 Fraktionen à 240µl eluiert.

Zelllysate wurden mit 1µl Ni-NTA Agarose / 5µg Gesamtprotein zwischen 1 und 12h bei 4°C inkubiert. Nach 2-4 Waschschritten mit jeweils 800µl Waschpuffer wurde das rekombinante Protein in 3-5 Fraktionen à 100µl eluiert.

2.4.6 Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Acyl-CoA Synthetase Aktivität wurde eine Methode nach [Fujino *et al.*, 2001] verwendet, bei der in einer gekoppelten Reaktion der Umsatz von NADH zu NAD im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 340nm bestimmt wurde.



Der Reaktionsansatz bestand aus 100mmol/l Tris, 15mmol/l $MgCl_2$, 1mmol/l DTT, 10mmol/l ATP, 0,25mmol/l Phosphoenolpyruvat, 1mmol/l Natriumoctanoat, 0,3mmol/l NADH, 80U/ml Adenylatkinase, 6U/ml Pyruvatkinase, 17U/ml Lactatdehydrogenase, 0,6mmol/l Coenzym A und rekombinantem Protein. Der Ansatz wurde zunächst ohne Coenzym A pipettiert, die Extinktion bei 340nm für ca. 15min verfolgt bis diese stabil blieb, und danach die Reaktion durch Zugabe von Coenzym A gestartet und die Veränderung der Extinktion aufgezeichnet.

2.4.7 ELISA

Zur Bestimmung von Prostaglandin E_2 (PGE_2) Spiegeln nach *ex vivo* Stimulation wurde ein Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA) verwendet (Amersham Biosciences). Es handelte sich hierbei um einen kompetitiven Sandwich-ELISA (Meßbereich 2,5 bis 320pg/Well = 50 bis 6400 pg/ml) bei dem das in der Probe enthaltene PGE_2 mit dem HRP-konjugierten PGE_2 des Assays um die Bindungsstellen des PGE_2 -Antikörpers konkurriert und mittels TMB (Tetramethylbenzidine) nachgewiesen wird. Der Nachweis wurde mit jeweils 50 μ l Überstand aus der *ex vivo* Stimulation nach den Angaben des Herstellers (Protokoll 1) durchgeführt.

2.5 Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Statistics Package for the Social Sciences (SPSS) und Microsoft Excel.

Anhand der bestimmten Genotypen- und Allelfrequenzen wurden alle Kohorten mit Hilfe eines χ^2 -Testes auf die Verteilung der Genotypen im Hinblick auf das Hardy-Weinberg-Equilibrium geprüft. Bei einem geringen Vorkommen des seltenen Allels und damit verbundener geringer Anzahl seltener Homozygoter wurden die Heterozygoten und seltenen Homozygoten unter Annahme eines dominanten Effekts zu einer Gruppe zusammengefasst. Unterschiede normal verteilter Variablen wurden mittels Student's t-Test geprüft und bei Vorliegen einer schiefen Verteilung wurden die Variablen zunächst logarithmisch transformiert (\log_{10}) und anschließend mittels Student's t-Test geprüft, ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Für normal verteilte Variablen sind arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des Mittelwertes und für nicht normal verteilte Variablen das geometrische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Als weitere Aussage für die Assoziation eines untersuchten Allels mit einem binären Merkmal wurde das Chancenverhältnis (*Odds Ratio*) zwischen Auftreten des seltenen Allels und dem Auftreten von Typ 2 DM und gestörtem Glucosemetabolismus berechnet (Signifikanztest Exakter Test nach Fisher).

3 Ergebnisse

3.1 Acyl-CoA Synthetasen *medium-chain*

3.1.1 Assoziationsstudien

Für die Assoziationsstudien wurden alle bekannten Mitglieder der ACSM-Genfamilie, die auf Chromosom 16 lokalisiert sind, zur Genotypisierung in der MICK-Kohorte ausgewählt. Für jedes der vier ACSM-Gene (1–3, 5) wurde mindestens ein SNP untersucht. Die Auswahl erfolgte aufgrund von Literaturbefunden [Iwai *et al.*, 2002; Iwai *et al.*, 2003]. Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in Tabelle 17 aufgeführt. Die Frequenzen der seltenen Allele liegen zwischen 9 und 25% und eine Überprüfung der Allelverteilung auf Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mittels χ^2 Test ergab keine signifikanten Abweichungen hiervon.

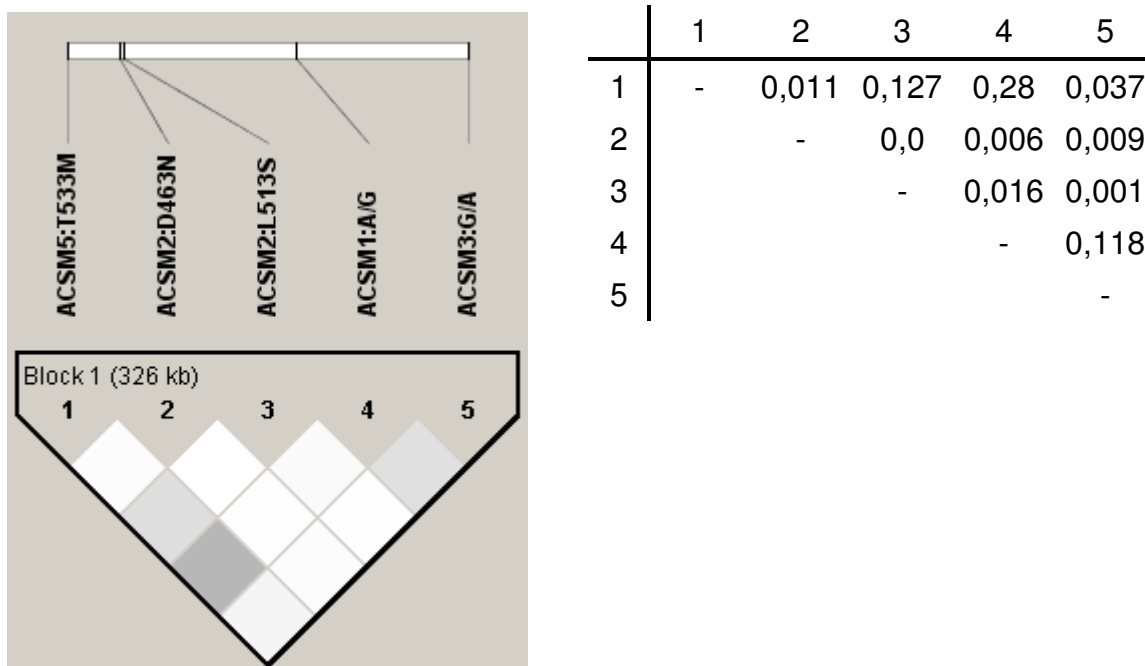
Tab. 17: Allelfrequenzen der untersuchten ACSM SNPs in MICK

	Basen- Austausch	AS- Austausch	A/A	A/a	a/a	MAF	χ^2 p
ACSM1	A/G	-	525	163	14	0,14	0,7461
ACSM2	C/T	L513S	577	125	3	0,09	0,1679
ACSM2	G/A	D463N	526	149	11	0,12	0,9043
ACSM3	G/A	-	393	276	41	0,25	0,4113
ACSM5	C/T	T533M	428	232	34	0,22	0,7234

AS: Aminosäure, A: häufiges Allel, a: seltenes Allel, MAF: *minor allele frequency*

Da die untersuchten Mitglieder der ACSM-Genfamilie auf dem chromosomalen Abschnitt 16p12/13 lokalisiert sind, ist es möglich, dass es hier zu *Linkage*-Phänomenen zwischen den einzelnen Polymorphismen kommt. Hierzu wurde das *linkage disequilibrium* (LD)-Maß r^2 anhand der vorliegenden Genotypisierungsdaten abgeschätzt (Abb. 12). Es zeigen sich in der untersuchten Kohorte keine ausgeprägten Verbindungen zwischen den gewählten Polymorphismen (max. $r^2=0,28$), so dass die beobachteten Effekte getrennt voneinander betrachtet werden müssen.

Abb. 12: Verbindung zwischen den gewählten ACSM SNPs mit LD-Maß r^2



Darstellung des Haplotypenblocks: intensivere Färbung entspricht höherem r^2 -Wert, Tabelle = r^2 -Werte, Daten erstellt mit HaploView 4.0

Die ausgewählten Polymorphismen wurden auf ihre Assoziation mit anthropometrischen (Gewicht, BMI, WHR) und metabolischen Merkmalen (Blutdruck, Cholesterinspiegel, Triglyceride, Glucose, Insulin) untersucht. Des Weiteren wurden Glucose-, Insulin- und Triglyceride vor und im Zeitverlauf nach Applikation einer Hochfettmahlzeit (oMTT) untersucht. Die Ergebnisse für die einzelnen Polymorphismen sind in den Tabellen 18a bis e aufgeführt.

Weder der ACSM1 A/G (Tab. 18a) noch der ACSM5 T533M (Tab. 18e) SNP zeigt signifikante Assoziationen zu irgendeinem der betrachteten Merkmale. Im Gegensatz hierzu können für den ACSM3 Promotor-SNP einige Unterschiede festgestellt werden (Tab. 18d). Die Gruppe der Träger des seltenen A-Allels in homo- oder heterozygoter Form zeigt ein höheres Gewicht ($p=0,035$), Hüftumfang ($p=0,044$) und BMI ($p=0,04$) als die Gruppe der homozygoten Träger des häufigen G-Allels. Diese Effekte sind trotz des durchschnittlich geringeren Alters der Träger des seltenen Allels ($p=0,02$) zu beobachten.

Der Großteil signifikanter Assoziationen kann bei den untersuchten Polymorphismen des ACSM2-Gens beobachtet werden (Tab. 18 b und c). Bei dem ACSM2 D463N Polymorphismus scheint es sich bei den Trägern des seltenen Allels um protektive

Effekte und bei Trägern des seltenen 513S Allels um negative Effekte zu handeln. Träger des seltenen 463N Allels zeigen einen signifikant erniedrigten BMI ($p=0,05$), systolischen Blutdruck ($p=0,05$), nüchtern-Triglyceridspiegel ($p=0,04$) und postprandiale Glucose- und Triglyceridverläufe ($p=0,04$ und $0,05$). Die Auswertung des ACSM2 L513S Polymorphismus ergibt für diese Arbeit die vielversprechendsten Ergebnisse. In der Gruppe der Träger des seltenen 513S Allels findet sich eine Vielzahl signifikant verschiedener Parameter: erhöhtes Gewicht ($p=0,037$), BMI ($p=0,05$), systolischer und diastolischer Blutdruck ($p=0,012$ und $0,034$), nüchtern-Triglyceridspiegel ($p=0,012$), gesamt Cholesterin ($p=0,027$), postprandiale Glucose- und Triglyceridverläufe ($p=0,006$ und $0,014$) und erniedrigtes HDL-Cholesterin ($p=0,022$). Des Weiteren lassen sich erhöhte Taillenumfänge, LDL-Cholesterinspiegel und Insulinresistenz beobachten, die jedoch nur ein Signifikanzniveau von $p= 0,062-0,075$ erreichen.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint der nicht-synonyme ACSM2 L513S Polymorphismus die stärksten Effekte auf metabolische Parameter zu haben, die mit Insulinresistenz und Typ 2 DM in Verbindung gebracht werden.

Abkürzungen in den Tabellen 18a-e:

BMI: *body mass index*, WHR: *waist to hip ratio*, Sys: systolischer Blutdruck, Dias: diastolischer Blutdruck, HDL: *high density lipoprotein*, LDL: *low density lipoprotein*, HOMA IR: *homeostasis model assessment (insulin resistance)*, pp: postprandial, AUC: *area under the curve* (Fläche unter der Kurve), SFM: Standardfehler des Mittelwerts

Tab. 18a: Assoziationen von ACSM1 A/G mit metabolischen Parametern in MICK

	A/A	A/G + G/G	p
n	525	177 (163+14)	
Alter ^{a)} [a]	59 (0,24)	59 (0,42)	0,25
Gewicht ^{a)} [kg]	86,08 (0,621)	86,4 (1,054)	0,796
Taillenumfang ^{a)} [cm]	100 (0,53)	100 (0,96)	0,88
Hüftumfang ^{a)} [cm]	100,83 (0,381)	101,43 (0,558)	0,412
BMI ^{a)} [kg*m ⁻²]	27,34 (0,18)	27,38 (0,28)	0,97
WHR ^{a)}	0,99 (0,003)	0,99 (0,01)	0,91
Sys ^{a)} [mmHg]	129 (0,79)	130 (1,28)	0,38
Dias ^{a)} [mmHg]	80 (0,48)	82 (0,77)	0,11
Glucose ^{b,c)} [mg*dl ⁻¹]	104,5 (103,8-105,1)	102,8 (102,1-103,5)	0,09
Insulin ^{b,c)} [μU*ml ⁻¹]	12,54 (12,25-12,83)	12,57 (12,11-13,04)	0,954
Triglyceride ^{b)} [mg*dl ⁻¹]	124,2 (121,4-127,0)	118,2 (114,6-122,5)	0,28
Cholesterin ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	227,75 (1,798)	223,74 (3,063)	0,261
HDL ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	53,00 (0,65)	54,58 (1,06)	0,22
LDL ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	144,41 (1,4)	142,21 (1,55)	0,44
HOMA IR ^{b,c)}	3,2 (3,15-3,32)	3,2 (3,07-3,33)	0,80
ppGlucose AUC ^{b)}	517 (514-521)	510 (506-514)	0,19
ppInsulin AUC ^{b)}	167 (163-172)	166 (158-174)	0,87
ppTriglyceride AUC ^{b)}	1562 (1530-1594)	1485 (1436-1534)	0,21

a) arithmetisches Mittel (SFM) Signifikanz t-Test (2-seitig), b) geometrisches Mittel (-/+ SFM) Signifikanz t-Test der log₁₀-Daten, c) Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen

Tab. 18b: Assoziationen von ACSM2 D463N mit metabolischen Parametern in MICK

	D/D	D/N + N/N	p
n	526	160 (149+11)	
Alter ^{a)} [a]	59 (0,24)	59 (0,46)	0,71
Gewicht ^{a)} [kg]	86,78 (0,622)	84,55 (1,059)	0,079
Taillenumfang ^{a)} [cm]	100 (0,54)	99 (0,90)	0,27
Hüftumfang ^{a)} [cm]	101,33 (0,365)	100,14 (0,661)	0,116
BMI ^{a)} [kg*m ⁻²]	27,58 (0,18)	26,84 (0,31)	0,05
WHR ^{a)}	0,99 (0,003)	0,99 (0,005)	0,91
Sys ^{a)} [mmHg]	130 (0,75)	127 (1,53)	0,05
Dias ^{a)} [mmHg]	81 (0,46)	80 (0,94)	0,27
Glucose ^{b,c)} [mg*dl ⁻¹]	104,5 (103,9-105,2)	102,6 (101,7-103,5)	0,12
Insulin ^{b,c)} [μU*ml ⁻¹]	12,78 (12,49-13,07)	12,11 (11,62-12,62)	0,263
Triglyceride ^{b)} [mg*dl ⁻¹]	126,3 (123,5-129,0)	114,7 (110,1-119,3)	0,04
Cholesterin ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	226,33 (1,813)	228,26 (3,206)	0,604
HDL ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	52,74 (0,63)	54,31 (1,17)	0,23
LDL ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	143,64 (1,45)	144,74 (2,54)	0,71
HOMA IR ^{b,c)}	3,3 (3,22-3,39)	3,1 (2,92-3,21)	0,16
ppGlucose AUC ^{b)}	520 (516-524)	505 (500-510)	0,04
ppInsulin AUC ^{b)}	171 (167-176)	158 (151-166)	0,15
ppTriglyceride AUC ^{b)}	1583 (1551-1615)	1457 (1405-1510)	0,05

a) arithmetisches Mittel (SFM) Signifikanz t-Test (2-seitig), b) geometrisches Mittel (-/+ SFM) Signifikanz t-Test der log₁₀-Daten, c) Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen

Tab. 18c: Assoziationen von ACSM2 L513S mit metabolischen Parametern in MICK

	L/L	L/S+S/S	p
n	577	128 (125+3)	
Alter ^{a)} [a]	59 (0,23)	59 (0,47)	0,371
Gewicht ^{a)} [kg]	86 (0,58)	89 (1,34)	0,037
Taillenumfang ^{a)} [cm]	99,9 (0,489)	102,0 (1,058)	0,062
Hüftumfang ^{a)} [cm]	100,8 (0,351)	102,1 (0,736)	0,112
BMI ^{a)} [kg*m ⁻²]	27,27 (0,1706)	28,06 (0,3684)	0,050
WHR ^{a)}	0,990 (0,00255)	0,998 (0,00551)	0,158
Sys ^{a)} [mmHg]	129 (0,74)	133 (1,56)	0,012
Dias ^{a)} [mmHg]	80 (0,45)	82 (0,93)	0,034
Glucose ^{b,c)} [mg*dl ⁻¹]	103,62 (103,09-104,15)	106,42 (104,91-107,95)	0,236
Insulin ^{b,c)} [μU*ml ⁻¹]	12,46 (12,19-12,73)	13,41 (12,77-14,08)	0,229
Triglyceride ^{b)} [mg*dl ⁻¹]	120,10 (117,70-122,54)	135,84 (129,32-142,69)	0,012
Cholesterin ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	225,2 (1,658)	234,1 (4,139)	0,027
HDL ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	53,94 (0,6188)	50,63 (1,2395)	0,022
LDL ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	142,80 (1,3549)	148,55 (3,0789)	0,076
HOMA IR ^{b,c)}	3,18 (3,11-3,26)	3,53 (3,33-3,74)	0,075
ppGlucose AUC ^{b)}	512,45 (509,21-515,70)	535,00 (526,13-544,02)	0,006
ppInsulin AUC ^{b)}	165,38 (161,38-169,48)	182,5 (172,41-193,18)	0,093
ppTriglyceride AUC ^{b)}	1513,2 (1484,5-1542,4)	1690,4 (1622,2-1761,5)	0,014

a) arithmetisches Mittel (SFM) Signifikanz t-Test (2-seitig), b) geometrisches Mittel (-/+ SFM) Signifikanz t-Test der log₁₀-Daten, c) Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen

Tab. 18d: Assoziationen von ACSM3 G/A mit metabolischen Parametern in MICK

	G/G	G/A +A/A	p
n	393	317 (276+41)	
Alter ^{a)} [a]	59 (0,26)	58 (0,32)	0,02
Gewicht ^{a)} [kg]	85,19 (0,7)	87,45 (0,814)	0,035
Taillenumfang ^{a)} [cm]	100 (0,60)	101 (0,71)	0,20
Hüftumfang ^{a)} [cm]	100,44 (0,433)	101,72 (0,455)	0,044
BMI ^{a)} [kg*m ⁻²]	27,12 (0,21)	27,76 (0,23)	0,04
WHR ^{a)}	0,99 (0,003)	0,99 (0,004)	0,83
Sys ^{a)} [mmHg]	129 (0,92)	130 (0,97)	0,35
Dias ^{a)} [mmHg]	80 (0,57)	81 (0,57)	0,76
Glucose ^{b,c)} [mg*dl ⁻¹]	104,3 (103,5-105,0)	103,8 (103,1-104,5)	0,64
Insulin ^{b,c)} [μU*ml ⁻¹]	12,39 (12,07-12,72)	12,73 (12,36-13,11)	0,494
Triglyceride ^{b)} [mg*dl ⁻¹]	123,2 (120,0-126,4)	121,4 (118,2-124,7)	0,71
Cholesterin ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	228,08 (2,149)	225,17 (2,217)	0,35
HDL ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	53,73 (0,79)	53,00 (0,75)	0,52
LDL ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	144,25 (1,67)	143,32 (1,85)	0,71
HOMA IR ^{b,c)}	3,2 (3,09-3,28)	3,3 (3,17-3,38)	0,54
ppGlucose AUC ^{b)}	516 (512-520)	516 (511-520)	0,97
ppInsulin AUC ^{b)}	163 (159-168)	172 (166-179)	0,24
ppTriglyceride AUC ^{b)}	1548 (1512-1585)	1528 (1490-1568)	0,72

a) arithmetisches Mittel (SFM) Signifikanz t-Test (2-seitig), b) geometrisches Mittel (-/+ SFM) Signifikanz t-Test der log₁₀-Daten, c) Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen

Tab. 18e: Assoziationen von ACSM5 T533M mit metabolischen Parametern in MICK

	T/T	T/M + M/M	p
n	429	266	
Alter ^{a)} [a]	59 (0,26)	59 (0,34)	0,49
Gewicht ^{a)} [kg]	85,81 (0,689)	87,2 (0,863)	0,208
Taillenumfang ^{a)} [cm]	100 (0,58)	101 (0,78)	0,36
Hüftumfang ^{a)} [cm]	100,61 (0,424)	101,76 (0,478)	0,081
BMI ^{a)} [kg*m ⁻²]	27,28 (0,20)	27,64 (0,24)	0,27
WHR ^{a)}	0,99 (0,003)	0,99 (0,005)	0,61
Sys ^{a)} [mmHg]	129 (0,90)	131 (1,02)	0,13
Dias ^{a)} [mmHg]	80 (0,53)	81 (0,63)	0,12
Glucose ^{b,c)} [mg*dl ⁻¹]	103,8 (103,2-104,5)	104,4 (103,6-105,22)	0,56
Insulin ^{b,c)} [μU*ml ⁻¹]	12,53 (12,22-12,86)	12,75 (12,37-13,15)	0,669
Triglyceride ^{b)} [mg*dl ⁻¹]	122,1 (119,2-125,1)	122,6 (118,9-126,4)	0,92
Cholesterin ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	228,37 (1,949)	225,18 (2,636)	0,323
HDL ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	54,23 (0,75)	52,05 (0,82)	0,06
LDL ^{a)} [mg*dl ⁻¹]	144,77 (1,54)	143,14 (2,12)	0,53 ^{c)}
HOMA IR ^{b,c)}	3,2 (3,12-3,31)	3,3 (3,18-3,41)	0,62
ppGlucose AUC ^{b)}	513 (509-517)	520 (515-524)	0,33
ppInsulin AUC ^{b)}	166 (161-171)	169 (163-175)	0,73
ppTriglyceride AUC ^{b)}	1539 (1505-1573)	1548 (1504-1593)	0,87

a) arithmetisches Mittel (SFM) Signifikanz t-Test (2-seitig), b) geometrisches Mittel (-/+ SFM) Signifikanz t-Test der log₁₀-Daten, c) Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen

Abbildung 13 zeigt eine detaillierte Darstellung der signifikant assoziierten postprandialen Parameter in Abhängigkeit vom ACSM2 L513S Polymorphismus. Bei dieser Analyse wurde zunächst eine nüchterne Blutprobe entnommen und anschließend eine Testmahlzeit appliziert. In den darauf folgenden Stunden wurden regelmäßig weitere Blutproben entnommen um so ein postprandiales Profil von Glucose-, Insulin- und Triglyceridspiegeln zu erstellen. Der Kurvenverlauf der Triglyceride zeigt hier eine Erhöhung bei Trägern des seltenen 513S Allels über die gesamte Dauer des oMTT. Im Gegensatz hierzu lässt sich eine Erhöhung der Glucosespiegel bei Trägern des seltenen 513S Allels vor allem zwischen 30 Minuten und 2 Stunden beobachten.

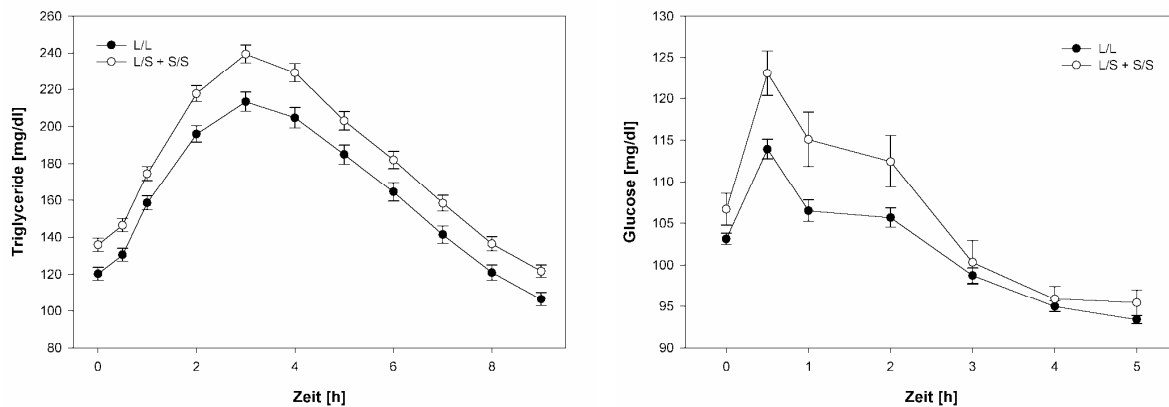


Abb. 13: Verlauf der Triglycerid- und Glucosespiegel nach einer Testmahlzeit (oMTT) abhängig vom ACSM2 L513S SNP (geometrisches Mittel \pm Standardfehler)

Neben diesen quantitativen Merkmalen wurde des Weiteren die Assoziation der ACSM-SNPs mit dem qualitativen Merkmal des gestörten Glucosemetabolismus und Typ 2 DM untersucht. In der vorliegenden Kohorte wurden 117 Männer mit gestörtem Glucosemetabolismus identifiziert (nüchtern Glucose >110 mg/dL in zwei unabhängigen Messungen oder postprandiale Glucose nach oGTT >140 mg/dL), hiervon hatten 49 einen ausgeprägten Typ 2 DM (nüchtern Glucose >126 mg/dL in zwei unabhängigen Messungen oder postprandiale Glucose nach oGTT >200 mg/dL). Die Ergebnisse dieser Auswertung, als Odds Ratio angegeben, zeigen keine signifikanten Assoziationen der einzelnen Polymorphismen mit dem Auftreten von gestörtem Glucosemetabolismus und Typ 2 DM, wobei ACSM2 L513S und ACSM5 T533M mit Odds Ratios von 1,48 und 1,39 Signifikanzen von $p=0,07$ und $0,08$ erreichen (Tab. 19).

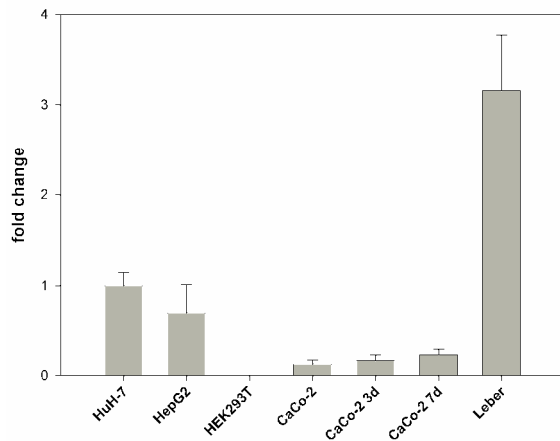
Tab. 19: Assoziationen von ACSM SNPs mit gestörtem Glucosemetabolismus / Typ 2 DM in MICK

	IGM+Typ 2 DM (%)	Kontrollen (%)	OR (95% KI)	p ^{a)}
ACSM1 A/A	128 (75)	395 (75)	1,0	
ACSM1 A/G+G/G	43 (25)	134 (25)	0,99 (0,67-1,47)	1,00
ACSM2 D/D	134 (80)	391 (76)	1,0	
ACSM2 D/N+N/N	33 (20)	126 (24)	0,76 (0,50-1,18)	0,25
ACSM2 L/L	135 (77)	442 (83)	1,0	
ACSM2 L/S+S/S	40 (23)	88 (16)	1,48 (0,98-2,27)	0,07
ACSM3 G/G	92 (53)	300 (56)	1,0	
ACSM3 G/A+A/A	81 (47)	235 (44)	1,12 (0,80-1,56)	0,54
ACSM5 T/T	94 (56)	335 (64)	1,0	
ACSM5 T/M+M/M	74 (44)	190 (36)	1,39 (0,98-1,98)	0,08

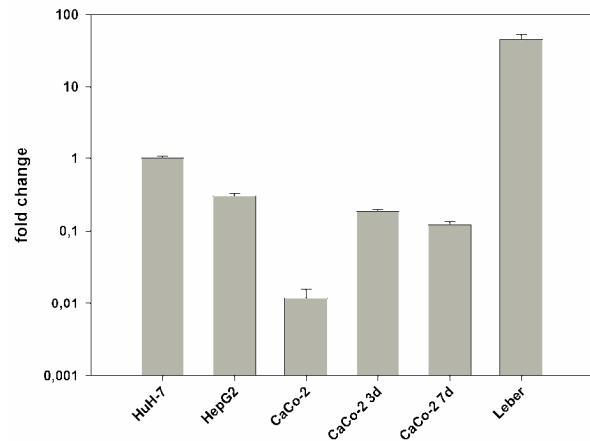
IGM: *impaired glucose metabolism* = gestörter Glucosemetabolismus, OR: Odds Ratio, KI: Konfidenzintervall ^{a)} Signifikanz Fishers Exact Test, 2-seitig

3.1.2 Nachweis von ACSMs

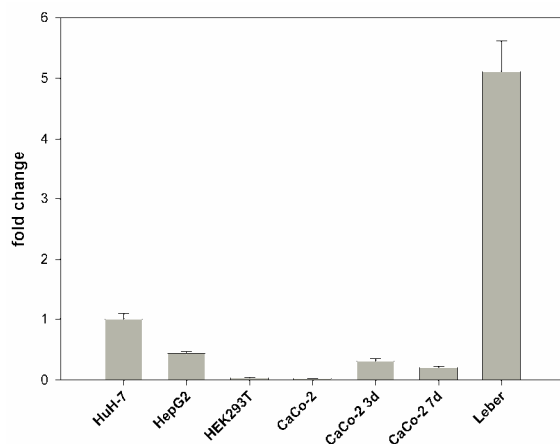
Um das Vorkommen der verschiedenen ACSMs im *in vivo* Hauptexpressionsort Leber und in verschiedenen humanen Zellkulturlinien zu beurteilen wurde die Methode der quantitativen *Realtime* PCR verwendet. Einerseits wurden die relativen Transkriptmengen der einzelnen ACSMs zwischen verschiedenen Zelllinien und humaner Leber bestimmt. Andererseits wurde die relative Häufigkeit der Transkripte zueinander in der Leber ermittelt. Die Ergebnisse für die einzelnen ACSMs sind in Abbildung 14 dargestellt. Für das ACSM2-Gen wurde sowohl die Gesamtexpression von ACSM2 A und B als auch die Expression von ACSM2A alleine bestimmt. Alle ACSM-Transkripte werden im Vergleich mit den humanen Zelllinien HuH-7, HepG2, HEK293T und CaCo-2 am stärksten in der humanen Leber exprimiert. Hierbei zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede in der relativen Menge. Während ACSM1, ACSM3 und ACSM2A im Vergleich zu HuH-7 etwa die 3 bis 6-fache Menge in der Leber zeigen, liegt der Faktor bei ACSM2A/B und ACSM5 beim 44 bis über 400-fachen.



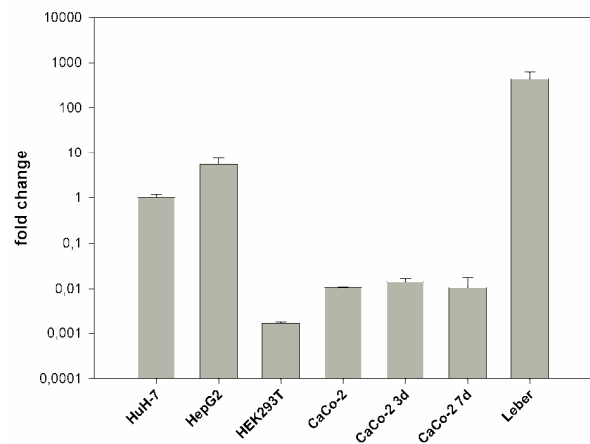
ACSM1 (relative Methode)



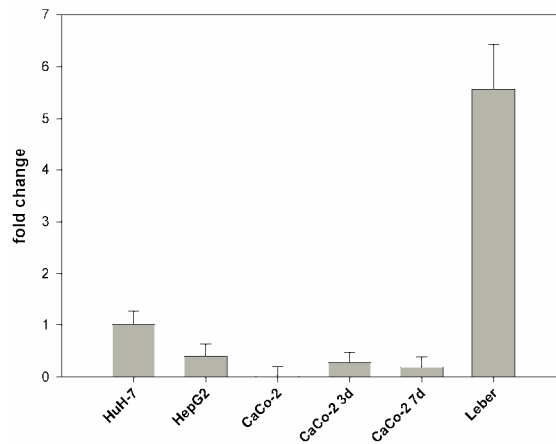
ACSM2A/B log10 Skala ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)



ACSM3 ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)



ACSM5 log10 Skala (relative Methode)



ACSM2A (relative Methode)

Abb. 14: Vergleich der relativen Transkriptmengen von ACSMs in verschiedenen Zelllinien und humaner Leber, mit HuH-7 als Referenzpunkt (n=2-3, Mittelwerte +Standardabweichung)

cDNA aus den humanen Zelllinien HuH-7, HepG2 (beides Leber), HEK293T (Niere), präkonfluenten, 3- und 7-Tage postkonfluenten CaCo-2 (intestinal) und humaner Leber wurden mittels der TaqMan-Methode quantifiziert, die Daten der HuH-7 Zellen wurden als Referenz gleich 1 gesetzt. Abhängig von der Effizienz der PCR-Reaktion wurden die Daten mittels der relativen Methode mit Standardkurve oder der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet.

Ein Vergleich der relativen Transkriptmengen der ACSMs in der Leber miteinander (Abb. 15) zeigt, dass ACSM2 hier am stärksten exprimiert ist (hier gleich 100% gesetzt). Die mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode erhaltenen Ergebnisse für die anderen Transkripte entsprechen demnach für ACSM3 16,5%, ACSM5 10,9%, ACSM1 und ACSM2A jeweils 0,2% der ACSM2-Expression.

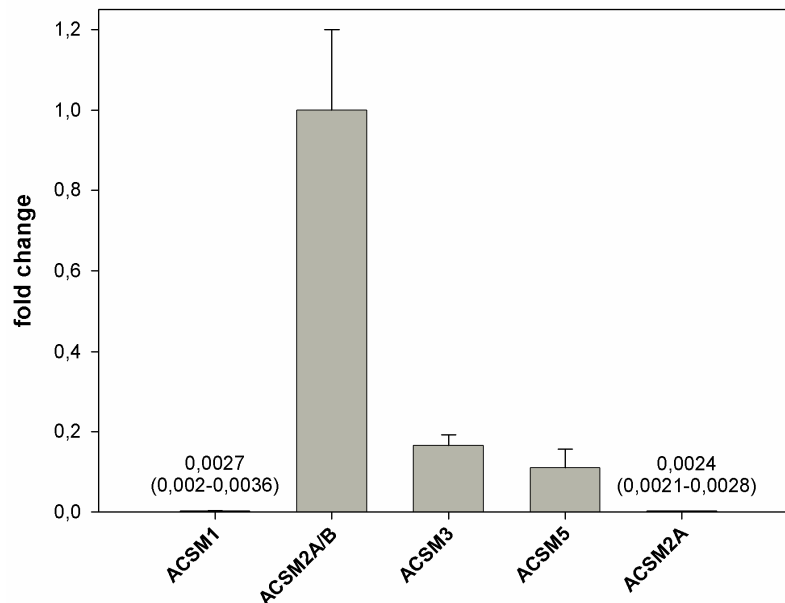


Abb. 15: Vergleich der einzelnen ACSM-Transkriptmengen in humaner Leber (n=2-3, Mittelwert +Standardabweichung)

Das ACSM2B Transkript ist das am häufigsten vorkommende ACSM-Transkript in der Leber. Außerdem zeigen SNPs in diesem Gen eindeutige Assoziationen mit Merkmalen der Insulinsresistenz. Aus diesen Gründen wurde dieses Gen weitergehend untersucht.

Auf Proteinebene wurde ACSM2 mit Hilfe eines spezifischen polyklonalen Antikörpers nachgewiesen. Das Vorkommen von ACSM2 als Signal bei 62kDa im Western Blot konnte in humanem Leberprotein, jedoch nicht in den humanen Leberzelllinien HepG2 oder HuH-7 gezeigt werden (Abb. 16). Dies bestätigt die Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung mit der mehr als 40-fachen Transkriptmenge in humaner Leber im Vergleich zu HuH-7 und HepG2.

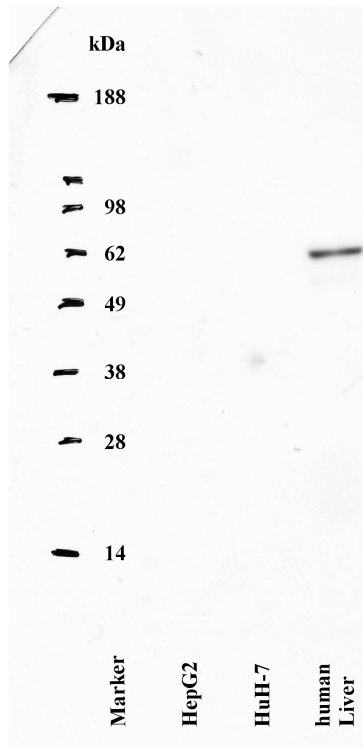


Abb. 16: Nachweis von ACSM2 in Leberzelllinien und humaner Leber

Je Spur der SDS-PAGE wurden 20 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Der Blot wurde mit dem primären Anti-ACSM2 Antikörper und anschließend mit einem sekundären, HRP-konjugierten Anti-Rabbit Antikörper inkubiert. Der Nachweis erfolgte mittels ECL.

Um die subzelluläre Lokalisation des ACSM2-Proteins zu bestimmen, wurde ein ACSM2-GFP Fusionsprotein in HuH-7 Zellen exprimiert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion des Expressionskonstruktes wurden die Mitochondrien mit MitoTracker Red CMXRos und die Zellkerne mit Hoechst 33258 angefärbt. Mittels konfokaler Laser-scanning Mikroskopie wurde gezeigt, dass das ACSM2-GFP Fusionsproteins in den Mitochondrien lokalisiert ist. Dies wird durch die Gelbfärbung, die die Kolo-kalisation des roten Mitochondrienmarkers mit dem grünen ACSM2-GFP Fusionsprotein zeigt, demonstriert (Abb. 17).

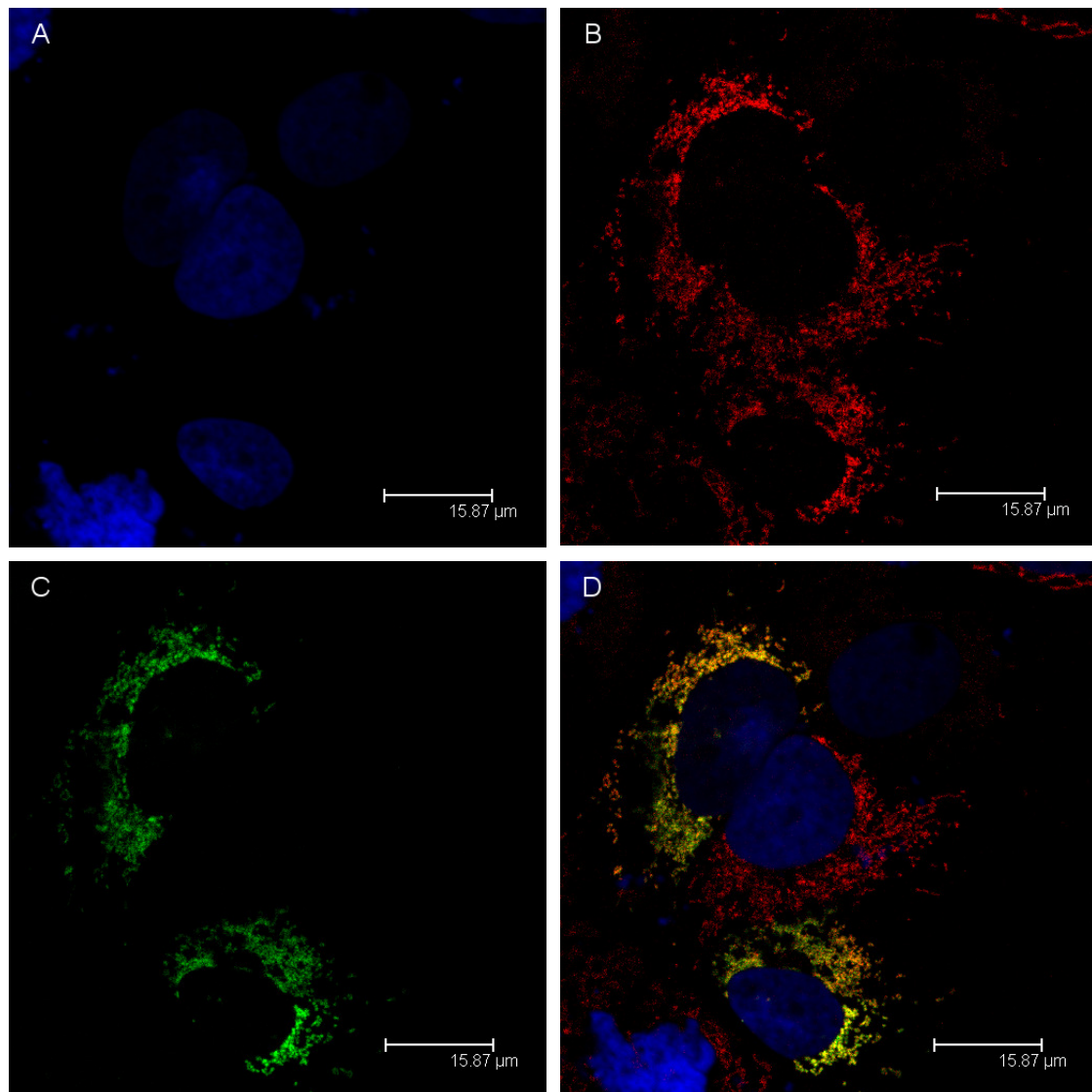


Abb. 17: Expression und subzelluläre Lokalisation von ACSM2-GFP in HuH-7

A: Zellkerne (Hoechst 33258), B: Mitochondrien (MitoTracker Red CMXRos), C: ACSM2-GFP Fusionsprotein, D: *overlay*

Das Vorhandensein einer N-terminalen Signalsequenz, die für die mitochondriale Lokalisation notwendig ist, wurde mit einem weiteren Expressionskonstrukt geprüft. Hierzu wurde ein Expressionskonstrukt hergestellt, welches für ein um 47 Aminosäuren verkürztes ACSM2t47-GFP Fusionsprotein codiert. Dieses Fusionsprotein wurde ebenfalls für vierundzwanzig Stunden in HuH-7 Zellen exprimiert und anschließend Mitochondrien und Zellkerne mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Ergebnisse der konfokalen Laser-scanning Mikroskopie zeigen eine diffuse Verteilung des ACSM2t47-GFP Fusionsproteins und keine Kolokalisation mit Mitochondrien oder Zellkernen (Abb. 18). Dies bestätigt das Vorhandensein einer N-terminalen mitochondrialen Signalsequenz im ASCM2-Protein.

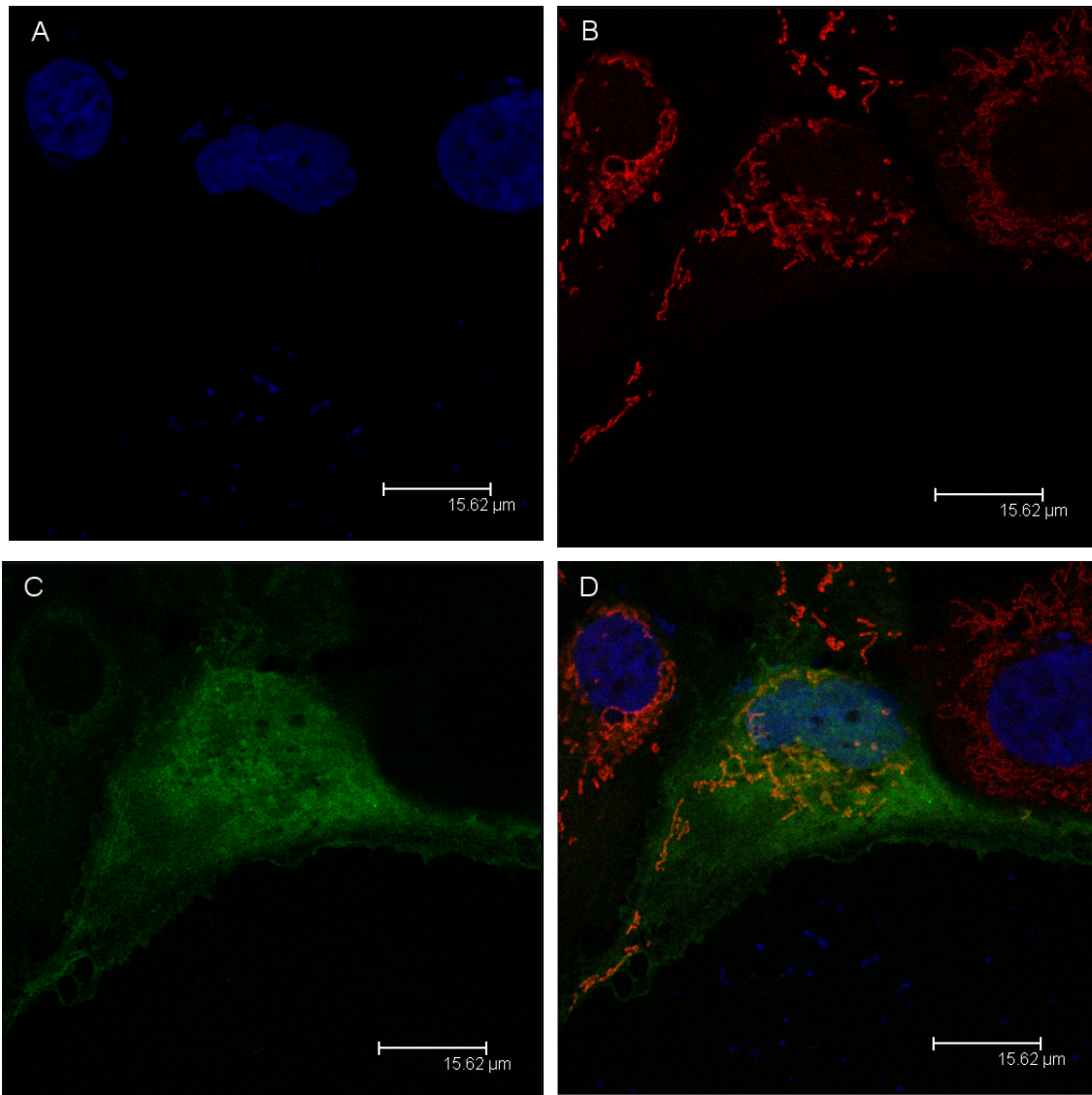


Abb. 18: Expression und subzelluläre Lokalisation des N-terminal verkürzten ACSM2t47-GFP in HuH-7

A: Zellkerne (Hoechst 33258), B: Mitochondrien (MitoTracker Red CMXRos), C: ACSM2-GFP Fusionsprotein, D: *overlay*

3.1.3 Versuch der heterologen Expression von ACSM2

Zur weiterführenden Untersuchung des humanen ACSM2 im Hinblick auf den L513S SNP sollte das Protein in beiden vorkommenden Formen heterolog exprimiert, aufgereinigt und enzymatisch charakterisiert werden. Für die heterologe Expression in *E. coli* wurden verschiedene Expressionsvektoren (pET102/D-TOPO, pcDNA.DEST42, pColdI), Expressionsstämme (BL21.DE3, Arctic Express), Expressionskonstrukte (ACSM2 Gesamtlänge und ACSM2trunc47) verwendet und die Expressionsbedingungen bezüglich Temperatur, IPTG-Konzentration und Zugabe von osmotisch aktiven Verbindungen variiert. In allen Expressionsansätzen

lag das ACSM2-Protein zum größten Teil in nicht-löslichen Inklusionskörpern vor. Abbildung 19 zeigt beispielhaft die Analyse von drei ACSM2-Expressionsklonen mittels SDS-Gelelektrophorese und hier das verstärkte Vorkommen von unlöslichen ACSM2-Inklusionskörpern bei 62kDa in den Spuren 8, 9 und 10.

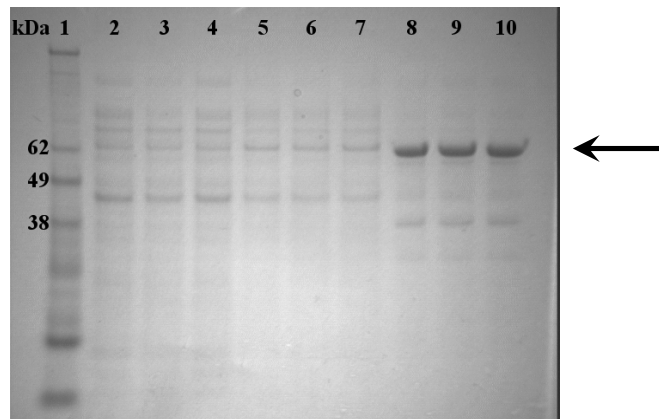


Abb. 19: Expressionsanalyse von drei ACSM2-Expressionskonstrukten in *E. coli* mit SDS-PAGE, der Pfeil zeigt das ACSM2-Protein der Größe von 62kDa

1: Marker, 2-4: 3 Klone lösliche Fraktion 0h, 5-7: 3 Klone lösliche Fraktion 2h nach Induktion, 8-10: 3 Klone unlösliche Fraktion 2h nach Induktion. Drei Klone des Expressionskonstruktes ACSM2.pET-DEST42 in BL21 (DE3) wurden für den Versuch in LB-Medium angezogen. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von $\sim 0,5$ wurde durch Zugabe von IPTG zu 1mM/l die Expression induziert. Nach zwei Stunden wurde wie beschrieben Gesamtprotein aus den löslichen und unlöslichen Fraktionen isoliert.

Die Menge des rekombinanten Proteins in der löslichen Fraktion erwies sich als nicht ausreichend um nach einer Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Abb. 20) mit 15-40 μ g rekombinantes ACSM2 enzymatische Aktivitäten nachzuweisen.

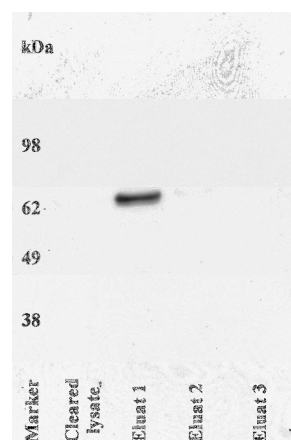


Abb. 20: Nachweis des ACSM2.pET-DEST42 Expressionsproduktes nach Affinitätschromatographie (Western-Blot mit Anti-ACSM2 Antikörper)

Als alternative Expressionssysteme wurden die humane Nierenzelllinie HEK293T und die *Cercopithecus aethiops* Nierenzelllinie COS-7 gewählt. Bis zu zehn Zellkulturschalen von 10cm Durchmesser mit HEK293T-Zellen wurden mit ACSM2-Expressionskonstrukten transient transfiziert und nach 48h Protein für die Aufreinigung geerntet. COS-7 Zellen wurden ebenso transient transfiziert, jedoch anschließend unter Selektionsdruck mit G418 weiter kultiviert, so dass das transfizierte Plasmid weiter propagiert wurde und auch nach mehreren Passagen noch rekombinantes ACSM2 nachgewiesen werden konnte. Das hierbei erhaltene rekombinante Protein lag einerseits in nur sehr geringen Mengen vor (<1µg pro Transfektionsansatz) und andererseits zeigte die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie auch nach mehreren Schritten immer noch starke Verunreinigungen durch nicht-spezifisch gebundene Proteine (Abb. 21). Aufgrund dieser negativen Ergebnisse wurden die Experimente zur rekombinanten Expression von ACSM2 an dieser Stelle abgebrochen.

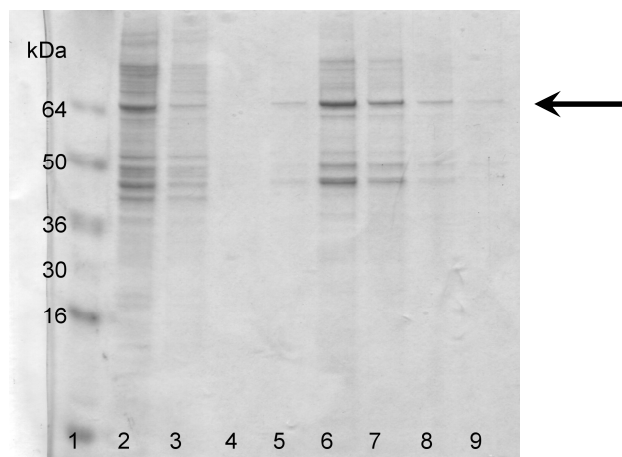


Abb. 21: Aufreinigung von rekombinantem ACSM2-Protein aus transient transfizierten HEK293T mittels Affinitätschromatographie, der Pfeil zeigt das ACSM2-Protein von ca. 64kDa Größe

1: Größenmarker, 2: erster Bindungsschritt, 3: erster Waschschrift, 4: zweiter Waschschrift, 5: Eluat 1, 6: Eluat 2, 7: Eluat 3, 8: Eluat 4, 9: Eluat 5

3.2 Prostaglandin E Synthase 2

3.2.1 Assoziationsstudien

Für die Untersuchung der möglichen Assoziationen der humanen Prostaglandin E Synthase 2 (PTGES2) mit Insulinresistenz und Typ 2 DM wurde ein Polymorphismus

ausgewählt, der zu einem Aminosäureaustausch in Position 298 des Proteins führt (R298H). Nach der Genotypisierung und Auszählung von Genotypen und Allelfrequenzen ergaben sich in der untersuchten Kohorte keine Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Tab. 20).

Tab. 20: Allelfrequenzen des PTGES2 R298H Polymorphismus in MICK

	Basen- Austausch	AS- Austausch	R/R	R/H	H/H	MAF	χ^2 p
PTGES2	C/T	R298H	473	204	18	0,17	0,4702

AS: Aminosäure, MAF: *minor allele frequency*

Der ausgewählte Polymorphismus wurde analog zu den beschriebenen Auswertungen der ACSM-Genfamilie im Hinblick auf dessen mögliche Assoziationen zu verschiedenen metabolischen Merkmalen und dem postprandialen Stoffwechsel nach einer Hochfettmahlzeit (oMTT) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 aufgeführt. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen homozygoten Trägern des häufigen 298R Allels und homo- und heterozygoten Trägern des seltenen 298H Allels bei mehreren Merkmalen festgestellt werden. Das seltene 298H Allel war hierbei mit verringertem Gewicht ($p=0,044$), Hüftumfang ($p=0,028$), nüchternen Insulinspiegel ($p=0,023$) und den Indices für Insulinresistenz HOMA IR und β -Zellfunktion HOMA BCF ($p=0,041$ und $p=0,019$) assoziiert. Die erhobenen postprandialen Parameter Triglycerid-, Glucose- und Insulinverlauf zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede ($p=0,463$, $p=0,844$ und $p=0,597$).

Die Überprüfung der Häufigkeit des seltenen Allels bei Personen mit gestörtem Glucosemetabolismus und Typ 2 DM zeigt mit einem Odds Ratio von 0,877 zwar eine erniedrigte Häufigkeit in der IGM/Typ 2 DM-Gruppe, jedoch erreicht dieser Wert mit $p=0,281$ keine statistische Signifikanz (Tab. 22).

Anhand dieser Ergebnisse lassen sich Allel-abhängige Unterschiede vor allem bei der Insulinsekretion und davon abgeleiteten Maßzahlen für Insulinresistenz und Funktion der β -Zellen aufzeigen.

Tab. 21: Assoziationen von PTGES2 R298H mit metabolischen Parametern in MICK

	R/R	R/H+H/H	p
n	473	222 (204+18)	
Alter [Jahre] ^{a)}	59 (0,25)	59 (0,36)	0,340
Gewicht [kg]	87 (0,67)	85 (0,87)	0,044
BMI [kg*m ⁻²] ^{a)}	27,61 (0,19236)	27,00 (0,261)	0,067
Taillenumfang [cm] ^{a)}	100,8 (0,54)	99,1 (0,77)	0,071
Hüftumfang [cm]	101,5 (0,398)	99,9 (0,524)	0,028
WHR ^{a)}	0,993 (0,003)	0,990 (0,004)	0,576
Sys [mmHg] ^{a)}	129,68 (0,800)	129,24 (1,291)	0,765
Dias [mmHg] ^{a)}	80,89 (0,491)	79,69 (0,752)	0,173
Cholesterin [mg*dl ⁻¹] ^{a)}	226,6 (1,88)	227,0 (2,84)	0,925
HDL [mg*dl ⁻¹] ^{a)}	53,08 (0,683)	53,80 (0,964)	0,552
LDL [mg*dl ⁻¹] ^{a)}	144,23 (1,529)	143,13 (2,191)	0,682
Triglyceride [mg*dl ⁻¹] ^{b)}	124,6 (121,75-127,53)	120,6 (116,71-124,64)	0,422
Insulin [μ U*ml ⁻¹] ^{b,c)}	13,02 (12,71-13,33)	11,82 (11,41-12,25)	0,023
Glucose [mg*dl ⁻¹] ^{b,c)}	104,14 (103,51-104,78)	103,98 (103,09-104,89)	0,885
ppTriglyceride AUC ^{b)}	1562,4 (1529,55-1596,05)	1519,9 (1473,34-1567,97)	0,463
ppInsulin AUC ^{b)}	169,5 (164,83-174,37)	165,2 (158,84-171,76)	0,597
ppGlucose AUC ^{b)}	515,6 (511,65-519,61)	516,9 (511,89-522,04)	0,844
HOMA IR ^{b,c)}	3,35 (3,26-3,44)	3,03 (2,91-3,16)	0,041
HOMA BCF ^{b,c)}	117,15 (114,65-119,71)	107,23 (104,04-110,52)	0,019

a) arithmetisches Mittel (SEM) Signifikanz t-Test (2-seitig), b) geometrisches Mittel (-/+ SFM) Signifikanz t-Test der log₁₀-Daten, c) Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen
 BMI: *body mass index*, WHR: *waist to hip ratio*, Sys: systolischer Blutdruck, Dias: diastolischer Blutdruck, HDL: HDL-Cholesterin, LDL: LDL-Cholesterin, pp: postprandial, HOMA-IR: *homeostasis model assessment insulin resistance*, HOMA-BCF: *homeostasis model assessment beta cell function*

Tab. 22: Assoziation des PTGES2 R298H SNP mit gestörtem Glucosemetabolismus / Typ 2 DM in MICK

	IGM+Typ 2 DM ^{a)} (%)	Kontrollen (%)	OR ^{b)} (95% KI)	p ^{c)}
R/R	118 (70)	354 (67)	1,0	
R/H+H/H	50 (30)	171 (33)	0,877 (0,601-1,280)	0,281

a) IGM: *impaired glucose metabolism*, b) OR: *Odds Ratio*, c) Signifikanz Fishers Exact Test, 2-seitig, KI: Konfidenzintervall

3.2.2 Vorkommen des PTGES2-Proteins

Die Expression des etwa 30kDa großen PTGES2-Proteins wurde mit Hilfe eines polyklonalen Anti-PTGES2 Antikörpers im Western Blot nachgewiesen (Abb. 22A,B). PTGES2 konnte in den Zelllinien HuH-7, HepG2, SGBS, CaCo-2 und LNCaP nachgewiesen werden. Die humane Adipocyten-Zelllinie SGBS zeigte hierbei eine vom Differenzierungsstatus abhängige Expression des PTGES2. Des Weiteren konnte PTGES2 auch in Zellkernextrakten aus HuH-7 und CaCo-2 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 22B) Weiterhin ist das PTGES2-Protein in Monocyten nachweisbar, die aus Humanblut isoliert wurden.

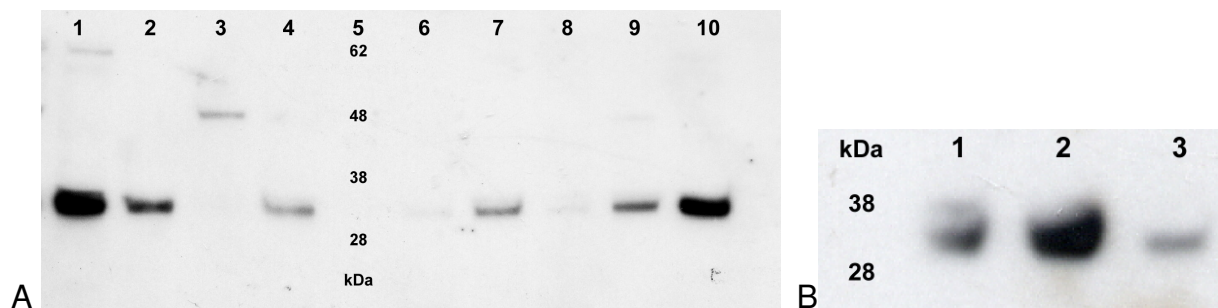


Abb. 22: Nachweis von PTGES2 in Zelllinien und humanen Monocyten

A1: HuH-7 (Leber), A2: SGBS ausdifferenziert (Adipocyten), A3: SGBS undifferenziert (Prädipocyten), A4: SGBS teilw. ausdifferenziert, A5: Größenmarker, A6: HepG2 mitochondriale und nukleäre Fraktion (Leber), A7: HepG2 cytosolische Fraktion, A8: ausdifferenzierte CaCo-2 mitochondriale und nukleäre Fraktion (Intestinum), A9: ausdifferenzierte CaCo-2 cytosolische Fraktion, A10: LNCaP (Prostata), B1: HuH-7 Nuklearextrakt, B2: CaCo-2 Nuklearextrakt, B3: Monocyten

3.2.3 PTGES2 transaktivierende Funktion

Aufgrund der beschriebenen Funktion des PTGES2-Proteins als Interferon- γ aktivierter Transkriptionsfaktor sollten mögliche Einflüsse des R298H-

Polymorphismus hierauf untersucht werden. Mittels eines dualen Luciferase-Promotoraktivitätsassays wurden die aktivierenden Eigenschaften von rekombinantem PTGES2.298H und PTGES2.298R auf ein Promotorkonstrukt, das das beschriebene GATE-Element enthielt, untersucht. Die Ergebnisse des Luciferase-Assays in HeLa-Zellen zeigten eine insgesamt sehr geringe und nicht signifikante Aktivierung des Promotorkonstruktes durch PTGES2 (Abb. 22).

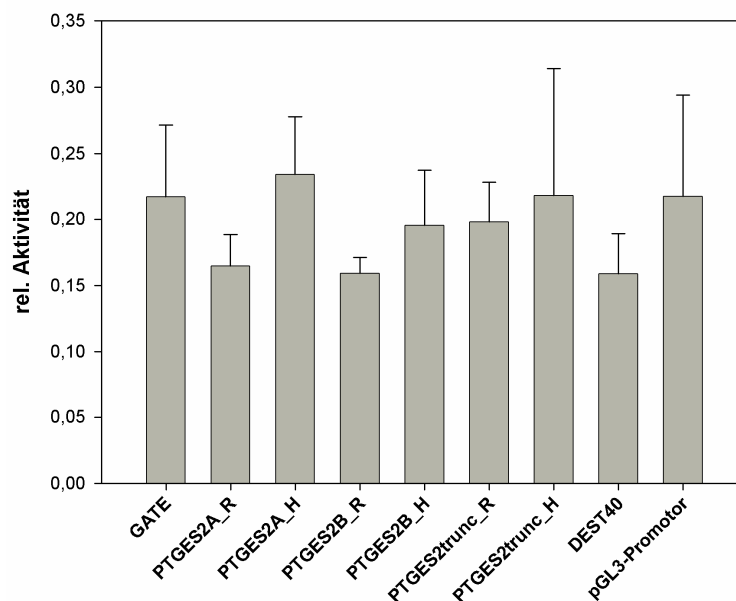


Abb. 23: Promotoraktivität eines murinen GATE-Elementes mit verschiedenen PTGES2 Konstrukten in HeLa (n=3, +Standardabweichung)

GATE: pGL3-Promotorkonstrukt mit GATE-Element, PTGES2A: Gesamt-ORF mit Stop-Codon, PTGES2B: Gesamt-ORF ohne Stop-Codon, PTGES2trunc: verkürztes ORF ohne Stop-Codon, DEST40: Expressionsvektor ohne Innet, _R: 298R, _H: 298H

3.2.4 PTGES2 *ex vivo* Untersuchung

Um die Aktivität der PTGES2 unter möglichst natürlichen Bedingungen bestimmen zu können, wurde ein *ex vivo* Ansatz gewählt. Hierzu wurden zunächst neun homozygote Träger des seltenen 298H-Allels, elf heterozygote R298H Träger, und neun homozygote Träger des häufigen 298R-Allels ausgewählt. Die Auswahl erfolgte so, dass sich bezüglich Alter, Geschlecht und BMI möglichst keine Unterschiede ergaben. Tab. 23 zeigt, dass der BMI und die erhobenen Blutparameter Leukocytenzahl, Hämatokrit, Glucose, Insulin und C-reaktives Protein zwischen den PTGES2-Genotypgruppen nicht signifikant unterschiedlich sind.

Tab. 23: Angaben zu den PTGES2 R298H Probandengruppen

Gruppen	H/H, R/H, R/R	BMI	Leuko- cyten	Häma- tokrit	Glucose	Insulin	CRP
M1	1,2,1	24,7 (1,0)	5,5 (0,6)	44,7 (3,1)	87,3 (8,1)	5,8 (1,5)	0,3 (0,0)
M2	1,1,1	33,5 (1,6)	7,0 (1,3)	46,0 (0,6)	103,3 (23,4)	13,6 (4,0)	0,5 (0,3)
F3	1,2,1	26,2 (1,4)	6,2 (2,0)	40,0 (2,8)	90,3 (9,1)	7,7 (4,7)	0,4 (0,3)
F4	1,1,1	29,6 (0,3)	6,2 (0,7)	41,5 (1,4)	98,7 (7,6)	7,9 (4,0)	0,3 (0,1)
F5	1,1,1	28,7 (0,1)	7,3 (1,4)	37,9 (2,1)	89,7 (5,5)	6,6 (0,6)	0,3 (0,0)
F6	1,1,1	28,0 (1,1)	7,1 (1,6)	40,6 (0,14)	100,5 (5,0)	11,0 (6,5)	0,3 (0,0)
F7	1,1,1	27,2 (1,0)	5,4 (1,2)	40,9 (2,6)	90,7 (7,1)	7,4 (1,8)	0,3 (0,0)
M8	1,1,1	25,0 (0,4)	9,4 (2,9)	47,6 (4,7)	107,3 (13,5)	8,0 (1,7)	0,3 (0,0)
M10	1,1,1	28,1 (1,1)	5,7 (0,5)	45,6 (1,4)	123,7 (32,3)	10,2 (3,9)	0,3 (0,0)

Alle Werte sind als Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung in Klammern angegeben, M: *male*, F: *female*, CRP: C-reaktives Protein

Um mögliche funktionelle Unterschiede zwischen den PTGES2 Varianten 298R und 298H zu untersuchen, wurde von den genotypisierten Probanden eine heparinisierte Blutprobe im nüchternen Zustand gewonnen. Die Blutproben wurden mit Zellkulturmedium verdünnt und vierundzwanzig Stunden ohne und mit bakteriellem Lipopolysaccharid inkubiert. Die resultierenden PGE2-Spiegel aus dem Überstand wurden mittels ELISA anschließend bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse ergab bei Betrachtung der gesamten Gruppe keine signifikanten Unterschiede der PGE2-Spiegel zwischen den PTGES2-Genotypen. Bei den unstimulierten Proben konnte eine tendenzielle Steigerung der PGE2-Spiegel bei homozygoten H298H Trägern festgestellt werden (131,5 H/H vs. 93,8 R/R und 93,4 H/R), die jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte. Eine getrennte Auswertung der Gruppen nach Geschlecht zeigte jedoch Unterschiede auf. Bei Männern war bei der unbehandelten und den mit 200 und 2000ng LPS behandelten Proben eine Steigerung der PGE2-Spiegel abhängig vom PTGES2-Genotyp zu beobachten (R/R<R/H<H/H). Die Proben ohne LPS-Zugabe, die die basale PGE2 Produktion repräsentieren, zeigen

diesen Effekt der gesteigerten PGE2-Spiegel am deutlichsten (Abb. 24), wengleich auch diese nur grenzwertig signifikant testen (H298H vs. R298R p=0,079 und vs. R298H p=0,059).

Tab. 24: PGE2-Spiegel nach 24h, abhängig von Genotyp und Geschlecht

Gruppe	Genotyp	n	-LPS (SFM)	200ng LPS (SFM)	2000ng LPS (SFM)
gesamt	R/R	11	93,8 (16,72)	817,4 (170,58)	1076,7 (200,76)
	R/H	9	93,4 (30,48)	563,9 (121,32)	881,3 (319,35)
	H/H	9	131,5 (29,88)	865,6 (238,68)	1287,1 (373,5)
Männer	R/R	5	80,4 (26,51)	595,6 (264,46)	689,4 (280,06)
	R/H	4	92,9 (15,25)	758,2 (214,65)	1321,34 (689,18)
	H/H	4	188,2 (42,43)	1240,6 (475,58)	1771,3 (767,9)
Frauen	R/R	6	105,1 (22,4)	1002,2 (212,19)	1399,5 (222,82)
	R/H	5	93,8 (15,23)	408,4 (66,08)	529,3 (111,59)
	H/H	5	86,2 (31,25)	565,7 (137,0)	899,7 (252,8)

LPS: Lipopolysaccharid, SFM: Standardfehler des Mittelwertes

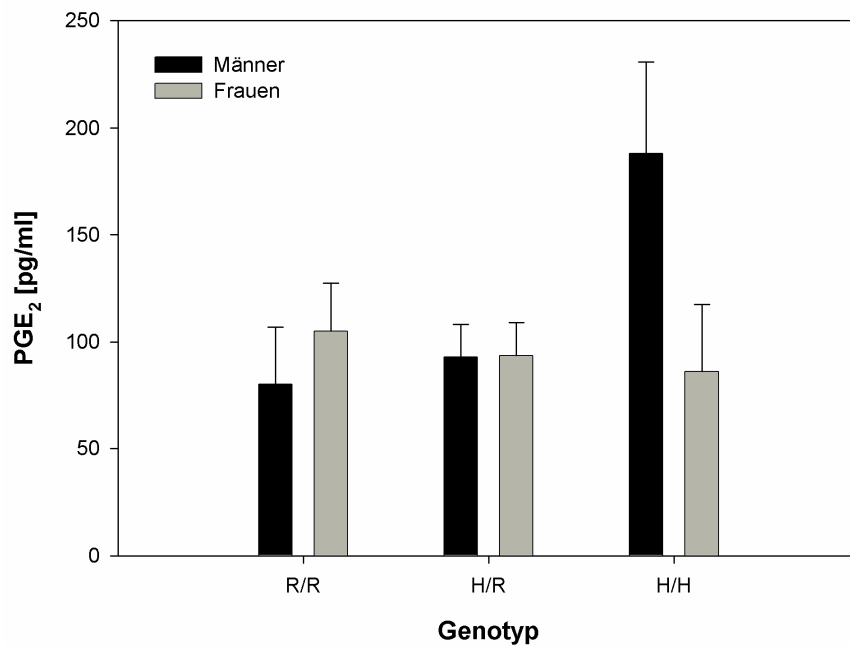


Abb. 24: Prostaglandin E₂-Spiegel nach 24h ohne LPS-Zugabe abhängig vom Genotyp bei Frauen und Männern (Mittelwert +Standardfehler)

Bei den weiblichen Probanden konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die unstimulierten Proben zeigen hier im Gegensatz zu den Ergebnissen der männlichen Gruppe keine genotypenabhängigen Unterschiede (R/R 105,1 vs. R/H 93,8 vs. H/H 86,2). Im Gegensatz hierzu können bei den mit 200 und 2000ng LPS stimulierten Proben signifikante Unterschiede festgestellt werden. Hier weisen die Träger des seltenen 298H Allels gegenüber den homozygoten R298R Trägern verringerte PGE₂-Spiegel auf. Bei dem Vergleich der homozygoten R298R Träger mit den heterozygoten R298H Trägern ergaben sich ebenfalls signifikante Unterschiede (200ng LPS p=0,037, 2000ng LPS p=0,01), wie in Abb. 25 dargestellt.

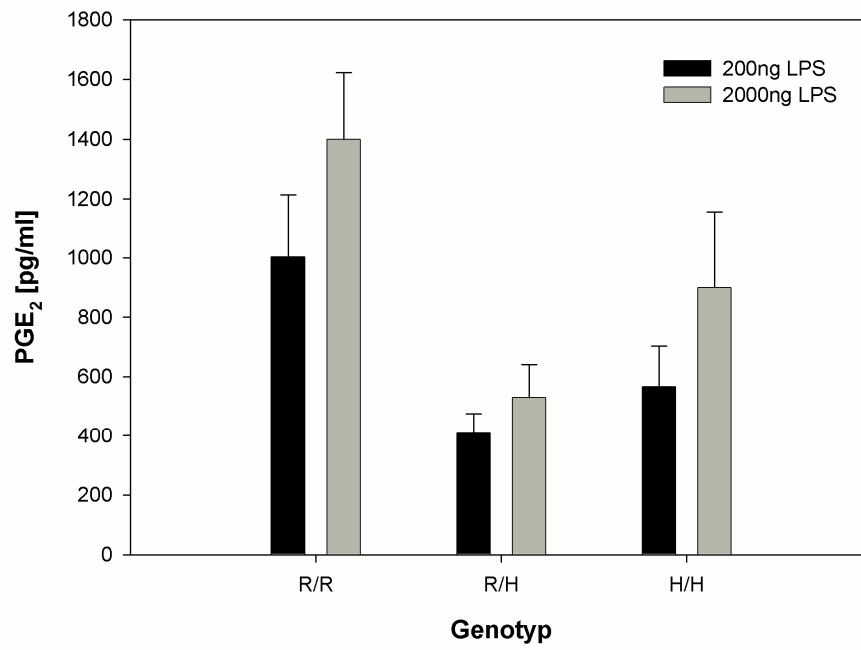


Abb. 25: Prostaglandin E₂-Spiegel nach 24h Stimulation mit 200 und 2000ng LPS, nur Frauen, Mittelwert +Standardfehler

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Gene der ACSM-Familie und PTGES2 aufgrund ihrer physiologischen Funktion und chromosomalen Lokalisation im Hinblick auf mögliche Assoziationen mit Merkmalen der Insulinresistenz und des Typ 2 DM untersucht. Darüber hinaus wurde die mRNA-Expression der ACSM-Gene in Geweben und verschiedenen Zelllinien quantifiziert, die subzelluläre Lokalisation des ASCM2-Proteins ermittelt sowie der PTGES2 R298H Polymorphismus in einem *ex vivo* Ansatz untersucht. Außerdem wurde versucht, den ASCM2 L513S Polymorphismus nach heterologer Expression funktionell zu charakterisieren. Im Folgenden sollen die Resultate dieser Untersuchungen diskutiert werden.

4.1 Acyl-CoA Synthetasen *medium-chain*

Die Familienmitglieder der ACSMs, die auf Chromosom 16p12/13 lokalisiert sind, werden vor allem in Leber und Niere exprimiert [Fujino *et al.*, 2001; Iwai *et al.*, 2003]. Für diese Arbeit ist die Leber als Expressionsort von besonderem Interesse, da sie ein Hauptbildungsort der Plasmatriglyceride via VLDL-Sekretion und ein wichtiges Zielorgan für die Insulinwirkung ist. Es konnte anhand von quantitativer *Realtime*-PCR gezeigt werden, dass die Transkripte aller ACSMs in humaner Leber nachweisbar sind, jedoch in sehr unterschiedlichen Mengen. Der Vergleich der einzelnen Transkripte ergab, dass ACSM2 den größten Anteil der ACSMs in der Leber ausmacht, gefolgt von ACSM3 (16,5% von ACSM2) und ACSM5 (10,9% von ACSM2) und in erheblich geringeren Mengen ACSM1 (0,27% von ACSM2). Dies bestätigt die Ergebnisse von [Iwai *et al.*, 2003], der ACSM1, 2 und 3 mittels RT-PCR in der Leber nachweisen konnte. Im Gegensatz zu Iwais Ergebnissen konnte in dieser Arbeit auch ACSM5 mRNA, wenn auch in sehr geringen Mengen, in der Leber nachgewiesen werden. Diese Differenzen sind möglicherweise auf die unterschiedliche Herkunft der Leber-RNA bzw. -cDNA oder die verwendeten Methoden (RT-PCR vs. TaqMan qRT-PCR) zum Nachweis zurückzuführen. Bei diesen Ergebnissen ist die geringere Effizienz der PCR-Reaktionen der ACSM1, ACSM5- und ACSM2A-Assays im Vergleich zu den anderen verwendeten Assays zu berücksichtigen. Hierdurch wird mit der verwendeten Quantifizierungsmethode die Menge dieser Transkripte niedriger eingeschätzt als sie tatsächlich sind. Aufgrund der sehr niedrigen Expressionswerte von ACSM1 und ACSM2A wird die getroffene Aussage hierdurch nicht verändert. Es ist jedoch möglich, dass das ACSM5-

Transkript eine größere Rolle bei der Expression in der Leber spielt als hier angenommen. Dies könnte zukünftig zum Beispiel mittels vergleichender Western-Blot Analysen geprüft werden.

Mit dem verwendeten TaqMan-Assay wurden zunächst beide Formen von ACSM2 (ACSM2A und B) detektiert. Ein weiterführendes Experiment zum spezifischen Nachweis des ACSM2A-Transkriptes zeigte, dass in humaner Leber hauptsächlich das ACSM2B-Transkript exprimiert wird. Die ACSM2-Transkripte unterscheiden sich vor allem im Bereich der 5'-UTR voneinander, das ACSM2A-Transkript besitzt hier ein zusätzliches Exon. Möglicherweise begründet sich in diesem Unterschied eine abweichende Regulation der Expression, die die beobachteten Transkriptmengen erklären könnte. Diese Hypothese wäre in entsprechenden Experimenten, zum Beispiel mit Hilfe von Promotorkonstrukten, zu klären.

Die subzelluläre Lokalisation in Mitochondrien mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde bisher nur für ACSM3 nachgewiesen [Iwai *et al.*, 2002]. In dieser Arbeit konnte durch Expression eines ACSM2-GFP Fusionsproteins in Huh-7 Zellen und konfokaler Laser-scanning Mikroskopie gezeigt werden, dass ACSM2 ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert ist. Außerdem wurde der Nachweis geführt, dass für diese Lokalisation die N-terminalen Aminosäurereste 1–47 des ACSM2-Proteins (oder Teile hiervon) notwendig sind. Eine Analyse dieser Sequenz mit dem Programm iPSORT zur Vorhersage von Signalsequenzen ergibt, dass wahrscheinlich die Aminosäuren 18–23 (Sequenz MSSRTL) hier besonders wichtig sind. Durch eine Analyse mittels gerichteter Mutagenese könnten die für die mitochondriale Lokalisation zwingend notwendigen Aminosäuren identifiziert werden.

Die Untersuchung von Polymorphismen der ACSM-Gene in der *Metabolic Intervention Cohort Kiel* (MICK) ergab für die Polymorphismen ACSM1 A/G und ACSM5 T533M keine signifikanten Assoziationen mit für Insulinresistenz oder Typ 2 DM relevanten Parametern. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von [Iwai *et al.*, 2003], der ebenfalls keine signifikanten Assoziationen dieser beiden Gene mit verschiedenen Merkmalen in einer japanischen Kohorte nachweisen konnte. Ein Polymorphismus im Exon 8 des ACSM1-Gens (rs151328, G/A) war mit erhöhten HDL-Cholesterinspiegeln in einer Gruppe von 287 Personen mit essentieller Hypertonie assoziiert. Dieser Effekt konnte jedoch nicht in der normotensiven Kontrollgruppe beobachtet werden [Haketa *et al.*, 2004].

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Daten und das Fehlen replizierter Assoziationen darauf hin, dass weder ACSM1 noch ACSM5 bedeutende Effekte auf die betrachteten Merkmale der Insulinresistenz und des Typ 2 DM vermitteln.

Das seltene Allel des Promotorpolymorphismus ACSM3 G/A ist in der hier untersuchten Kohorte MICK mit erhöhtem BMI und vermehrtem abdominalem Fettgewebe assoziiert. Beide Merkmale sind wichtige Risikofaktoren für die Entstehung von Insulinresistenz. Jedoch wurden hier keine weiteren Assoziationen von ACSM3 G/A zu Merkmalen der Insulinresistenz, wie erhöhte Insulin- und Glucosespiegel, gefunden. Die Assoziation des ACSM3 Gens mit erhöhtem Körpergewicht konnte auch in anderen Untersuchungen festgestellt werden. So beschrieben [Iwai *et al.*, 2002] und [Benjafield *et al.*, 2003] eine Assoziation des Intron 12 A/G SNPs in einer japanischen Kohorte und einer australischen Kohorte essentieller Hypertoniker mit Körpergewicht. In weiteren Arbeiten zeigte [Zee *et al.*, 1997] in einer hypertensiven Fallgruppe abhängig von einem *PstI* RFLP und [Telgmann *et al.*, 2007] in einer französischen Population normo- und hypertensiver Personen anhand eines weiteren Promotor- und eines nichtsynonymen SNP ähnliche Assoziationen mit erhöhtem Körpergewicht. Die Autoren vermuten, dass die Erhöhung des Körpergewichtes die Ursache für die beobachtete essentielle Hypertonie ist. Diesen Ergebnissen ist jedoch eine Reihe von anderen Arbeiten gegenüberzustellen, die keine Verbindung von ACSM3 zu essentieller Hypertonie oder zum Körpergewicht finden konnten. So fand [Iwai *et al.*, 1994] bei einer ersten Untersuchung des *PstI* RFLP in normo- und hypertensiven Probanden keine Unterschiede beim Körpergewicht. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie von über 2600 Probanden aus sechs europäischen Populationen konnte ebenfalls keinerlei Assoziationen zweier Promotorpolymorphismen im ACSM3-Gen mit diesen Merkmalen feststellen [Tikhonoff *et al.*, 2008]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse erschweren eine Bewertung von ACSM3 als Kandidatengen für Effekte auf Körpergewicht und Hypertonie. Iwai schlug unter anderem vor, dass die beobachteten Effekte des ACSM3-Gens auf *Linkage*-Phänomene mit Polymorphismen anderer ACSMs zurückzuführen sein könnten und wies hier auf ACSM2 als mögliches Kandidatengen hin [Iwai *et al.*, 2003].

Der in dieser Arbeit untersuchte L513S Polymorphismus des ACSM2-Gens wurde bereits von [Iwai *et al.*, 2003] in der japanischen SUITA-Kohorte beschrieben. Die dort gefundenen Assoziationen des seltenen 513S Allels mit erniedrigtem HDL-Cholesterin, erhöhten Triglyceriden und erhöhtem BMI konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. In der MICK wurden des Weiteren signifikante Assoziationen des seltenen ACSM2 513S Allels mit erhöhtem systolischem und diastolischem Blutdruck, Gesamt-Cholesterin und postprandialen Glucose- und Triglyceridspiegeln gezeigt. Die Triglyceridspiegel unterscheiden sich abhängig vom Genotyp bereits im nüchternen Zustand signifikant und dieser Unterschied wird in vergleichbarem Maße nach Applikation des oMTT fortgeführt. Im Gegensatz hierzu ist kein Unterschied der nüchternen Glucosespiegel zwischen den Genotypen festzustellen, während nach Applikation des oMTT ein stärkerer Anstieg bei Trägern des seltenen 513S Allels zu beobachten ist. Der ACSM2 L513S SNP könnte somit eine erhöhte basale Triglyceridsekretion aus der Leber bewirken und die postprandiale Glucoseaufnahme in die peripheren Gewebe vermindern. Diese Hypothese könnte zukünftig mit Hilfe eines Euglycämisch-hyperinsulinämischen Clamps genotypenabhängig geprüft werden.

In dieser Arbeit wurde ein weiterer nicht-synonymer Polymorphismus des ACSM2-Gens untersucht (ACSM2 D463N). Hier konnte bei Trägern des seltenen 463N Allels ein erniedrigter BMI, systolischer Blutdruck, Triglyceride und postprandiale Glucose- und Triglyceridspiegel festgestellt werden. Somit vermitteln die L513S und D463N SNPs scheinbar gegenläufige Effekte auf den Fettstoffwechsel. Diese Ergebnisse unterstreichen jedoch insgesamt die Bedeutung des ACSM2-Gens als Faktor bei der Entstehung von Insulinresistenz. Um die Rolle des ACSM2-Gens genauer zu untersuchen sind hier weitere Assoziationsstudien mit größeren Probandenzahlen notwendig. Des Weiteren sollten mögliche kombinatorische Effekte einzelner SNPs im ACSM2-Gen geprüft werden.

Aufgrund der gefundenen Assoziationen ergab sich die Hypothese, dass der Aminosäureaustausch Leucin zu Serin an Position 513 des ACSM2-Proteins zu einer Funktionsänderung führen könnte. Der SNP führt zum Austausch einer Aminosäure mit apolarer Seitenkette durch eine Aminosäure mit einer Hydroxylgruppe in der Seitenkette. Wie in Abb. 26 dargestellt, liegt diese Position in einem Bereich des Proteins, der bei der Bindung von ATP starken Konformationsänderungen

unterworfen ist. Somit könnte der AS-Austausch eine Veränderung der Enzymaktivität bewirken. Zur Prüfung dieser Hypothese sollten beide Formen des Proteins exprimiert, zur Homogenität gereinigt und charakterisiert werden. Hier musste jedoch festgestellt werden, dass mit Hilfe der verwendeten Expressionssysteme (*E. coli* und Säugerzellen) nicht die benötigte Menge an rekombinantem Protein in einer enzymatisch aktiven Form produziert werden konnte. In Zukunft sollten andere Methoden zur Expression angewendet werden. Eine Arbeitsgruppe des *Structural Genomics Consortium* konnte kürzlich große Mengen des Proteins in Insektenzellen mittels Transfektion durch Baculoviren herstellen. Diese Methode scheint demnach für die Expression geeigneter zu sein und könnte bei weiteren Untersuchungen verwendet werden.

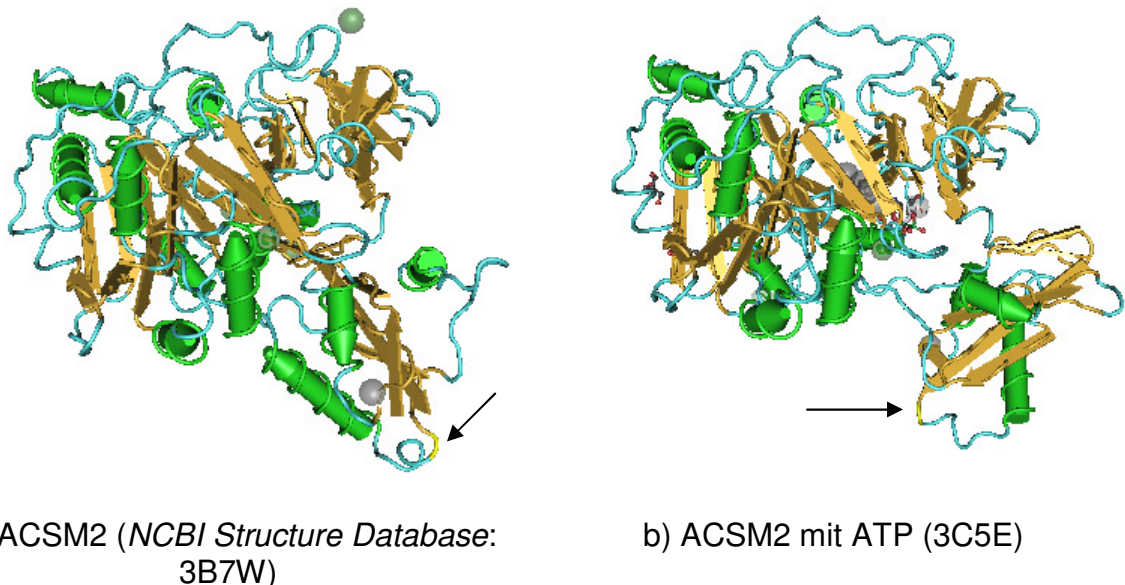


Abb. 26: 3D-Darstellung des ACSM2 Proteins alleine und im Komplex mit ATP (die Position 513 ist mit einem Pfeil hervorgehoben)

Im Hinblick auf die beobachteten Assoziationen zwischen ACSM2 und den Parametern der Insulinresistenz in der MICK soll im Folgenden dessen Funktion diskutiert werden, um Hypothesen zu entwickeln und weitere Anknüpfungspunkte für fortführende Untersuchungen zu erarbeiten.

Die Funktion der ACSMs ist die Aktivierung von Fettsäuren mittlerer Kettenlänge (C6 bis C12) und xenobiotischen Carboxylsäuren in der mitochondrialen Matrix. Die Lokalisation der Enzyme in der Niere ist vor allem für die Entwicklung essentieller Hypertonie von Interesse. Im Hinblick auf die Expression der ACSMs in der Leber

stellt sich die Frage, inwieweit die Auswirkungen einer erhöhten oder erniedrigten Umsetzung mittelkettiger Fettsäuren durch die ACSM2 513L- oder ACSM2 513S-Proteine die beobachteten Effekte bewirken können.

Mittelkettige Fettsäuren werden bereits seit Jahrzehnten in der klinischen Ernährung bei Erkrankungen der Fettassimilation und des Fettstoffwechsels, wie Pankreatitis oder Morbus Crohn, eingesetzt [Bach und Babayan, 1982]. Bei diesen Erkrankungen können Fette mit langkettigen Fettsäuren nur unvollständig verdaut werden. Im Gegensatz zu diesen werden mittelkettige Fettsäuren einfacher vom Darm aufgenommen. Sie werden dann zum größten Teil über die Portalvene direkt zur Leber transportiert, wo sie unter Umgehung des Carnitin-Palmitoyltransferase-Systems in die Mitochondrien gelangen und dort mit CoA verestert der β -Oxidation und zum Teil einer Kettenverlängerung zugeführt werden. In einer Vielzahl von Arbeiten wurden die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von mittelkettigen Fettsäuren untersucht. So konnte gezeigt werden, dass mittelkettige Fettsäuren nicht ausschließlich über die Portalvene, sondern auch in der Lymphe [Sigalet und Martin, 1999] und in Chylomikronen [Swift *et al.*, 1990] transportiert werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass mittelkettige Fettsäuren neben der Leber auch im Fettgewebe verstoffwechselt werden [Sarda *et al.*, 1987]. Diese Ergebnisse entstanden nach einmaligen Gaben oder mehrtägigen Diäten, die große Mengen von mittelkettigen Fettsäuren enthielten. Die Gabe von mittelkettigen Fettsäuren in der Ernährung wird häufig als vorteilhaft angesehen, da in Interventionsstudien gezeigt werden konnte, dass nach einer solchen Diät unter anderem weniger Fettmasse eingelagert wird [Baba *et al.*, 1982; St-Onge, Lamarche *et al.*, 2003; St-Onge, Ross *et al.*, 2003].

In Zellkultur- und Tierexperimenten mit Adipocysten und aus Ratten extrahiertem Fettgewebe wurden die Effekte von Caprylsäure (C8:0) untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Caprylsäure die Differenzierung von Präadipocysten zu Adipocysten hemmt und in diesem Zusammenhang eine verringerte Expression hierfür wichtiger Transkriptionsfaktoren wie PPAR γ und SREBP-1c bewirkt [Guo *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2003]. In Zellkulturexperimenten konnte des Weiteren eine erhöhte Produktion von H₂O₂ nachgewiesen werden [Guo *et al.*, 2006; Lei *et al.*, 2004], das ebenfalls als Auslöser von ER-Stress und Insulinresistenz diskutiert wird [Furukawa *et al.*, 2004; Houstis *et al.*, 2006]. In diesem Zusammenhang ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob die

Caprylsäure selbst oder ein Metabolit für diese Effekte verantwortlich ist. Bisher wurde nur in einer Arbeit gezeigt, dass der Effekt von Caprylsäure auf die Aktivität der Acetyl-CoA Carboxylase in 3T3-L1 Adipocyten nicht durch die Gabe des Capryl-CoA Esters hervorgerufen werden kann [Guo *et al.*, 2003], was ein Hinweis auf die freie Fettsäure als effektvermittelnde Form ist. Ausgehend von diesen Befunden könnte eine verminderte ACSM2-Funktion zu einer Anflutung von nicht veresterten mittelkettigen Fettsäuren und somit im Fettgewebe zu einer verminderten Differenzierung von Adipocyten führen. Da undifferenzierte Adipocyten kaum Triglyceride einlagern, könnten somit hieraus erhöhte Triglyceridspiegel in der Zirkulation und ektopische Einlagerung von Triglyceriden in andere Gewebe folgen. Die Effekte von mittelkettigen Fettsäuren auf die Leber wurden vor allem in Zellkulturversuchen mit primären embryonalen Hühnerhepatocyten untersucht. Hier konnte, wie auch für Adipocyten beschrieben, eine Verminderung des SREBP-1 Proteins nach Inkubation mit einer mittelkettigen Fettsäure, in diesem Fall C6:0, nachgewiesen werden [Zhang Y. *et al.*, 2003]. Die Autoren nehmen hier Bezug auf zwei andere Arbeiten [Kawaguchi *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001] und postulieren, dass durch die mittelkettige Fettsäure eine AMP-aktivierte Proteinkinase aktiviert wird und dies in der Folge zu verminderten SREBP-1 mRNA-Spiegeln führt. Ein solcher Effekt würde im direkten Gegensatz zur insulinvermittelten Steigerung der SREBP-1c mRNA in der Leber stehen. Als weiterer Effekt von mittelkettigen Fettsäuren in der Leber wurde eine Hemmung der transaktivierenden Funktion des Schilddrüsenhormons T3 in Verbindung mit der Ligandenbindungsdomäne des T3-Rezeptors beschrieben [Hillgartner und Charron, 1997; Roncero und Goodridge, 1992; Thurmond *et al.*, 1998]. Eine Hemmung der T3 vermittelten Transkription kann sich ebenfalls negativ auf die SREBP1-Expression auswirken [Zhang Y. *et al.*, 2003]. Des Weiteren konnte eine verminderte Sekretion von VLDL-Lipoproteinen und auf transkriptioneller Ebene eine verminderte Apolipoprotein B-Expression nachgewiesen werden [Sato *et al.*, 2005; Tachibana *et al.*, 2005]. Ein solcher Effekt auf die Triglyceridsekretion und -speicherung in der Leber könnte bei Trägern des seltenen ACSM2 513S Allels zu einer Akkumulation derselben führen die über die bereits beschriebenen Mechanismen Insulinresistenz hervorrufen könnte. Eine Untersuchung der intramyozellulären und hepatischen Triglyceride mittels NMR abhängig vom ACSM2 L513S Genotyp könnte hier weitere Aufschlüsse geben.

Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass ungesättigte mittelkettige Fettsäuren in der Lage sind über den *Toll-like receptor 4* den Transkriptionsfaktor NFκB zu aktivieren und somit eine inflammatorische Antwort auszulösen [Lee *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2006]. Diese wird, wie bereits erläutert, ebenfalls mit dem Entstehen von Insulinresistenz in Verbindung gebracht.

Aufgrund der skizzierten Wirkungen von mittelkettigen Fettsäuren auf die Differenzierung von Adipocyten, den Fettstoffwechsel in der Leber und mögliche Auslöser inflammatorischer Signale kann somit vermutet werden, dass Änderungen der enzymatischen Aktivität von ACSM-Proteinen diese zellulären Funktionen beeinträchtigen. Grundsätzlich gelten nicht veresterte Fettsäuren ebenfalls als Ursachen für verschiedene Stressreaktionen in der Zelle, die zu einer Störung der Insulinsignalkaskade und somit zur Insulinresistenz führen können. In diesem Zusammenhang bleibt zu klären, ob die Mengen von mittelkettigen Fettsäuren in der regulären Ernährung von ca. 2g/Tag die beschriebenen Effekte aus Tier- und Zellkulturexperimenten, bei denen sehr viel höhere Mengen eingesetzt wurden, vermitteln können.

4.2 Prostaglandin E Synthase 2

Als weiteres Kandidatengen für die Entstehung von Insulinresistenz und Typ 2 DM wurde in dieser Arbeit die Prostaglandin E Synthase 2 untersucht. Hierbei wurde ein nichtsynonymer SNP betrachtet, der zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin an Position 298 des Proteins führt. Die Assoziationsstudien in der MICK-Kohorte ergaben ein signifikant geringeres Gewicht, Hüftumfang, nüchtern Insulinspiegel, HOMA IR und HOMA BCF bei den homo- und heterozygoten Trägern des seltenen 298H Allels. Trotz dieser Ergebnisse konnte jedoch kein signifikanter Unterschied des Auftretens von gestörtem Glucosemetabolismus und Typ 2 DM abhängig vom Genotyp beobachtet werden. Bei der verwendeten Kohorte handelt es sich jedoch nicht um eine spezifische Fall-Kontroll-Studie. Es wurden hier nur nach der Rekrutierung auftauchende Fälle von IGM und Typ 2 DM mit einbezogen, da unter anderem ein bereits bekannter Typ 2 DM als Ausschlusskriterium galt. Die MICK ist daher nur bedingt für die Untersuchung von Assoziationen zwischen einem Genotyp und dem Auftreten von Typ 2 DM geeignet.

Der PTGES2 R298H SNP wurde bereits in zwei anderen, unabhängigen Kohorten im Hinblick auf seine Assoziation mit Typ 2 DM untersucht [Fisher *et al.*, 2007; Nitz *et*

al., 2007]. Sowohl in der EPIC als auch der KORA konnte eine signifikante Assoziation des Polymorphismus mit dem Auftreten von Typ 2 DM und auch gestörter Glucosetoleranz gezeigt werden. In der KORA-Kohorte konnte außerdem ein signifikant erniedrigter HOMA BCF bei Trägern des seltenen 298H Allels festgestellt werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit bereits publizierten Studien in zwei weiteren unabhängigen Kohorten auf einen Einfluss des PTGES2 R298H SNP mit Merkmalen der Insulinresistenz und dem Auftreten von Typ 2 DM hin.

Bisher wurde zwei Arbeiten publiziert, die PTGES2 als Interferon- γ abhängigen Transkriptionsfaktor beschreiben [Hu J. *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2005]. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Befund im Hinblick auf Funktionsunterschiede abhängig vom PTGES2 R298H SNP genutzt werden. Hierzu wurde in HeLa-Zellen die Aktivierung eines Promotorkonstruktes, das die beschriebene PTGES2-Bindungssequenz enthielt, in Abhängigkeit von verschiedenen PTGES2-Expressionskonstrukten bestimmt. Die transaktivierende Funktion des PTGES2 im Vergleich zu verwendeten Kontrollpromotoren war nur gering. Der Ansatz war daher nicht geeignet, mögliche Unterschiede der transaktivierenden Funktion zwischen PTGES2 298Arg, PTGES2 298His sowie weiterer PTGES2-Konstrukte darzustellen. Somit konnten die bereits publizierten Befunde nicht bestätigt werden. Gründe hierfür könnten die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien für die Aktivierungsstudien (RAW264.7 vs. HeLa) oder die Verwendung von murinem gegenüber humanem PTGES2 sein. Insgesamt ist eine direkte Auswirkung des PTGES2 R298H Polymorphismus auf die Genexpression und infolgedessen auf mögliche Mechanismen der Insulinresistenz nicht wahrscheinlich.

Kristallographische Untersuchungen zeigen, dass die Prostaglandin E Synthase 2 Homodimere bildet, von denen sich jeweils zwei aneinander lagern (Abb. 27). Im Bereich der Anlagerung der Homodimere befindet sich der beschriebene Aminosäureaustausch [Yamada *et al.*, 2005]. Es wurde deshalb vermutet, dass der PTGES2 SNP einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität des Proteins hat. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde die enzymatische Funktion des PTGES2 mit Hilfe eines *ex vivo* Ansatz geprüft. Da PTGES2 auch in humanen Monocyten exprimiert wird, waren hierfür Gesamtblutproben geeignet.

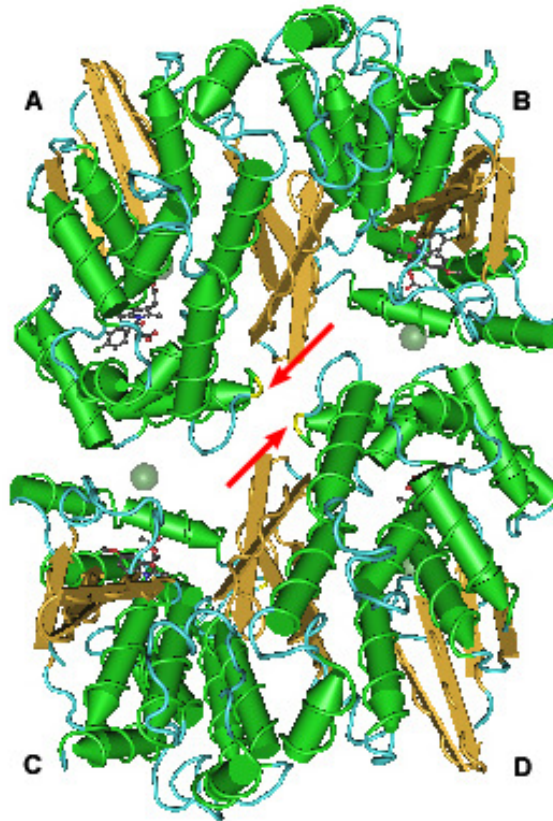


Abb. 27: 3D-Struktur von PTGES2 im Komplex mit Indomethacin (*NCBI Structure Database: 1Z9H*)

A-D Monomere, A+B Dimer, C+D Dimer, die roten Pfeile zeigen Position 298 bei Monomer A und D

Hierbei wurde die Prostaglandin E₂ Produktion in Blutproben von Probanden mit den Genotypen PTGES2 R298R, R298H und H298H nach 24stündiger Inkubation ohne und mit bakteriellem Lipopolysaccharid bestimmt. Hierbei repräsentieren die PGE₂-Spiegel der unbehandelten Proben die basale Aktivität der Prostaglandin E Synthase 2. Durch den inflammatorischen Stimulus des LPS wird die glutathionabhängige Prostaglandin E Synthase induziert [Mosca *et al.*, 2007]. In diesen Proben repräsentieren die PGE₂-Spiegel die Aktivität beider Prostaglandin E Synthasen. Bei Betrachtung der gesamten Untersuchungsgruppe konnte bei homozygoten H298H Trägern, im Vergleich zu R298H und R298R, eine moderat erhöhte basale PGE₂-Produktion festgestellt werden. Aufgrund der hohen interindividuellen Schwankungen erreichte diese Werte keine statistische Signifikanz. Zukünftig sollte deshalb der vermutete Effekt an einer größeren Gruppe untersucht werden.

Da die initialen Assoziationsstudien dieser Arbeit nur mit Männern durchgeführt worden waren, wurden die Daten der *ex vivo* Studie nochmals geschlechtsspezifisch ausgewertet. Hier zeigte sich bei den untersuchten Männern in verstärktem Maße der

bereits beobachtete Effekt der basal erhöhten PGE₂-Spiegel bei Trägern des seltenen 298H Allels. Die Unterschiede erreichten jedoch nur eine grenzwertige Signifikanz von $p=0,079$ (H298H vs. R298R) und $0,059$ (H298H vs. R298H). Bei den Frauen zeigten sich keine Unterschiede bei der basalen PGE₂-Produktion, hier konnten jedoch signifikant erniedrigte PGE₂-Spiegel bei heterozygoten Trägerinnen des 298H Allels nach LPS-Stimulation festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten auf einen Einfluss des R298H Polymorphismus auf die enzymatische Aktivität des PTGES₂-Enzyms hin, der bei Männern zu erhöhten basalen PGE₂-Spiegeln führt. Bei Frauen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Man könnte hier eine mögliche hormonelle Regulation der PTGES₂-Genexpression prüfen. Eine Analyse von 5'-UTR und Promotor des humanen PTGES₂-Gens mit einem Programm zur Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindungsstellen (AliBaba2.1) zeigt hier unter anderem eine putative Östrogenrezeptorbindungssequenz im Promotorbereich (-259 bis -250 ausgehend vom Start-Codon). Diese Hypothese könnte in Promotorstudien weitergehend geprüft werden.

Wie könnten vor diesem Hintergrund der gesteigerten Aktivität des PTGES₂ Enzyms die beobachteten Effekte in der Assoziationsstudie erklärt werden? Abhängig von der antilipolytischen Wirkung von PGE₂ auf das Fettgewebe würden hier erhöhte PGE₂-Spiegel zu einer verminderten Ausschüttung von freien Fettsäuren in die systemische Zirkulation führen. Hierfür spricht, dass bei Versuchen eine Konzentration von 1nmol/l PGE₂ ausreichend war, um die Lipolyse in Adipocyten um 50% zu senken [Marcus *et al.*, 1989]. Bei männlichen Trägern des R298R Genotyps betrug die PGE₂- Konzentration bezogen auf das Gesamtblut 2,7 nmol/l (0,8µg/l), während bei H298H Trägern eine Konzentration von 5,4 nmol/l (1,9µg/l) gemessen wurde. Diese Unterschiede können also zu einer unterschiedlich starken Hemmung der Lipolyse im Fettgewebe und somit zu einer verringerten Abgabe von freien Fettsäuren in das Blut bei Trägern des H298H Genotyps führen. Da erhöhte Spiegel von freien Fettsäuren zur Entstehung von Insulinresistenz in anderen Geweben wie Leber und Skelettmuskel beitragen, könnte es sich hier um einen möglichen SNP-abhängigen Wirkmechanismus handeln. Um diese Hypothese untermauern zu können, wäre zum Beispiel die nachträgliche Bestimmung der freien Fettsäuren und basalen PGE₂-Spiegel bei den Probanden der MICK von großem Nutzen.

PGE₂ reduziert die glucosestimulierte Insulinsekretion und kann eine vermehrte β -Zellapoptose hervorrufen. Diese Effekte stehen im Gegensatz zu den beobachteten protektiven Effekten eines basal erhöhten PGE₂-Spiegels bei PTGES2 H298H Trägern. Da PTGES2 auch im Pankreas exprimiert wird, wären bei Trägern des H298H Genotyps verminderte Insulin- und erhöhte Glucosespiegel, sowie eine Erhöhung des HOMA BCF Index zu erwarten. Die Experimente zur Wirkung von PGE₂ im Pankreas wurden mit HIT-T15 Zellen und isolierten Inselzellen von Ratten durchgeführt [Laychock und Bilgin, 1989; Meng *et al.*, 2005]. Die dabei verwendeten PGE₂-Konzentrationen lagen mit 1 μ mol/l deutlich über den in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesenen Konzentrationen. Dies legt nahe, dass die beobachtete Erhöhung der PGE₂ Spiegel bei männlichen Trägern des seltenen PTGES2 298H Allels nicht ausreichend ist, um die negativen Effekte auf die pankreatischen β -Zellen auszuüben.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse erscheint eine protektive Wirkung des PTGES2 298H Allels durch, zumindest bei Männern, moderat erhöhte basale PGE₂-Spiegel vermittelt zu werden. Diese können zu chronisch verringerten freien Fettsäuren im Blut führen und damit ein geringeres Risiko für die Entstehung einer Insulinresistenz bedeuten. Die geringe Steigerung der PGE₂-Spiegel reicht hingegen nicht aus, um negative Effekte auf die pankreatischen β -Zellen auszuüben. Der hier postulierte Mechanismus muss in weiteren Studien zur geschlechtsspezifischen Regulation der PTGES2-abhängigen PGE₂-Produktion, der SNP-abhängigen enzymatischen Aktivität von PTGES2 und der Bestimmung von freien Fettsäuren abhängig vom Genotyp in einer größeren Kohorte überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes mellitus treten gehäuft in der Bevölkerung auf und die Anzahl von Erkrankten wird in den nächsten Jahren weltweit weiter steigen. Es handelt sich hierbei um komplexe Erkrankungen, für deren Entstehung die Lebensumstände und genetische Faktoren verantwortlich sind. Als Ursachen werden vor allem Störungen des Fettstoffwechsels und inflammatorische Signale in Betracht gezogen. Die Untersuchung von Polymorphismen ausgewählter Kandidatengene soll hier weitere Aufschlüsse über die genetischen Grundlagen der Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes mellitus liefern.

In dieser Arbeit wurde eine Genfamilie von Acyl-CoA Synthetasen mit Substratspezifität für Fettsäuren mittlerer Kettenlänge (ACSM1–3, ACSM5) und die Prostaglandin E Synthase 2 (PTGES2) ausgewählt. Die Auswahl erfolgte aufgrund ihrer Funktion und chromosomalen Lokalisation. Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) dieser Gene wurden auf Assoziationen mit Merkmalen der Insulinresistenz und Typ 2 DM geprüft (ACSM1 A/G, ACSM2 L513S, ACSM2 D463N, ACSM3 G/A, ACSM5 T533M, PTGES2 R298H). Die untersuchten SNPs wurden zunächst in 716 Probanden der *Metabolic Intervention Cohort Kiel* (MICK) genotypisiert und statistisch ausgewertet. Die ACSM-Transkripte wurden in humaner Leber mittels qRT-PCR quantifiziert und durch konfokale Laser-scanning Mikroskopie die subzelluläre Lokalisation von ACSM2 bestimmt. Der PTGES2 R298H SNP wurde in einem Promotorassay auf Änderungen der transaktivierenden Funktion untersucht. In einem *ex vivo* Ansatz wurde die Aktivität der Prostaglandin E Synthasen genotypenabhängig geprüft.

Die vielversprechendsten Assoziationen eines SNP mit Risikomerkmalen der Insulinresistenz wurden bei dem nicht-synonymen ACSM2 L513S SNP gefunden. Hier zeigten sich signifikante Assoziationen des seltenen 513S Allels mit erhöhtem Gewicht ($p=0,037$), BMI ($p=0,05$), systolischem und diastolischem Blutdruck ($p=0,012$ und $0,034$), nüchtern-Triglyceridspiegeln ($p=0,012$), gesamt Cholesterin ($p=0,027$), postprandialen Glucose- und Triglyceridverläufen ($p=0,006$ und $0,014$) und erniedrigtem HDL-Cholesterin ($p=0,022$). Zur Erklärung der gefundenen Assoziationen kann angenommen werden, dass das 513S Allel zu einer Funktionsverminderung des ACSM2 führt. Dies könnte in der Folge zur Anflutung von

freien mittelkettigen Fettsäuren in der Leber und somit zu einer Störung der Insulinwirkung führen. Der Einfluss des L513S SNP auf die enzymatische Funktion von ACSM2 bleibt jedoch zu prüfen. Die Quantifizierung der ACSM-Transkripte in humaner Leber ergab, dass es sich bei ACSM2 (und hier im speziellen die Form ACSM2B) um das hauptsächlich vorkommende Transkript handelt. Mittels konfokaler Laser-scanning Mikroskopie konnte des Weiteren die mitochondriale Lokalisation des ACSM2 Proteins gezeigt werden. Außerdem wurden die ersten 47 Aminosäuren des N-Terminus (oder Teile hiervon) als notwendig für die mitochondriale Lokalisation des ACSM2 Proteins identifiziert.

Für den untersuchten PTGES2 R298H SNP ergaben sich signifikante Assoziationen des seltenen 298H Allels mit erniedrigtem Gewicht ($p=0,044$), Hüftumfang ($p=0,028$), nüchtern Insulin ($p=0,023$) und den Indices für Insulinresistenz und β -Zellfunktion ($p=0,041$ und $0,019$). Eine Auswirkung auf die beschriebene transaktivierende Funktion des PTGES2 Proteins konnte hier nicht bestätigt werden. Im *ex vivo* Versuch wurden Blutproben von Probanden der Genotypen R298R, R298H und H298H 24h ohne und mit 200 und 2000ng bakteriellem Lipopolysaccharid inkubiert. Die resultierenden Prostaglandin E₂ Spiegel zeigten bei männlichen Trägern des H298H Genotyps eine Erhöhung gegenüber R298R und R298H Trägern, die am ausgeprägtesten bei den Proben ohne LPS-Behandlung zu beobachten war (H298H $188,2\pm 42,43$ vs. R298R $80,4\pm 26,51$ $p=0,079$ und vs. R298H $92,9\pm 15,25$ $p=0,059$). Bei Frauen konnte dieser Effekt nicht festgestellt werden. Die Erhöhung der PGE₂ Spiegel bei Trägern des seltenen PTGES2 298H Allels deutet auf eine erhöhte Funktion des Enzyms gegenüber der 298R Form hin. Die moderat erhöhten PGE₂ Spiegel führen möglicherweise zu einer verminderten Lipolyse im Fettgewebe und damit zu erniedrigten Plasmaspiegeln freier Fettsäuren. Dies könnte die protektive Wirkung des PTGES2 298H Allels erklären. Es bleibt weiterhin zu prüfen, wodurch die geschlechtsabhängigen Unterschiede der PGE₂ Produktion zustande kommen und ob der untersuchte Polymorphismus die Enzymaktivität beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass es sich bei der ACSM-Genfamilie und PTGES2 um relevante Kandidatengene für die Entwicklung von Insulinresistenz und Typ 2 DM handelt.

6 Summary

Insulin resistance and Type 2 Diabetes mellitus are common disorders and the number of affected people will rise worldwide in the future. Lifestyle and genetic factors are influencing the development of these complex disorders. Disturbances of fatty acid metabolism and inflammatory signals are thought to be the main mechanisms leading to insulin resistance. Analysis of candidate genes is used to learn more about the genetic basis of insulin resistance and Type 2 Diabetes mellitus.

Here, a family of genes encoding for Acyl-CoA Synthetases with substrate specificities for fatty acids of medium-chain length (ACSM1–3 and ACSM5) and the Prostaglandin E Synthase 2 (PTGES2) were chosen. The genes were selected based on their function and chromosomal localisation. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were analysed for associations with characteristics of insulin resistance and Type 2 DM (ACSM1 A/G, ACSM2 L513S, ACSM2 D463N, ACSM3 G/A, ACSM5 T533M, PTGES2 R298H). SNPs were genotyped in 716 subjects of the Metabolic Intervention Cohort Kiel (MICK) and associations statistically analysed. Transcripts of the ACSM genes were quantified in human liver by qRT-PCR and the subcellular localisation of ACSM2 was identified by confocal laser scanning microscopy. Differences in the transactivating function of PTGES2 according to the R298H SNP were analysed in a promoter assay. The enzymatic activity of Prostaglandin E Synthases was determined in an *ex vivo* approach.

The most promising associations between an SNP and risk factors for insulin resistance were found with the non-synonymous ACSM2 L513S SNP. Significant associations of the rare 513S allele with higher weight ($p=0,037$), BMI ($p=0,05$), systolic and diastolic blood pressure ($p=0,012$ und $0,034$), fasting triglycerides ($p=0,012$), total cholesterol ($p=0,027$), postprandial glucose and triglycerides ($p=0,006$ und $0,014$) and lowered HDL-cholesterol ($p=0,022$) were found. To explain these associations a loss of function in consequence of the 513S allele can be assumed. This leads in turn to raised levels of free medium-chain fatty acids in the liver and a disturbance in insulin action. A functional effect of the ACSM2 L513S SNP on enzymatic activity has still to be shown. Quantification of ACSM transcripts in human liver showed that ACSM2 (and here mainly ACSM2B) is the main transcript.

Confocal laser scanning microscopy revealed a mitochondrial localisation of the ACSM2 protein. Furthermore, the first 47 N-terminal amino acid residues (or a part thereof) were identified to be necessary for mitochondrial localisation of the ACSM2 protein.

Significant associations of the rare PTGES2 298H allele were found for lowered weight ($p=0,044$), waist circumference ($p=0,028$), fasting insulin ($p=0,023$) and indices of insulin resistance and β -cell function ($p=0,041$ and $0,019$ respectively). A disturbance of the PTGES2 transactivating function by this SNP could not be confirmed. Blood samples of subjects with R298R, R298H and H298H genotype were taken and incubated 24 hours without and with 200 and 2000ng of bacterial lipopolysaccharides. Resulting Prostaglandin E2 levels were elevated in male carriers of the H298H genotype compared with R298R and R298H carriers and this effect was mostly noticeable in samples incubated without LPS (H298H $188,2\pm 42,43$ vs. R298R $80,4\pm 26,51$ $p=0,079$ und vs. R298H $92,9\pm 15,25$ $p=0,059$). This effect could not be observed in female subjects. A raise in PGE2 levels of PTGES2 298H carriers could be caused by a gain of enzyme function compared to the 298R allele. Moderately elevated PGE2 levels could inhibit lipolysis in adipose tissue and therefore lead to a lower level of free fatty acids in the circulation. This could explain the beneficial effects of the PTGES2 298H allele. The gender specific differences in PGE2 production and the functional impact of the PTGES2 R298H on enzyme activity will have to be investigated further.

The findings of this work support the assumption, that the ACSM gene family and PTGES2 are relevant candidate genes for the development of insulin resistance and Type 2 DM.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, *et al.* (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-33.
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R und White MF. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275:9047-54.
- Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, *et al.* (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277:1531-7.
- Aktories K, Schultz G und Jakobs KH. (1983). Inhibitory regulation of adenylate cyclase by prostaglandins. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 12:283-90.
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, *et al.* (2000). The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26:76-80.
- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, 3rd, *et al.* (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372:186-90.
- Baba N, Bracco EF und Hashim SA. (1982). Enhanced thermogenesis and diminished deposition of fat in response to overfeeding with diet containing medium chain triglyceride. *Am J Clin Nutr* 35:678-82.
- Bach AC und Babayan VK. (1982). Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr* 36:950-62.
- Benjafeld AV, Iwai N, Ishikawa K, Wang WY und Morris BJ. (2003). Overweight, but not hypertension, is associated with SAH polymorphisms in Caucasians with essential hypertension. *Hypertens Res* 26:591-5.
- Bergman RN, Zaccaro DJ, Watanabe RM, Haffner SM, Saad MF, *et al.* (2003). Minimal model-based insulin sensitivity has greater heritability and a different genetic basis than homeostasis model assessment or fasting insulin. *Diabetes* 52:2168-74.
- Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, *et al.* (2005). Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* 54:3458-65.

- Bolinder J, Kager L, Ostman J und Arner P. (1983). Differences at the receptor and postreceptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis. *Diabetes* 32:117-23.
- Borglum JD, Pedersen SB, Ailhaud G, Negrel R und Richelsen B. (1999). Differential expression of prostaglandin receptor mRNAs during adipose cell differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 57:305-17.
- Bosy-Westphal A, Onur S, Geisler C, Wolf A, Korth O, *et al.* (2007). Common familial influences on clustering of metabolic syndrome traits with central obesity and insulin resistance: the Kiel obesity prevention study. *Int J Obes (Lond)* 31:784-90.
- Bourbon NA, Yun J und Kester M. (2000). Ceramide directly activates protein kinase C zeta to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J Biol Chem* 275:35617-23.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, *et al.* (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289:2122-5.
- Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, *et al.* (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2:559-69.
- Butcher RW und Baird CE. (1968). Effects of prostaglandins on adenosine 3',5'-monophosphate levels in fat and other tissues. *J Biol Chem* 243:1713-7.
- Cao Y, Kang HL, Xu X, Wang M, Dho SH, *et al.* (1999). A 12-Mb complete coverage BAC contig map in human chromosome 16p13.1-p11.2. *Genome Res* 9:763-74.
- Cauchi S, Meyre D, Choquet H, Dina C, Born C, *et al.* (2006). TCF7L2 variation predicts hyperglycemia incidence in a French general population: the data from an epidemiological study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) study. *Diabetes* 55:3189-92.
- Chittenden T, Frey A und Levine AJ. (1991). Regulated replication of an episomal simian virus 40 origin plasmid in COS7 cells. *J Virol* 65:5944-51.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, *et al.* (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292:1728-31.
- Damcott CM, Pollin TI, Reinhart LJ, Ott SH, Shen H, *et al.* (2006). Polymorphisms in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with type 2 diabetes in the Amish: replication and evidence for a role in both insulin secretion and insulin resistance. *Diabetes* 55:2654-9.
- Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, *et al.* (1998). A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 20:284-7.

- Despres JP, Allard C, Tremblay A, Talbot J und Bouchard C. (1985). Evidence for a regional component of body fatness in the association with serum lipids in men and women. *Metabolism* 34:967-73.
- Despres JP, Moorjani S, Tremblay A, Ferland M, Lupien PJ, *et al.* (1989). Relation of high plasma triglyceride levels associated with obesity and regional adipose tissue distribution to plasma lipoprotein-lipid composition in premenopausal women. *Clin Invest Med* 12:374-80.
- Dobrowsky RT und Hannun YA. (1992). Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J Biol Chem* 267:5048-51.
- Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC und Hannun YA. (1993). Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 268:15523-30.
- Du K, Herzig S, Kulkarni RN und Montminy M. (2003). TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 300:1574-7.
- Ek J, Urhammer SA, Sorensen TI, Andersen T, Auwerx J, *et al.* (1999). Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 42:892-5.
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, *et al.* (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283:1544-8.
- Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, *et al.* (2001). SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J Biol Chem* 276:47944-9.
- Fain JN, Leffler CW und Bahouth SW. (2000). Eicosanoids as endogenous regulators of leptin release and lipolysis by mouse adipose tissue in primary culture. *J Lipid Res* 41:1689-94.
- Fain JN, Leffler CW, Bahouth SW, Rice AM und Rivkees SA. (2000). Regulation of leptin release and lipolysis by PGE2 in rat adipose tissue. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 62:343-50.
- Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE und Keller SR. (2000). Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E127-33.
- Feinleib M, Garrison RJ, Fabsitz R, Christian JC, Hrubec Z, *et al.* (1977). The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results. *Am J Epidemiol* 106:284-5.
- Fisher E, Nitz I, Lindner I, Rubin D, Boeing H, *et al.* (2007). Candidate gene association study of type 2 diabetes in a nested case-control study of the EPIC-Potsdam cohort - role of fat assimilation. *Mol Nutr Food Res* 51:185-91.

- Foretz M, Guichard C, Ferre P und Foufelle F. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12737-42.
- Freeman MS, Mansfield MW, Barrett JH und Grant PJ. (2002). Heritability of features of the insulin resistance syndrome in a community-based study of healthy families. *Diabet Med* 19:994-9.
- Fujino T, Takei YA, Sone H, Ioka RX, Kamataki A, *et al.* (2001). Molecular identification and characterization of two medium-chain acyl-CoA synthetases, MACS1 and the Sa gene product. *J Biol Chem* 276:35961-6.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, *et al.* (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752-61.
- Gao T, Furnari F und Newton AC. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18:13-24.
- Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, *et al.* (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277:48115-21.
- Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, *et al.* (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38:320-3.
- Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, *et al.* (1999). Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48:1270-4.
- Groot PH. (1976). Acyl-CoA synthetases in guinea-pig liver mitochondria. Purification and characterization of a distinct propionyl-CoA synthetase. *Biochim Biophys Acta* 441:260-7.
- Groves CJ, Zeggini E, Minton J, Frayling TM, Weedon MN, *et al.* (2006). Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. *Diabetes* 55:2640-4.
- Guo W, Choi JK, Kirkland JL, Corkey BE und Hamilton JA. (2000). Esterification of free fatty acids in adipocytes: a comparison between octanoate and oleate. *Biochem J* 349:463-71.
- Guo W, Lei T, Wang T, Corkey BE und Han J. (2003). Octanoate inhibits triglyceride synthesis in 3T3-L1 and human adipocytes. *J Nutr* 133:2512-8.
- Guo W, Xie W und Han J. (2006). Modulation of adipocyte lipogenesis by octanoate: involvement of reactive oxygen species. *Nutr Metab (Lond)* 3:30.

- Haketa A, Soma M, Nakayama T, Sato M, Kosuge K, *et al.* (2004). Two medium-chain acyl-coenzyme A synthetase genes, SAH and MACS1, are associated with plasma high-density lipoprotein cholesterol levels, but they are not associated with essential hypertension. *J Hypertens* 22:1903-7.
- Han J, Farmer SR, Kirkland JL, Corkey BE, Yoon R, *et al.* (2002). Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* 132:904-10.
- Han J, Hamilton JA, Kirkland JL, Corkey BE und Guo W. (2003). Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obes Res* 11:734-44.
- Hanson RL, Imperatore G, Narayan KM, Roumain J, Fagot-Campagna A, *et al.* (2001). Family and genetic studies of indices of insulin sensitivity and insulin secretion in Pima Indians. *Diabetes Metab Res Rev* 17:296-303.
- Hartley JL, Temple GF und Brasch MA. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10:1788-95.
- Henkin L, Bergman RN, Bowden DW, Ellsworth DL, Haffner SM, *et al.* (2003). Genetic epidemiology of insulin resistance and visceral adiposity. The IRAS Family Study design and methods. *Ann Epidemiol* 13:211-7.
- Hillgartner FB und Charron T. (1997). Arachidonate and medium-chain fatty acids inhibit transcription of the acetyl-CoA carboxylase gene in hepatocytes in culture. *J Lipid Res* 38:2548-57.
- Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E und Hirschhorn K. (2002). A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 4:45-61.
- Hittelman KJ und Butcher RW. (1973). Effects of antilipolytic agents and alpha-adrenergic antagonists on cyclic AMP metabolism in hamster white adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 316:403-10.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL und Spiegelman BM. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-15.
- Hotamisligil GS, Shargill NS und Spiegelman BM. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91.
- Houstis N, Rosen ED und Lander ES. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440:944-8.
- Hsueh WC, Mitchell BD, Aburomia R, Pollin T, Sakul H, *et al.* (2000). Diabetes in the Old Order Amish: characterization and heritability analysis of the Amish Family Diabetes Study. *Diabetes Care* 23:595-601.
- Hu J, Meng Q, Roy SK, Raha A, Hu J, *et al.* (2002). A novel transactivating factor that regulates interferon-gamma-dependent gene expression. *J Biol Chem* 277:30253-63.

- Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ und Exton JH. (2006). Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* 26:3071-84.
- Hubner N, Lee YA, Lindpaintner K, Ganten D und Kreutz R. (1999). Congenic substitution mapping excludes Sa as a candidate gene locus for a blood pressure quantitative trait locus on rat chromosome 1. *Hypertension* 34:643-8.
- IDF (2003): "Diabetes Atlas - Executive Summary." International Diabetes Foundation.
- Iwai N und Inagami T. (1991). Isolation of preferentially expressed genes in the kidneys of hypertensive rats. *Hypertension* 17:161-9.
- Iwai N und Inagami T. (1992). Identification of a candidate gene responsible for the high blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 10:1155-7.
- Iwai N, Katsuya T, Mannami T, Higaki J, Ogihara T, *et al.* (2002). Association between SAH, an acyl-CoA synthetase gene, and hypertriglyceridemia, obesity, and hypertension. *Circulation* 105:41-7.
- Iwai N, Kurtz TW und Inagami T. (1992). Further evidence of the SA gene as a candidate gene contributing to the hypertension in spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 188:64-9.
- Iwai N, Mannami T, Tomoike H, Ono K und Iwanaga Y. (2003). An acyl-CoA synthetase gene family in chromosome 16p12 may contribute to multiple risk factors. *Hypertension* 41:1041-6.
- Iwai N, Ohmichi N, Hanai K, Nakamura Y und Kinoshita M. (1994). Human SA gene locus as a candidate locus for essential hypertension. *Hypertension* 23:375-80.
- Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R und Samuelsson B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7220-5.
- Jordan M, Schallhorn A und Wurm FM. (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 24:596-601.
- Kao WH, Coresh J, Shuldiner AR, Boerwinkle E, Bray MS, *et al.* (2003). Pro12Ala of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with lower serum insulin levels in nonobese African Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes* 52:1568-72.
- Katzmarzyk PT, Malina RM, Perusse L, Rice T, Province MA, *et al.* (2000). Familial resemblance in fatness and fat distribution. *Am J Hum Biol* 12:395-404.

- Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T und Uyeda K. (2002). Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277:3829-35.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV und Ritov VB. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944-50.
- Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, *et al.* (1995). The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95:2111-9.
- Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, *et al.* (2000). Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 105:199-205.
- Killenberg PG, Davidson ED und Webster LT, Jr. (1971). Evidence for a medium-chain fatty acid: coenzyme A ligase (adenosine monophosphate) that activates salicylate. *Mol Pharmacol* 7:260-8.
- Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, *et al.* (2004). PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 114:823-7.
- Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, *et al.* (2001). Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 108:437-46.
- Kim JK, Michael MD, Previs SF, Peroni OD, Mauvais-Jarvis F, *et al.* (2000). Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest* 105:1791-7.
- Kissebah AH, Vydellingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ, *et al.* (1982). Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 54:254-60.
- Koo SH, Satoh H, Herzig S, Lee CH, Hedrick S, *et al.* (2004). PGC-1 promotes insulin resistance in liver through PPAR-alpha-dependent induction of TRB-3. *Nat Med* 10:530-4.
- Krebs DL und Hilton DJ. (2000). SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113 (Pt 16):2813-9.
- Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L und Smith U. (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest* 72:1150-62.
- Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, *et al.* (1999). Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 42:113-6.
- Kulkarni RN, Winnay JN, Daniels M, Bruning JC, Flier SN, *et al.* (1999). Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J Clin Invest* 104:R69-75.

- Laychock SG und Bilgin S. (1989). Calcium mobilization, prostaglandin E2 and alpha 2-adrenoceptor modulation of glucose utilization and insulin secretion in pancreatic islets. *Biochem Pharmacol* 38:2511-20.
- Lee JY, Sohn KH, Rhee SH und Hwang D. (2001). Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 276:16683-9.
- Lei T, Xie W, Han J, Corkey BE, Hamilton JA, *et al.* (2004). Medium-chain Fatty acids attenuate agonist-stimulated lipolysis, mimicking the effects of starvation. *Obes Res* 12:599-611.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W und Deetz K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4:357-62.
- Livak KJ, Marmaro J und Todd JA. (1995). Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat Genet* 9:341-2.
- Loftus BJ, Kim UJ, Sneddon VP, Kalush F, Brandon R, *et al.* (1999). Genome duplications and other features in 12 Mb of DNA sequence from human chromosome 16p and 16q. *Genomics* 60:295-308.
- Maehama T und Dixon JE. (1999). PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* 9:125-8.
- Mahler HR, Wakil SJ und Bock RM. (1953). Studies on fatty acid oxidation. I. Enzymatic activation of fatty acids. *J Biol Chem* 204:453-68.
- Mancini JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, *et al.* (2001). Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem* 276:4469-75.
- Marcus C, Sonnenfeld T, Karpe B, Bolme P und Arner P. (1989). Inhibition of lipolysis by agents acting via adenylate cyclase in fat cells from infants and adults. *Pediatr Res* 26:255-9.
- Martin J, Han C, Gordon LA, Terry A, Prabhakar S, *et al.* (2004). The sequence and analysis of duplication-rich human chromosome 16. *Nature* 432:988-94.
- Meng Q, Raha A, Roy S, Hu J und Kalvakolanu DV. (2005). IFN-gamma-stimulated transcriptional activation by IFN-gamma-activated transcriptional element-binding factor 1 occurs via an inducible interaction with CAAAT/enhancer-binding protein-beta. *J Immunol* 174:6203-11.
- Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, *et al.* (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6:87-97.

- Mills GW, Avery PJ, McCarthy MI, Hattersley AT, Levy JC, *et al.* (2004). Heritability estimates for beta cell function and features of the insulin resistance syndrome in UK families with an increased susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetologia* 47:732-8.
- Milton AS und Wendlandt S. (1971). Effects on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. *J Physiol* 218:325-36.
- Mooney RA, Senn J, Cameron S, Inamdar N, Boivin LM, *et al.* (2001). Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 276:25889-93.
- Mosca M, Polentarutti N, Mangano G, Apicella C, Doni A, *et al.* (2007). Regulation of the microsomal prostaglandin E synthase-1 in polarized mononuclear phagocytes and its constitutive expression in neutrophils. *J Leukoc Biol* 82:320-6.
- Muller MJ, Asbeck I, Mast M, Langnase K und Grund A. (2001). Prevention of obesity--more than an intention. Concept and first results of the Kiel Obesity Prevention Study (KOPS). *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 1:S66-74.
- Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, *et al.* (2003). Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* 278:37937-47.
- Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, *et al.* (2000). Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 275:32783-92.
- Myers EW und Miller W. (1988). Optimal alignments in linear space. *Comput Appl Biosci* 4:11-7.
- Nabika T, Bonnardeaux A, James M, Julier C, Jeunemaitre X, *et al.* (1995). Evaluation of the SA locus in human hypertension. *Hypertension* 25:6-13.
- Nakae J, Park BC und Accili D. (1999). Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J Biol Chem* 274:15982-5.
- NCEP. (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 285:2486-97.
- Nitz I, Fisher E, Grallert H, Li Y, Gieger C, *et al.* (2007). Association of prostaglandin E synthase 2 (PTGES2) Arg298His polymorphism with type 2 diabetes in two German study populations. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3183-8.

- Ogorochi T, Ujihara M und Narumiya S. (1987). Purification and properties of prostaglandin H-E isomerase from the cytosol of human brain: identification as anionic forms of glutathione S-transferase. *J Neurochem* 48:900-9.
- Oka Y, Kobayakawa K, Nishizumi H, Miyamichi K, Hirose S, *et al.* (2003). O-MACS, a novel member of the medium-chain acyl-CoA synthetase family, specifically expressed in the olfactory epithelium in a zone-specific manner. *Eur J Biochem* 270:1995-2004.
- Olansky L, Myers GA, Pohl SL und Hewlett EL. (1983). Promotion of lipolysis in rat adipocytes by pertussis toxin: reversal of endogenous inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6547-51.
- Oshima H, Taketo MM und Oshima M. (2006). Destruction of pancreatic beta-cells by transgenic induction of prostaglandin E2 in the islets. *J Biol Chem* 281:29330-6.
- Ozawa K, Miyazaki M, Matsuhisa M, Takano K, Nakatani Y, *et al.* (2005). The endoplasmic reticulum chaperone improves insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes* 54:657-63.
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, *et al.* (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457-61.
- Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, *et al.* (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313:1137-40.
- Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, *et al.* (1997). A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:29911-8.
- Perseghin G, Scifo P, De Cobelli F, Pagliato E, Battezzati A, *et al.* (1999). Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 48:1600-6.
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R und Shulman GI. (2004). Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350:664-71.
- Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A und Beck-Nielsen H. (1999). Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia* 42:139-45.
- Reaven GM. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-607.
- Rebuffe-Scrive M, Andersson B, Olbe L und Bjorntorp P. (1989). Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots of nonobese men and women. *Metabolism* 38:453-8.

- Resjo S, Goransson O, Harndahl L, Zolnierowicz S, Manganiello V, *et al.* (2002). Protein phosphatase 2A is the main phosphatase involved in the regulation of protein kinase B in rat adipocytes. *Cell Signal* 14:231-8.
- Richelsen B. (1991). Prostaglandins in adipose tissue--with special reference to triglyceride metabolism. *Dan Med Bull* 38:228-44.
- Robitaille J, Despres JP, Perusse L und Vohl MC. (2003). The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Quebec Family Study. *Clin Genet* 63:109-16.
- Roncero C und Goodridge AG. (1992). Regulation of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture: corticosterone and carnitine regulate responsiveness to triiodothyronine. *Arch Biochem Biophys* 295:258-67.
- Rotter V, Nagaev I und Smith U. (2003). Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278:45777-84.
- Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S und White MF. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277:42394-8.
- Samani NJ, Whitmore SA, Kaiser MA, Harris J, See CG, *et al.* (1994). Chromosomal assignment of the human SA gene to 16p13.11 and demonstration of its expression in the kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 199:862-8.
- Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, *et al.* (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279:32345-53.
- Sarda P, Lepage G, Roy CC und Chessex P. (1987). Storage of medium-chain triglycerides in adipose tissue of orally fed infants. *Am J Clin Nutr* 45:399-405.
- Sato K, Cho Y, Tachibana S, Chiba T, Schneider WJ, *et al.* (2005). Impairment of VLDL secretion by medium-chain fatty acids in chicken primary hepatocytes is affected by the chain length. *J Nutr* 135:1636-41.
- Saxena R, Gianniny L, Burt NP, Lyssenko V, Giuducci C, *et al.* (2006). Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes* 55:2890-5.
- Schmid A, Thierauch KH, Schleuning WD und Dinter H. (1995). Splice variants of the human EP3 receptor for prostaglandin E2. *Eur J Biochem* 228:23-30.
- Selby JV, Newman B, Quesenberry CP, Jr., Fabsitz RR, King MC, *et al.* (1989). Evidence of genetic influence on central body fat in middle-aged twins. *Hum Biol* 61:179-94.

- Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, *et al.* (2002). Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3023-8.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, *et al.* (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116:3015-25.
- Shuman S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269:32678-84.
- Sigalet DL und Martin G. (1999). Lymphatic absorption of glucose and fatty acids as determined by direct measurement. *J Pediatr Surg* 34:39-43.
- Sleeman MW, Wortley KE, Lai KM, Gowen LC, Kintner J, *et al.* (2005). Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nat Med* 11:199-205.
- St-Onge MP, Lamarche B, Mauger JF und Jones PJ. (2003). Consumption of a functional oil rich in phytosterols and medium-chain triglyceride oil improves plasma lipid profiles in men. *J Nutr* 133:1815-20.
- St-Onge MP, Ross R, Parsons WD und Jones PJ. (2003). Medium-chain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in overweight men. *Obes Res* 11:395-402.
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, *et al.* (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917-21.
- Stralfors P und Belfrage P. (1983). Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 258:15146-52.
- Strong P, Coleman RA und Humphrey PP. (1992). Prostanoid-induced inhibition of lipolysis in rat isolated adipocytes: probable involvement of EP3 receptors. *Prostaglandins* 43:559-66.
- Stumvoll M, Goldstein BJ und van Haeften TW. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365:1333-46.
- Stunkard AJ, Foch TT und Hrubec Z. (1986). A twin study of human obesity. *Jama* 256:51-4.
- Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL und McClearn GE. (1990). The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 322:1483-7.
- Stunkard AJ, Sorensen TI, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, *et al.* (1986). An adoption study of human obesity. *N Engl J Med* 314:193-8.
- Swift LL, Hill JO, Peters JC und Greene HL. (1990). Medium-chain fatty acids: evidence for incorporation into chylomicron triglycerides in humans. *Am J Clin Nutr* 52:834-6.

- Tachibana S, Sato K, Cho Y, Chiba T, Schneider WJ, *et al.* (2005). Octanoate reduces very low-density lipoprotein secretion by decreasing the synthesis of apolipoprotein B in primary cultures of chicken hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1737:36-43.
- Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, *et al.* (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372:182-6.
- Taniguchi CM, Emanuelli B und Kahn CR. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85-96.
- Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, Hashimoto K, Kangawa K, *et al.* (2002). Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 291:884-9.
- Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M und Kudo I. (2000). Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* 275:32775-82.
- Telgmann R, Brand E, Nicaud V, Hagedorn C, Beining K, *et al.* (2007). SAH gene variants are associated with obesity-related hypertension in Caucasians: the PEGASE Study. *J Hypertens* 25:557-64.
- Thurmond DC, Baillie RA und Goodridge AG. (1998). Regulation of the action of steroid/thyroid hormone receptors by medium-chain fatty acids. *J Biol Chem* 273:15373-81.
- Tikhonoff V, Staessen JA, Kuznetsova T, Thijs L, Hasenkamp S, *et al.* (2008). SAH gene variants revisited in the European Project On Genes in Hypertension. *J Hypertens* 26:244-50.
- Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K und Kahn CR. (2001). Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 21:26-38.
- Ueki K, Kondo T und Kahn CR. (2004). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 24:5434-46.
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, *et al.* (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287:664-6.
- Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, *et al.* (1998). Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 395:281-4.
- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW und Hotamisligil GS. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389:610-4.

- Vander AJ. (1968). Direct effects of prostaglandin on renal function and renin release in anesthetized dog. *Am J Physiol* 214:218-21.
- Ventre J, Doebber T, Wu M, MacNaul K, Stevens K, *et al.* (1997). Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* 46:1526-31.
- Vessey DA und Hu J. (1995). Isolation from bovine liver mitochondria and characterization of three distinct carboxylic acid: CoA ligases with activity toward xenobiotics. *J Biochem Toxicol* 10:329-37.
- Vessey DA und Kelley M. (1997). Purification and partial sequencing of the XL-I form of xenobiotic-metabolizing medium chain fatty acid:CoA ligase from bovine liver mitochondria, and its homology with the essential hypertension protein. *Biochim Biophys Acta* 1346:231-6.
- Vessey DA, Kelley M und Warren RS. (1999). Characterization of the CoA ligases of human liver mitochondria catalyzing the activation of short- and medium-chain fatty acids and xenobiotic carboxylic acids. *Biochim Biophys Acta* 1428:455-62.
- Vojarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, *et al.* (2001). Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 9:414-7.
- Wada T, Sasaoka T, Ishiki M, Hori H, Haruta T, *et al.* (1999). Role of the Src homology 2 (SH2) domain and C-terminus tyrosine phosphorylation sites of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) in the regulation of insulin-induced mitogenesis. *Endocrinology* 140:4585-94.
- Walsh V, Somody L, Farrell A, Zhang B, Brown J, *et al.* (2003). Analysis of the role of the SA gene in blood pressure regulation by gene targeting. *Hypertension* 41:1212-8.
- Watanabe K, Kurihara K und Suzuki T. (1999). Purification and characterization of membrane-bound prostaglandin E synthase from bovine heart. *Biochim Biophys Acta* 1439:406-14.
- Watanabe RM, Valle T, Hauser ER, Ghosh S, Eriksson J, *et al.* (1999). Familiality of quantitative metabolic traits in Finnish families with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Finland-United States Investigation of NIDDM Genetics (FUSION) Study investigators. *Hum Hered* 49:159-68.
- Wei Y, Wang D, Topczewski F und Pagliassotti MJ. (2006). Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E275-81.
- Weihua X, Kolla V und Kalvakolanu DV. (1997). Interferon gamma-induced transcription of the murine ISGF3gamma (p48) gene is mediated by novel factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:103-8.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, *et al.* (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-808.

- WHO (1999): Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications - Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.
- Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, Jefferies C, Liadis N, *et al.* (2005). Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. *Mol Cell Biol* 25:1135-45.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R und King H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-53.
- Wilson AF, Elston RC, Tran LD und Siervogel RM. (1991). Use of the robust sib-pair method to screen for single-locus, multiple-locus, and pleiotropic effects: application to traits related to hypertension. *Am J Hum Genet* 48:862-72.
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, *et al.* (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900-4.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, *et al.* (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-30.
- Xue X, Piao JH, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Kojima Y, *et al.* (2005). Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *J Biol Chem* 280:33917-25.
- Yamada T, Komoto J, Watanabe K, Ohmiya Y und Takusagawa F. (2005). Crystal structure and possible catalytic mechanism of microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES-2). *J Mol Biol* 348:1163-76.
- Yin MJ, Yamamoto Y und Gaynor RB. (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 396:77-80.
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, *et al.* (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413:131-8.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, *et al.* (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277:50230-6.
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, *et al.* (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293:1673-7.
- Zee RY, Stephen AL, Iwai N und Morris BJ. (1997). Association analyses of S(A) gene variant in essential hypertensives. *Am J Hypertens* 10:235-42.
- Zhang C, Qi L, Hunter DJ, Meigs JB, Manson JE, *et al.* (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and the risk of type 2 diabetes in large cohorts of U.S. women and men. *Diabetes* 55:2645-8.

- Zhang Y, Yin L und Hillgartner FB. (2003). SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACCalpha transcription in hepatocytes. *J Lipid Res* 44:356-68.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, *et al.* (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167-74.
- Zierath JR, Livingston JN, Thorne A, Bolinder J, Reynisdottir S, *et al.* (1998). Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway. *Diabetologia* 41:1343-54.
- Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G und Shaw J. (2005). The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb* 12:295-300.
- Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, *et al.* (2000). Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* 6:924-8.

7.2 Verwendete Materialien und Kits

Material	Beschreibung	Hersteller
Acrylamid 30% / bis-Acrylamid 0,8% Lösung		Roth
Adenylatkinase	4000U/ml in 100mmol/l Tris pH 7,5	Sigma
Agarose	SeaKem LR	Cambrex
Ampicillin		Roth
Antikörper	Anti-ACSM2	Eurogentec
Antikörper	Anti-GFP	Invitrogen
Antikörper	Anti-mouse	Santa Cruz
Antikörper	Anti-PTGES2	IBL Hamburg
Antikörper	Anti-rabbit	Santa Cruz
Antikörper	Anti-V5 HRP	Invitrogen
APS		Roth
ATP	0,5mol/l in Tris 100mmol/l, pH 7,5	Sigma
Betain		Sigma
Bicin		Roth
Bradford Reagenz		Bio-Rad
Bromphenolblau		Merck
BSA	Albumin Fraktion V	Roth
Calciumchlorid	2,5mol/l steril filtriert, Aliquots bei -20 °C	Roth
Chem. Kompetente <i>E. coli</i>	Arctic Express (DE3)	Stratagene
Chem. Kompetente <i>E. coli</i>	BL21(DE3)	Invitrogen
Chem. Kompetente <i>E. coli</i>	DH5α	Invitrogen
Chem. Kompetente <i>E. coli</i>	TOP10	Invitrogen
Chem. Kompetente <i>E. coli</i>	XL1-blue supercompetent cells	Stratagene
ChemiGlow		Alpha Innotech
Coenzym A (Natriumsalz)	60mmol/l in Tris 100mmol/l, pH7,5	Sigma
Coomassie Brilliant Blau	Brilliant Blau G250	Roth
Coomassie-Färbelösung	Ethanol 40% (v/v), Essigsäure 10% (v/v), Brilliant Blau 0,05% (w/v)	

DEPC	Roth	
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v)	
di-Natriumhydrogenphosphat		Roth
DMEM Glutamax ohne Pyruvat		Gibco
DMSO		Roth
DNA-Größenmarker	1Kb und 100 bp DNA Ladder	Invitrogen
DNA-Ladepuffer	6x loading dye solution	Fermentas
dNTPs	jeweils 10mmol/l	Fermentas
DTT		Roth
Dual-Luciferase Reporter Assay System		Promega
ECL+		Amersham Biosciences
EDTA		Roth
Entfärber	Essigsäure 8% (v/v), Glycerin 1% (v/v)	
Entwickler		Tetenal
Essigsäure		Roth
Ethanol		Roth
Ethidiumbromid	wässrige Lösung 1% (w/v)	Roth
FCS		Gibco
Fixierer		Tetenal
Fluorescent Mounting Medium		Dako Cytomation
FuGENE 6		Roche
G418		Roth
Glycerol		Roth
Glycin		Roth
HEPES		Roth
HEPES 2x	NaCl 140mmol/l, Na ₂ HPO ₄ 1,5mmol/l, HEPES 50mmol/l, pH 7,05 steril filtriert, Aliquots bei -20 °C	

HiSpeed Plasmid Maxi Kit		Qiagen
Hoechst 33258 (bis-Benzimid)	0,05µg/ml	Sigma
humane Leber gesamt-RNA		Ambion
humanes Leberprotein		Clontech
IMAC Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ 50mmol/l, NaCl 300mmol/l, Imidazol 250mmol/l, pH 8,0	
IMAC Lysispuffer (<i>E. coli</i>)	NaH ₂ PO ₄ 50mmol/l, NaCl 300mmol/l, pH 8,0	
IMAC Lysispuffer (Zellkultur)	NaH ₂ PO ₄ 50mmol/l, NaCl 300mmol/l, Tween 20 0,05% (v/v), pH 8,0	
IMAC Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ 50mmol/l, NaCl 300mmol/l, Imidazol 20mmol/l, pH 8,0	
Imidazol		Roth
IPTG		Roth
iScript cDNA Synthesis Kit	Reverse Transkription	Bio-Rad
Kaliumchlorid		Roth
Kaliumdihydrogenphosphat		Roth
Kanamycin		Roth
Lactatdehydrogenase	1700U/ml in Tris 100mmol/l, pH 7,5	Sigma
Lambda(λ)-DNA		Invitrogen
LB Agar		Roth
LB Medium		Roth
LPS	<i>Salmonella enteritidis</i>	Sigma
LR-Clonase Mix		Invitrogen
Lysispuffer (<i>E. coli</i>)	NaH ₂ PO ₄ 50mmol/l, NaCl 300mmol/l, pH 8,0	
Lysozym		Roth
Magnesiumchlorid	50mmol/l, für PCR	Invitrogen
Magnesiumsulfat		Invitrogen
MEM		Gibco

Mercaptoethanol		Sigma
Methanol		Roth
Milchpulver	Blotting Grade	Roth
Mitochondrial Isolation Kit for cultured cells		Pierce
MitoTracker Red CMXRos		Molecular Probes
NADH	30mmol/l in H ₂ O bidest	Sigma
Natriumchlorid		Roth
Natriumoctanoat	100mmol/l in Tris 100mmol/l, pH 7,5	Sigma
NEAA		Gibco
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents		Pierce
NET-Puffer (Lysispuffer Zellkultur)	Tris 50mmol/l (pH 7,5), NaCl 150mmol/l, EDTA 1mmol/l (pH 8,0), NP-40 0,5% (v/v)	
Ni-NTA Agarose		Qiagen
Nonidet P 40 Substitute		Sigma
Oligonukleotide		MWG
Omniscrypt	Reverse Transkription	Qiagen
Paraformaldehyd		Merck
PBS-Puffer	NaCl 137mmol/l, KCl 2,7mmol/l, Na ₂ HPO ₄ 10mmol/l, KH ₂ PO ₄ 1,76mmol/l pH 7,6	
<i>Pfu</i> PCR Puffer 10x		Promega
<i>Pfu</i> -Polymerase	mit Korrekturaktivität	Promega
<i>Pfx</i> -Polymerase	mit Korrekturaktivität	Invitrogen
Phosphoenolpyruvat	25mmol/l in Tris 100mmol/l, pH 7,5	Sigma P7002
Phosphorsäure		Roth
Phusion-Polymerase	mit Korrekturaktivität	Finnzymes
Ponceau S		Roth
Prostaglandin E ₂ Biotrak Enzymeimmunoassay System		Amersham Biosciences

Protease Inhibitor Tablets		Roche
Protino Ni-IDA Agarose		Macherey & Nagel
PVDF-Membran		Roth
Pyruvatkinase	600U/ml in Tris 100mmol/l, pH 7,5	Sigma P7768
QIAprep spin Miniprep Kit		Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit		Qiagen
QIAshredder		Qiagen
QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit		Stratagene
Restriktionsenzym	<i>AscI</i>	NEB
Restriktionsenzym	<i>BamHI</i>	Fermentas
Restriktionsenzym	<i>EcoRI</i>	Fermentas
Restriktionsenzym	<i>HindIII</i>	Fermentas
Restriktionsenzym	<i>MluI</i>	Fermentas
Restriktionsenzym	<i>NotI</i>	Fermentas
Restriktionsenzym	<i>NruI</i>	NEB
Restriktionsenzym	<i>PstI</i>	Fermentas
Restriktionsenzym	<i>XbaI</i>	Fermentas
RNase-free DNase		Qiagen
RNeasy Mini		Qiagen
Röntgenfilm	Hyperfilm	Amersham Biosciences
RPMI 1640 Glutamax		Gibco
Salzsäure		Roth
SDS		Roth
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer 5x	Tris 0,5mol/l, Glycin 1,92mol/l, SDS 0,5% (w/v), pH 8,8	
SDS-PAGE Ladepuffer 5x	Tris 0,225mol/l (pH 6,8), Glycerol 50% (v/v), SDS 5% (w/v), Bromphenolblau 0,05% (w/v), DTT 0,25mol/l	
SDS-PAGE Sammelgel-Puffer 5x	Tris 0,3mol/l, SDS 0,5% (w/v), pH 6,7 mit H ₃ PO ₄ eingestellt	

SDS-PAGE Trenngel-Puffer 2,5x	Tris 1,875mol/l, SDS 0,25% (w/v), pH 8,9 mit HCl eingestellt	
Sorbitol		Sigma
T4 Ligase		NEB
TAE-Puffer	Tris 40mmol/l, Essigsäure 50mmol/l, EDTA 1mmol/l	
Taq PCR Puffer 10x	TrisHCl 200mmol/l (pH 8,4), KCl 500mmol/l	Invitrogen
TaqMan [®] Gene Expression Assays	s. Tab. 5	Applied Biosystems
TaqMan [®] Genotyping Assays	s. Tab. 4	Applied Biosystems
TaqMan [®] Universal Master Mix, No AmpErase [®] UNG		Applied Biosystems
Taq-Polymerase	5U/ μ l	Invitrogen
TBS-Puffer	Tris 20mmol/l, NaCl 137mmol/l, pH 7.6	
TBST-Puffer	Tween 20 0,1% (v/v) in TBS	
TEMED		Roth
TE-Puffer	Tris 10mmol/l, EDTA 1mmol/l	
TE-Puffer 0,1x	Tris 1mmol/l, EDTA 0,1mmol/l, pH 7,6 autoklaviert	
Transferpuffer	Tris 25mmol/l, Bicin 25mmol/l, Methanol 10% (v/v)	
Tris		Roth
TritonX100		Roth
Trypanblau		Sigma
Trypsin		PAA
Trypsin/EDTA	0,05% / 0,02%	Biochrom
Tween 20		Roth
UVette [®]	UV durchlässige Mikroküvette	Eppendorf
Vektor	pcDNA-DEST40	Invitrogen
Vektor	pcDNA-DEST47	Invitrogen
Vektor	pColdI	Takara
Vektor	pENTR/D-TOPO	Invitrogen

Vektor	pENTR/SD/D-TOPO	Invitrogen
Vektor	pET102/D-TOPO	Invitrogen
Vektor	pET-DEST42	Invitrogen
Vektor	pGL3-Basic	Promega
Vektor	pGL3-Control	Promega
Vektor	pGL3-Promotor P4	Gabe von D.V. Kalvakolanu, Baltimore
Vektor	pGL4.74[<i>hRluc</i> /TK]	Promega
Zelllinie	COS-7	DSMZ
Zelllinie	HEK293T	Gabe von Prof. Roeder, Kiel
Zelllinie	HeLa	DSMZ
Zelllinie	HepG2	DSMZ
Zelllinie	HuH-7	Gabe von D. Hartwig, Lübeck

7.3 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Memmert
CO ₂ -Inkubator	Thermo (Steri-Cult)
Dokumentation	Alpha Innotech (Alphamager HP)
Elektroden für Western Blotting	Invitrogen (XCell II Blot Module)
Elektrophoresekammern	BioRad (Sub Cell GT, Mini-Sub Cell GT)
Elektrophoresekammern	Invitrogen (XCell SureLock Mini Cell)
Konfokales Laser-scanning Mikroskop	Leica (TCS SP)
Luminometer	Turner Biosystems (GloMax 96)
Magnetrührer	Variomag (Maxi HP 1 P)
Mikroskop	Olympus (CKX41)
Mikrowelle	MDA
pH-Meter	WTW (inoLab pH 720)
Photometer	Eppendorf (BioPhotometer)
Photometer	SpectraMax Microplate Reader (SpectraMax 190)
Realtime PCR	Applied Biosystems (7300 Real Time PCR System)

Reinstwasseranlage	Sartorius (arium 611UV)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific (Excella E24)
Schüttler	IKA (Vibrax VXR basic)
Sicherheitswerkbank	Heraeus (HeraSafe)
Spannungsquellen	BioRad (Power Pac HC, Power Pac Basic)
Thermoblock	Eppendorf (Thermomixer kompakt)
Thermocycler	Biometra (T1 Thermocycler)
Thermocycler	Eppendorf (Mastercycler gradient)
Thermostatschrank	Aqualytic
Ultraschallstab	Bandelin (Sonoplus)
Wasserbad	GFL
Wasserbad für Ligation	Huber (CC1)
Wippschüttler	Grant-Boekel (BFR25)
Zentrifugen	Eppendorf (miniSpin plus, 5810R, 5417R, 5702)

7.4 Verwendete Programme

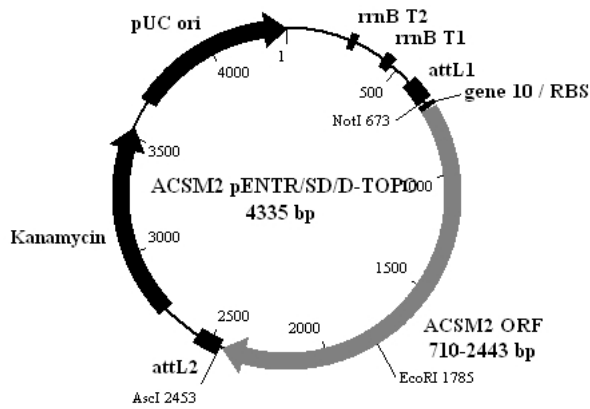
Programm	Verwendung
Adobe Photoshop 10.0	Bildbearbeitung
AliBaba 2.1	Promotoranalyse
BioEdit 7.0.9.0	Sequenzanalyse, Vektorkarten
EditSeq 5.05	Sequenzanalyse
EndNote 8.0.2	Literaturverwaltung
GIMP 2.4.4	Bildbearbeitung
Haploview 4.0	Haplotypenanalyse
iPSORT	Vorhersage von Signalpeptiden
LCS Lite 2.61	Bildbearbeitung (Mikroskopie)
Microsoft Office 2003	Textverarbeitung, Statistik
Oligo 4.0	Primerdesign
SeqMan 5.05	Sequenzanalyse
SigmaPlot 9.0	Erstellen von Graphen
SOFTmax PRO 3.1.2	ELISA-Auswertung
SPSS 12.0	Statistik

7.5 Zusätzliche Informationen

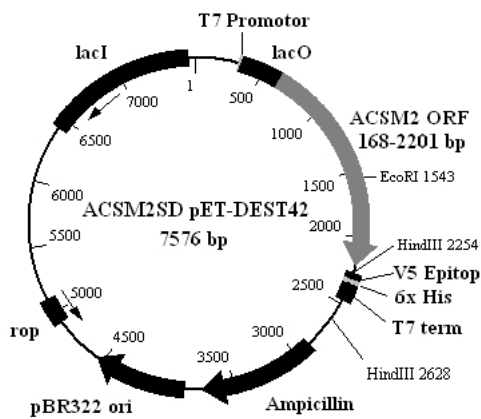
Tab. A1: Vektorkarten und Restriktionsenzyme

Vektorkarten

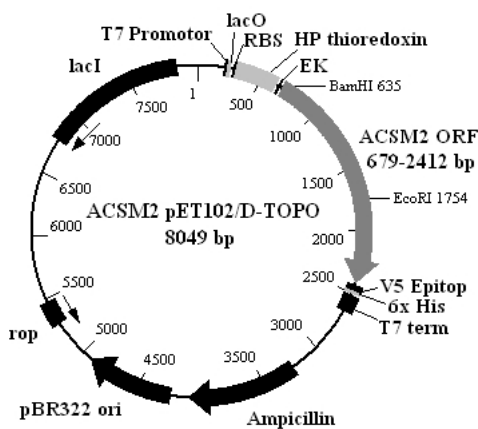
Enzyme für Restriktionsverdau



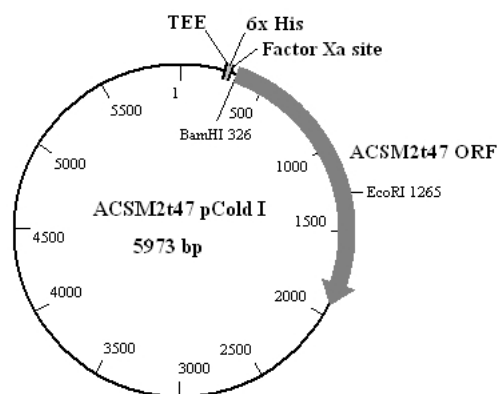
NotI + EcoRI



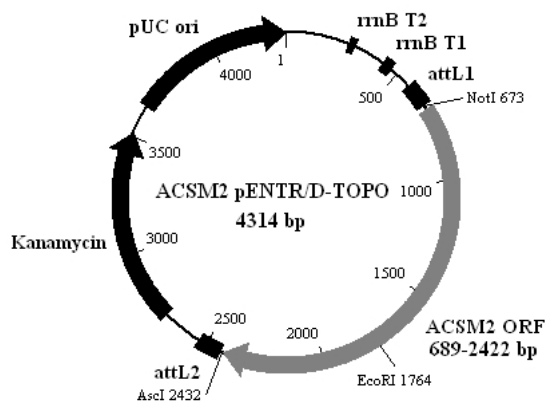
EcoRI + HindIII



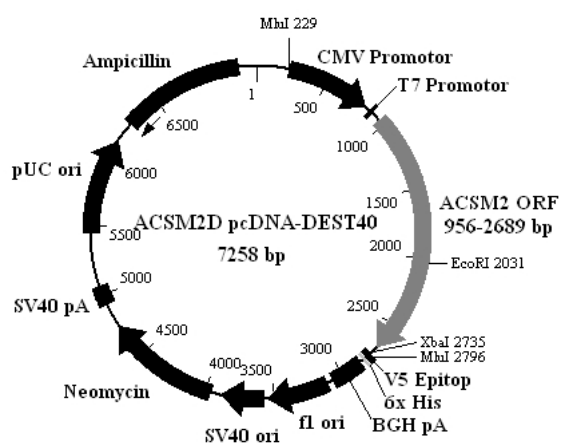
BamHI + EcoRI



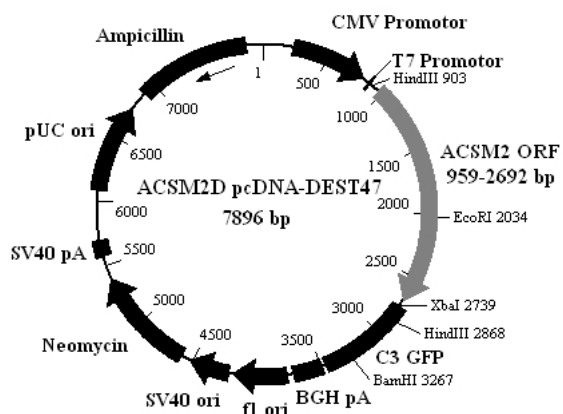
EcoRI + XbaI



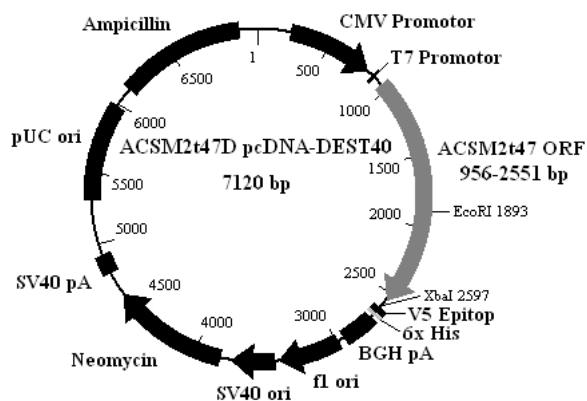
NotI + EcoRI



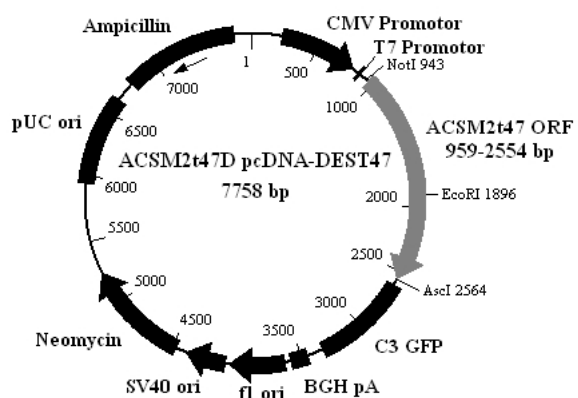
EcoRI + MhoI



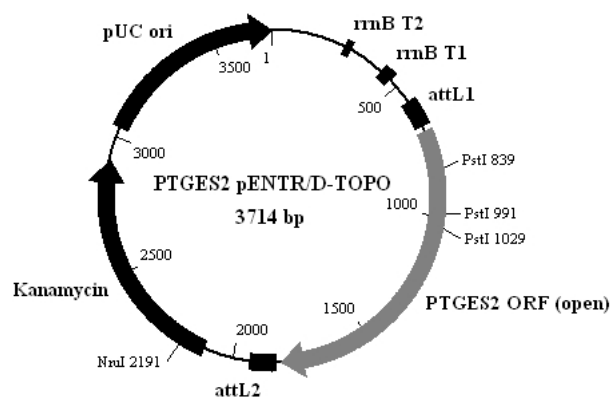
XbaI + EcoRI



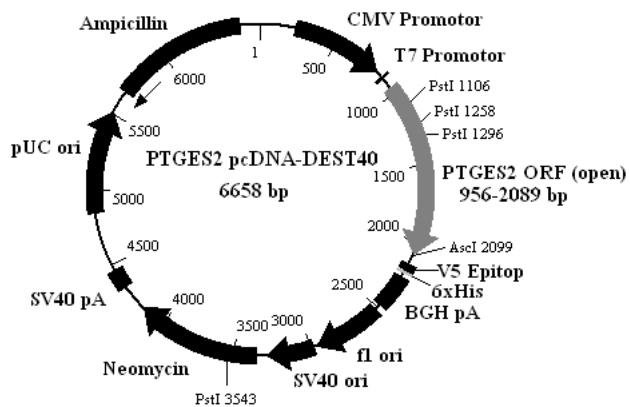
EcoRI + XbaI



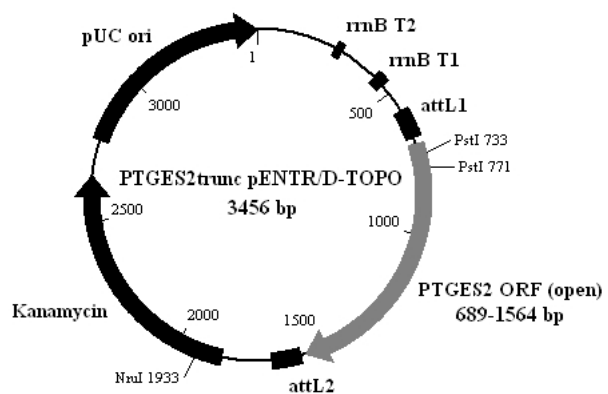
EcoRI + NotI



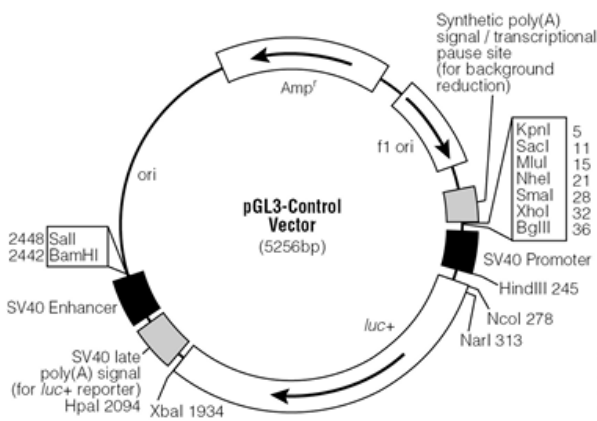
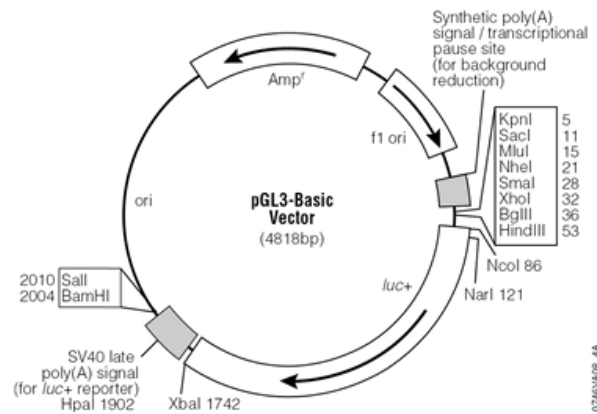
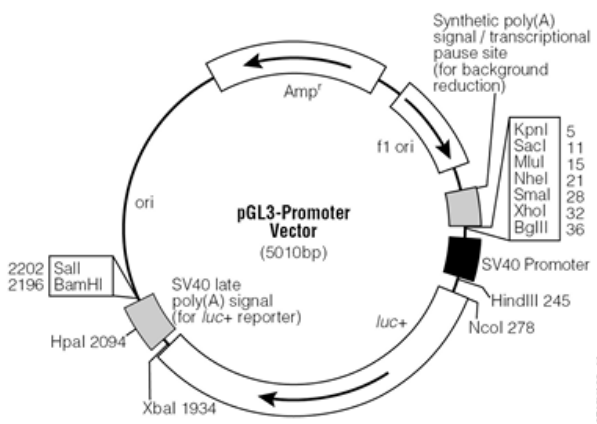
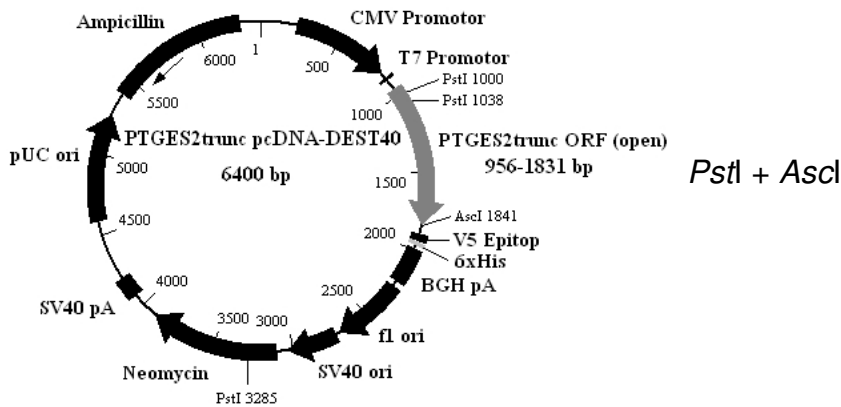
PstI + NruI

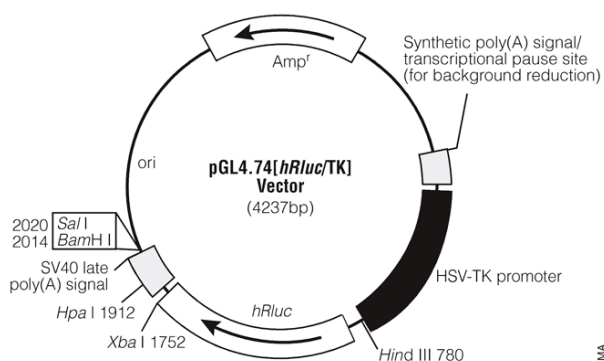


PstI + AscI



PstI + NruI





phRLTK

4729MA

8 Danksagung

Ich danke:

Prof. Frank Döring für die Betreuung meiner Arbeit, die Anregungen und Ratschläge, die maßgeblich zum Gelingen dieses Vorhabens beigetragen haben.

Prof. Jürgen Schrezenmeir für die Betreuung am Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung.

Prof. Thomas Roeder für die Übernahme der Betreuung an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Den Mitarbeitern des Instituts für Physiologie und Biochemie der Ernährung für die schöne Zeit an ihrem Institut.

Den Kollegen der Abteilung Molekulare Ernährung für die gute Arbeitsatmosphäre und die fruchtbaren Diskussionen. Meiner langjährigen Büro-Mitbewohnerin Christina Vock und Mike Böhme, Maja Klapper, Constance Schmelzer, Inke Nitz, Daniela Palgunow, Daniela Stengel, Yvonne Dignal, Thora Bittner und allen ehemaligen Mitstreitern. „Meiner“ Masterstudentin Tini Goele, die in ihrer Arbeit die Prostaglandin E Synthase 2 mit bearbeitet hat.

Prof. M. Müller und Anja Bosy-Westphal für die Hilfe bei der Humanstudie.

Den fleißigen Korrektur-Lesern Tim Koeckritz und Bille Vibrans.

Anne Knaak für die seelische Unterstützung.

Meinem Verlobten Rüdiger Boomgaarden für all sein Verständnis.

Und meiner Familie, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt hat.

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung meines Betreuers, selbständig und ausschließlich unter Verwendung der hierin angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher, weder in Teilen noch vollständig, an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ich habe des Weiteren bisher keinerlei Promotionsversuche unternommen.

Für die mündliche Prüfung wähle ich die Form der Disputation.

Kiel, den

.....

(Inka Lindner)

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Lindner, I.; Rubin, D.; Helwig, U.; Nitz, I.; Hampe, J.; Schreiber, S.; Schrezenmeir, J.; Döring, F.:

The L513S polymorphism in medium-chain acyl-CoA synthetase 2 (MACS2) is associated with risk factors of the metabolic syndrome in a Caucasian study population.

Molecular Nutrition and Food Research. 2006; 50(3):270-4.

Lindner, I.; Helwig, U.; Rubin, D.; Fischer, A.; Marten, B.; Schreiber, S.; Döring, F.; Schrezenmeir, S.:

Prostaglandin E Synthase 2 (PTGES2) Arg298His polymorphism and parameters of the metabolic syndrome.

Molecular Nutrition and Food Research. 2007; 51(12):1447-51.

Nitz, I.; Fisher, E.; Grallert, H.; Li, Y.; Gieger, C.; Rubin, D.; Boeing, H.; Spranger, J.;

Lindner, I.; Schreiber, S.; Rathmann, W.; Gohlke, H.; Doring, A.; Wichmann, H.E.; Schrezenmeir, J.; Doring, F.; Illig, T.:

Association of Prostaglandin E Synthase 2 (PTGES2) Arg298His Polymorphism with Type 2 Diabetes in two German Study Populations.

J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92(8):3183-8.