Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Neurologie
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. A.C. Ludolph

Erhöhte GLUT4-Expression und vermehrte Glukoseaufnahme im weißen Fettgewebe der transgenen R6/2-Huntington-Mäuse

Dissertation zum Erlangen des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Nicole Schneider
Ulm

2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Albert C. Ludolph

2. Berichterstatter: PD Dr. Pamela Fischer-Posovszky

Tag der Promotion: 13. November 2014

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **III**

1. Einleitung **1**

1.1. Morbus Huntington 2

1.2. Metabolische Aspekte der Huntington-Erkrankung 8

1.2.1. Stoffwechselveränderungen bei Huntington-Patienten 8

1.2.2. Metabolische Veränderungen bei den R6/2-HD-Mäusen 10

1.3. Der insulinsensitive Glukosetransporter GLUT4 13

1.4. Fragestellung und Ziel 15

2. Material und Methoden **17**

2.1. Materialien 17

2.2. Methoden 27

2.2.1. Zucht und Tierhaltung 27

2.2.2. Histologische Methoden 30

2.2.3. SDS-Page und Western Blot 33

2.2.4. Subfraktionierung insulinstimulierter Gewebeproben 38

2.2.5. Adipozytenkultur 41

2.2.6. *In-vitro*-Untersuchungen des Zellstoffwechsels 45

2.2.7. Statistische Methoden 48

3. Ergebnisse **49**

3.1. Charakterisierung der Versuchstiere 49

3.1.1. CAG-Wiederholungszahl 49

3.1.2. Körpergewicht und Fettdepotmasse 50

3.2. Histologische Charakterisierung des Fettgewebes 52

3.2.1. Adipozytengröße 52

3.2.2. Immunhistochemie GLUT4 und Rab11 54

3.3. Huntingtin-Expression in WAT und BAT 57

3.4. GLUT4-Expression 59

3.4.1. im Fettgewebe männlicher Tiere 59

3.4.2. im Fettgewebe weiblicher Tiere 63

3.4.3. im Geschlechtsvergleich 64

3.5. Rab11-Expression in WAT und BAT 67

3.6. GLUT4-Lokalisation 68
3.6.1. Immunzytochemische Darstellung 68
3.6.2. GLUT4-Translokation 71
3.7. Stoffwechselveränderungen primärer Adipozyten *in vitro* 74
3.7.1. Charakterisierung der primären Adipozyten 74
3.7.2. Insulinstimulierte Glukoseaufnahme 77
3.7.3. De-Novo-Lipogenese 79
3.7.4. Basale Lipolyse 81
4. Diskussion 82
4.1. Anzahl der CAG-Wiederholungen im Exon 1 82
4.2. Veränderte GLUT4-Expression im Fettgewebe 86
4.3. Veränderungen des Fettstoffwechsels 92
4.4. Schlussfolgerungen und Ausblick 96
5. Zusammenfassung 98
6. Literaturverzeichnis 100

Danksagung 117
Lebenslauf 118

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
^{14}C-DOG	^{14}C-markierte 2-deoxy-D-Glukose
A	Ampere
4-AAP	4-Aminoantipyrin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
aP2	Adipocyte protein 2
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	Brown adipose tissue
BCA	Bichinonsäure
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BMI	Body mass index
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
$C_2H_3NaO_2$	Natriumacetat
$CaCl_2 \cdot 2\ H_20$	Calciumchloriddihydrat
CAG	Basensequenz Cytosin, Adenin, Guanin, codiert die Aminosäure Glutamin
CBP	CREB-binding protein
C/EBPα	CCAAT/enhancer-binding-protein alpha
Ci	Curie
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cpm	Counts per minute
Cu	Kupfer
CREB	cAMP response element-binding protein
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DDT	Dithiothreitol
demin.	demineralisiert
dest.	destilliert

DGAT	Diacylglycerin-O-Acyltransferase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOG	2-deoxy-D-Glukose
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
ESPA	Natrium-N-Ethyl-N-(3-Sulfopropyl) m-anisidine
FCS	fetales Kälberserum
G	Gauge
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GABA	γ-Amminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GLUT	Glukosetransporter
GnRH	Gonadotropin releasing hormon
h	Stunde
H_20	Wasser
H_20_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HD	Huntington's Disease, Huntington'sche Erkrankung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horse radish peroxidase
HTT	Huntingtin-Protein
HTT	Huntingtin-Gen
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IE	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IT15	„interesting transcript 15“ Bezeichnung für das humane Huntingtin-Gen
kbp	Kilobasenpaare
KCL	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
$KHCO_3$	Kaliumhydrogencarbonat
KRH	Krebs-Ringer-Hepes
l	Liter
LDM	Low density microsomes
LXR α	Liver X receptor alpha
M	Mol, molar
m	Meter
m-	Milli-
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4 \cdot 7\ H_20$	Magnesiumsulfatheptahydrat
min	Minuten
molbiol.	für molekularbiologische Analyse geeignet
n-	Nano-
Na^+K^+ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
$Na_4P_2O_7$	Natriumpyrophosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaH_2PO_4 x H_20	Natriumdihydrogenposphatmonohydrat
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
p300	E1A binding protein p300
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDX-1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PFA	Paraformaldehyd
PGC-1α	PPARγ coactivator-1 alpha
pH	pH-Wert
PIP_3	Phosphatidylinositoltriphosphat
PM	Plasmamembran
PPARγ2	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2
PPRE	PPAR-response element

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RXR	Retinoid X Rezeptor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
SREBPs	Sterol response element binding proteins
T3	Trijodthyronin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAF4	Transcription initiation factor TFIID subunit 4
TAQ	Thermus aquaticus
Tbl.	Tablette
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	Tris-EDTA-Sucrose
tg	transgen
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
U	Unit
UCP1	Uncoupling protein 1
V	Volt
WAT	White adipose tissue
wt	Wildtyp
µ-	Mikro-

1. Einleitung

Der US-amerikanische Arzt George Huntington publizierte im April 1872 einen zweiseitigen Artikel mit dem Titel „On Chorea“. Darin beschrieb er eine hereditäre, dominant vererbte, choreatische Bewegungsstörung, die mit progredienten kognitiven Defiziten der Patienten und einer erhöhten Suizidalität einhergeht (Huntington 1872). Die Erkrankung wurde später nach ihrem Erstbeschreiber als „Chorea Huntington“ benannt. Da die choreatische Bewegungsstörung jedoch nur einen Teilaspekt der Erkrankung darstellt, ist der zutreffendere Name „Morbus Huntington“ oder „Huntington's Disease“ (HD). In den folgenden Jahren wurde die Krankheit genauer charakterisiert und als autosomal-dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung beschrieben, die innerhalb von 15 bis 30 Jahren nach Auftreten der ersten Symptome zum Tod führt (Walker 2007).

Mitte des 20. Jahrhunderts begann der venezolanische Arzt Américo Negrette mit der Untersuchung der Bevölkerung in der Region um den venezolanischen Maracaibo-See, wo er eine starke Häufung von HD-Fällen fand (Moscovich et al. 2011). Auf der Suche nach der genetischen Ursache wurde diese Bevölkerungs-gruppe genauer untersucht. 1983 konnte in der venezolanischen Kohorte ein Polymorphismus auf dem kurzen Arm des Chromosom 4 identifiziert werden, der in Zusammenhang mit HD stand (Gusella et al. 1983). Dies wurde 1993 mit der Identifikation der CAG-Repeatverlängerung im Exon 1 des Huntingtin-Gens als Ursache für HD bestätigt (The Huntington’s Disease Collaborative Research Group 1993).

Mit der Entdeckung des Huntingtin-Gens (*HTT*-Gen) wurde die Entwicklung transgener Tiermodelle möglich und die Erforschung der physiologischen Huntingtin-Funktion sowie der zellulären Pathomechanismen im Kontext des mutanten Huntingtins begann. Damit verbunden war stets die Hoffnung auf die Entwicklung therapeutischer Optionen. Bis heute ist es jedoch nicht gelungen, die physiologische Funktion des Huntingtins und die Pathomechanismen vollständig aufzuklären. Alle zurzeit verfügbaren therapeutischen Optionen sind nur sympto-matisch und verbessern die Prognose der Erkrankung nicht (Zuccato et al. 2010).

1.1. Morbus Huntington

1.1.1. Epidemiologie

Die Prävalenz von HD variiert stark in Abhängigkeit von der untersuchten Population. In Europa, Australien und Nordamerika liegt die durchschnittliche Prävalenz bei 5,7 Fällen pro 100 000 Einwohnern, in Asien lediglich bei 0,4/ 100 000 (Pringsheim et al. 2012). Die geographische Streuung lässt sich durch die höhere mittlere CAG-Wiederholungsanzahl (Squitieri et al. 1994) und das höhere Vorkommen der Huntingtin-Haplotypen A1 und A2 in der westeuropäischen Population erklären (Warby et al. 2009). Die höchste HD-Prävalenz ist für die Region um den Maracaibo-See in Venezuela beschrieben. In der 7 000 Einwohner starken Population leben über 100 symptomatische HD-Patienten und etwa 900 mögliche Träger der Mutation (Wexler et al. 1987).

Untersuchungen der Neumutationsrate und zum Vorkommen intermediärer Allele mit einer CAG-Repeatanzahl zwischen 27 und 35, lassen einen Anstieg der Prävalenz in den kommenden Jahren erwarten (Falush et al. 2001). Zudem führt der demographische Wandel mit der steigenden Lebenserwartung dazu, dass mehr Genträger den Ausbruch ihrer HD erleben und es dadurch zu einer Zunahme bei den Late-Onset-Fällen kommen wird (Hayden 2012).

1.1.2. Genetik der Huntington-Erkrankung

HD wird autosomal-dominat vererbt. Die ursächliche Mutation ist eine Zunahme der CAG-Wiederholungen im Exon 1 des *IT15*-Gens auf Chromosom 4q16.3. Das Huntingtin-Gen codiert das 348 kDa große Protein Huntingtin (HTT), das ubiquitär exprimiert wird. Die Zunahme der CAG-Wiederholungen führt auf Proteinebene zu einer verlängerten Polyglutaminkette (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993).
Die mittlere normale CAG-Wiederholungszahl liegt bei 18. Ab einer CAG-Repeat-anzahl ≥ 36 wird die Krankheit mit voller Penetranz vererbt (Kremer et al. 1994). Allele mit 29 bis 35 CAG-Wiederholungen werden als intermediäre Allele bezeichnet. Träger der intermediären Allele erkranken selbst nicht an HD

(Goldberg et al. 1995). Bei der Vererbung an die nächste Generation zeigen sich diese Allele jedoch als instabil mit der Tendenz zu Verlängerung. Dieser Effekt wird als Antizipation bezeichnet und nimmt mit steigender CAG-Repeatanzahl zu. Er ist stärker ausgeprägt, wenn das betroffene Allel paternal vererbt wird (Goldberg et al. 1993).

Die Anzahl der CAG-Wiederholungen korreliert mit dem Erkrankungsalter. Eine hohe Zahl von CAG-Wiederholungen ist mit einem früheren Beginn der HD assoziiert (Andrew et al. 1993). Dennoch zeigt der Vergleich von Patienten mit der gleichen CAG-Wiederholungszahl eine hohe Variabilität des Erkrankungsalters und der Symptome. Dies legt nahe, dass Krankheitsbeginn und -verlauf von zusätzlichen genetischen Faktoren, sogenannten Modifier-Genen, beeinflusst werden (Zuccato et al. 2010).

1.1.3. Symptomatik und Verlauf der Huntington-Erkrankung

Der Altersgipfel für das Auftreten erster Krankheitssymptome liegt zwischen 35 und 50 Jahren. Die Altersspanne reicht jedoch vom Kleinkindesalter bis über 80 Jahre. In etwa 10 % der Fälle manifestiert sich die Krankheit bereits vor dem 20. Lebensjahr und wird dann als juvenile Form der HD bezeichnet. Ein früherer Krankheitsbeginn ist meist mit einem aggressiveren Verlauf der Erkrankung assoziiert. Bei der Late-onset-HD mit Manifestation nach dem 50. Lebensjahr ist der Verlauf in der Regel langsamer (Myers 2004; Zuccato et al. 2010).

Der Übergang aus der präsymptomatischen Phase in die manifeste Erkrankung erfolgt schleichend und ein genauer Zeitpunkt für den Erkrankungsbeginn lässt sich häufig nur schwer definieren. Frühe motorische Symptome können Störungen der Feinmotorik, unwillkürliche Bewegungen kleiner Muskelgruppen und verlangsamte Sakkadenbewegungen der Augen sein. Daneben zeigen sich häufig leichte kognitive Veränderungen, wie z.B. Konzentrationsstörungen und subtile Persönlichkeitsveränderungen (Walker 2007).
Im Krankheitsverlauf entwickeln sich ausgeprägte Koordinationsstörungen mit hyperkinetischen Symptomen wie Chorea und Dystonie. Daneben treten Störungen der Willkürmotorik mit Gangstörungen, Bradykinesie, Rigidität und

posturaler Instabilität auf. Die Patienten leiden häufig unter Dysarthrie und Schluckstörungen (Rosenblatt 2007). Als Ausdruck der progressiven kognitiven Störung treten Beeinträchtigung der Merk- und Lernfähigkeit, eine abnehmende Planungs- und Handlungsfähigkeit sowie Persönlichkeitsveränderungen auf. Ein Großteil der Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine ausgeprägte Demenz (Fahn et al. 2011). Als dritter Symptomkomplex spielen psychiatrische Veränderungen eine wichtige Rolle. HD-Patienten leiden häufig unter Depressionen, Zwangserkrankungen, psychotischen Symptomen und Enthemmung (Rosenblatt 2007). Über 25 % der HD-Patienten unternehmen im Verlauf ihrer Erkrankung einen Suizidversuch (Farrer 1986).

Neben den klassischen neuropsychiatrischen Symptomen treten Störungen in peripheren Geweben auf, die zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufs beitragen. Dazu gehören Gewichtsverlust, hormonelle Veränderungen, Skelettmuskelatrophie und Veränderungen der kardialen Funktion. Die Erforschung der peripheren Veränderungen hat dazu geführt, dass HD zunehmend als systemische Erkrankung betrachtet wird (van der Burg et al. 2009).

Die Huntington-Erkrankung verläuft immer tödlich. Vom Auftreten erster Symptome bis zum Tod vergehen im Mittel 15-30 Jahre. Der Tod ist meist Folge von Krankheitskomplikationen wie Aspirationspneumonien durch die Dysphagie, Auszehrung in Folge metabolischer Veränderungen und Verletzungen nach schweren Stürzen (Zuccato et al. 2010).

1.1.4. Neuropathologische Veränderungen bei Morbus Huntington

Beim M. Huntington kommt es neben einer allgemeinen Hirnatrophie zu einem besonders stark ausgeprägten, progressiven Untergang von Neuronen im Striatum. Hier sind insbesondere der Nucleus caudatus und das Putamen betroffen. Die Veränderungen lassen sich lange vor den ersten motorischen Symptomen nachweisen (Vonsattel u. DiFiglia 1998). Zu Beginn sind bevorzugt die enkepahlin-produzierenden, GABAergen Projektionsneurone, die vom Striatum in das laterale Segment des Globus Pallidum ziehen, betroffen (Walker 2007).

Diese Neurone inhibieren das motorikfördernde laterale Pallidumsegment. Durch den Verlust der inhibitorischen striatalen Neurone kommt es zu der hyperkinetischen, choreatischen Bewegungsstörung. Im Verlauf degenerieren auch die striatalen Neurone, die zum medialen Segment des Globus Pallidum ziehen und physiologisch motorikfördernd wirken. Dadurch lassen sich die hypokinetischen Symptome erklären, die später im Krankheitsverlauf auftreten. Neben dem Striatum sind auch die Substantia nigra, Teile des Thalamus, die C1-Region im Hippocamus und kortikale Areale von den Veränderungen betroffen (Fahn et al. 2011).

Histopathologisch zeigen sich in den betroffenen Arealen nukleäre und zytoplasmatische Aggregate, die mutantes Huntingtin enthalten. Die patho-physiologische Rolle der Aggregate ist noch nicht vollständig erforscht (DiFiglia et al. 1997). Als Korrelat der neuropathologischen Veränderungen zeigt sich in der MRT-Bildgebung eine Volumenreduktion des Striatums und daraus resultierend eine Volumenzunahme der Seitenventrikel. Bei präsymptomatischen Genträgern sind die ersten Anzeichen der striatalen Atrophie bereits 10 Jahre vor dem erwarteten Symptombeginn zu finden (Tabrizi et al. 2011). Im Bereich von Capsula interna und Corpus callosum lassen sich zudem Veränderungen der weißen Substanz darstellen (Rosas et al. 2006).

1.1.5. Das Huntingtin-Protein – normale Funktion und zelluläre Pathomechanismen

Die normale Funktion des Huntingtin-Proteins und die Rolle, die das mutante Huntingtin in der Pathophysiologie beim M. Huntington spielt, sind noch nicht vollständig geklärt. Im folgenden Abschnitt werden wichtige physiologische Funktionen des Proteins und sich daraus ergebende pathophysiologische Mechanismen dargestellt.
Huntingtin wird ubiquitär in allen Geweben des Körpers exprimiert. Eine hohe Huntingtin-Expression findet sich insbesondere im Hoden und im zentralen Nervensystem (Trottier et al. 1995). Die striatalen Neurone und Neurone, die aus den kortikalen Schichten direkt auf striatale Neurone projizieren, zeigen dabei die höchste Expression. Diese Verteilung spiegelt sich in der bevorzugten Beteiligung

striataler Neurone im Verlauf der Erkrankung wider (Ferrante et al. 1997).

Untersuchungen mit *Htt*-Knock-Out-Mäusen (*Hdh*$^{-/-}$) haben gezeigt, dass Huntingtin essentiell für die frühe embryonale Entwicklung ist. Der Verlust der normalen Huntingtin-Funktion verursacht eine Störung der Neurulation und wirkt vor dem 8. Embryonaltag letal (Nasir et al. 1995). In adulten Zellen wirkt Huntingtin antiapoptotisch, schützt Neurone vor toxischen Stimuli, Exzitotoxizität durch synaptische Überstimulation und wirkt protektiv bei ischämischer Schädigung (Rigamonti et al. 2000; Rigamonti et al. 2001; Zhang et al. 2003; Leavitt et al. 2006).

Bislang wurden über 50 Proteine identifiziert, die mit Huntingtin interagieren. Darunter finden sich zahlreiche Transkriptionsfaktoren. Huntingtin reguliert z.B. die Expression des brain derived neurotrophic factor (BDNF), einem neuronalen Wachstumsfaktor, der für das Überleben striataler Neurone wichtig ist (Zuccato et al. 2010). Über die Interaktion mit CREB/TAF4 beeinflusst Huntingtin die Expression von PGC-1α, einem Co-Aktivator, der an der Regulation metabolischer Prozesse beteiligt ist (Cui et al. 2006).

Intrazellulär ist Huntingtin mit dem Zellkern, dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, den Mitochondrien, Mikrotubuli und mit Transportvesikeln assoziiert (Velier et al. 1998; Hoffner et al. 2002; Kegel et al. 2002; Panov et al. 2002). Es ist für die Aktivierung von Rab11 erforderlich, einem G-Protein, das die intrazelluläre Zirkulation von Recyclingendosomen steuert (Li et al. 2008). Huntingtin spielt so eine wichtige Rolle bei intrazellulären Transportvorgängen, der Regulation von Endo- und Exozytose und ist am schnellen axonalen Transport von Neurotransmittern zu den Synapsen beteiligt (Trushina et al. 2004).

Der autosomal-dominate Erbgang der Huntington-Erkrankung deutet auf einen toxischen Effekt des mutanten Huntingtin-Proteins mit dem verlängerten Poly-Q-Abschnitt hin. Die neuroprotektiven und antiapoptotischen Effekte des normalen Huntingtinproteins machen aber auch den Verlust der normalen Huntingtin-Funktion als Ursache der Neurodegeneration denkbar. Welcher Effekt entscheidend ist, wird kontrovers diskutiert (Cattaneo et al. 2005).

Eine gut untersuchte Ursache für die Degeneration striataler Neurone bei M. Huntington ist die Abnahme von BDNF. Die Reduktion der BDNF-Spiegel wird durch verminderte kortikale BDNF-Transkription und einen gestörten axonalen BDNF-Transport zu den striatalen Neuronen verursacht. Im Tiermodell mildert die Substitution von BDNF den Huntington-Phänotyp ab. Die Reduktion von BDNF hat einen entgegengesetzten Effekt (Cattaneo et al. 2005).
Eine weitere Hypothese ist der Untergang von Neuronen durch exzitotoxische Effekte an striatalen Synapsen. Die Exzitotoxizität wird dabei durch eine vermehrte Glutamatfreisetzung aus kortikalen Neuronen, eine verminderten Glutamat-aufnahme in Gliazellen und eine Überempfindlichkeit der striatalen post-synaptischen Glutamatrezeptoren vermittelt (Fan et al. 2009).

Neben den neurotrophischen Faktoren und transmittervermittelten Effekten tragen eine gestörte Mitochondrienfunktion und eine Dysregulation des Zellmetabolismus zum Zelltod der Neurone bei. Dabei spielen eine reduzierte Pufferkapazität für Calciumionen sowie eine verminderte Aktivität der Atmungskettenkomplexe II, III und IV eine Rolle. Die mitochondriale Dysfunktion wird unter anderem über die direkte Bindung von Huntingtin an die Mitochondrien, die Störung des axonalen Transports von Mitochondrien und den Co-Aktivator PGC-1α beeinflusst (Bossy-Wetzel et al. 2008). Für die Beteiligung einer mitochondrialen Störung bei HD spricht auch, dass durch 3-Nitropropionsäure, einem Inhibitor des Komplex II der Atmungskette, ein Verlust striataler Neuronen mit HD-ähnlichen Symptomen verursacht wird (Ludolph et al. 1991; Browne u. Beal 2004).

Außer den beschriebenen Mechanismen werden auch toxische Effekte der Huntingtin-Aggregate, eine veränderte Spaltung von Huntingtin in den Proteasomen und Einflüsse von mutantem Huntingtin auf die DNA-Acetylierung als Pathomechanismen diskutiert (Fahn et al. 2011).

Die ubiquitäre Expression von Huntingtin und seine Interaktion mit basalen Zellfunktionen legen die Vermutung nahe, dass mutantes Huntingtin nicht nur in Neuronen und dem zentralen Nervensystem, sondern auch in anderen Zell- und Gewebetypen zu pathologischen Veränderungen führt. Dysfunktionen in nicht-neuronalem Gewebe, wie z.B. dem Muskel- und Fettgewebe, können so

unabhängig von den Veränderungen des zentralen Nervensystems durch direkte Effekte von mutantem Huntingtin in peripheren Geweben verursacht werden (van der Burg et al. 2009).

1.2. Metabolische Aspekte der Huntington-Erkrankung

1.2.1. Stoffwechselveränderungen bei Huntington-Patienten

Neben den neuropsychiatrischen Symptomen treten bei HD-Patienten Veränderungen des Stoffwechsels auf. Leitsymptom der metabolischen Störung ist ein progressiver Gewichtsverlust (Aziz et al. 2008), der im Endstadium der Krankheit in einer schweren Kachexie mündet. Die Lebensqualität und Lebenserwartung der Patienten werden durch den Gewichtsverlust beeinflusst.

Die Gewichtsabnahme beim M. Huntington wurde zunächst auf einen erhöhten Energieumsatz durch die hyperkinetischen Bewegungsstörungen bei gleichzeitig erniedrigter Energieaufnahme, bedingt durch die Dysphagie, zurückgeführt. Inzwischen ist jedoch belegt, dass bereits Huntington-Patienten im Frühstadium einen signifikant niedrigeren BMI haben als Kontrollpersonen gleichen Alters und Geschlechts (Djoussé et al. 2002). Die BMI-Abnahme in den Stadien I und II der Erkrankung wird dabei nicht von motorischen Parametern beeinflusst, sondern korreliert mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen. Patienten mit langen CAG-Abschnitten verlieren dabei schneller an Gewicht (Aziz et al. 2008).

Bei gleichem BMI haben präsymptomatische HD-Patienten eine höhere Energieaufnahme als gesunde Personen. Der Energiebedarf zur Erhaltung des Körpergewichts ist erhöht und wird von den Patienten durch vermehrte Nahrungsaufnahme kompensiert (Marder et al. 2009). Kalorimetrische Messungen zeigen bei Huntington-Erkrankten einen höheren basalen Energieumsatz. Der erhöhte Energiebedarf wird durch eine höhere basale Fettsäureoxidation gedeckt. Durch Insulinstimulation steigt der Energieumsatz bei den Patienten weiter an, bei den Kontrollpersonen bleibt er dagegen konstant. Gleichzeitig nimmt die Glukoseoxidation nach Insulingabe bei den Patienten stärker zu als bei den Kontrollpersonen (Aziz et al. 2010a).

Die gesteigerte metabolische Aktivität zeigt sich auch in den Serumprofilen der HD-Patienten, die mit erhöhten Glycerin- und Malonatspiegeln auf eine katabole Stoffwechsellage hindeuten (Underwood et al. 2006).

Huntington-Patienten haben ein 7-fach erhöhtes Risiko, Diabetes mellitus zu entwickeln (Farrer 1985). Bei HD-Patienten, die im oralen Glukosetoleranztest (oGTT) die Diagnosekriterien für Diabetes nicht erfüllen, finden sich Veränderungen der Glukosehomöostase mit erhöhten basalen Insulinspiegeln, Insulinresistenz und einer verminderten peripheren Insulinsensitivität. Die Insulinausschüttung nach oraler bzw. venöser Glukosebelastung ist vermindert. Die erniedrigte akute Insulinausschüttung korreliert dabei negativ mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen (Lalić et al. 2008). Die Insulinsensitivität korreliert ebenfalls negativ mit der CAG-Repeat-Länge (Aziz et al. 2010a).

Die Pathomechanismen, die zu den Veränderungen des Glukosestoffwechsels führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Als Ursache kommt eine Störung der Insulinsekretion aus den β-Zellen der Langerhans'schen Inseln durch mutantes Huntingtin in Betracht (Smith et al. 2009). Histomorphologisch finden sich jedoch bei Huntington-Patienten keine Veränderungen des Pankreas (Bacos et al. 2008).

Die reduzierte Insulinsensitivität könnte auch Folge systemischer hormoneller Veränderungen sein. Huntington-Patienten haben bereits im Frühstadium eine erhöhte Cortisolproduktion. Hohe Cortisolspiegel vermindern die periphere Insulinsensitivität und können dadurch den Diabetes mellitus verursachen (Aziz et al. 2009). Ob Veränderungen von Glukosetransportern in peripheren Zellen ebenfalls zum gestörten Glukosemetabolismus beitragen, ist bisher für periphere Gewebe wie Muskel und Fett nicht untersucht. In Neuronen kann die verminderte Glukoseaufnahme auf eine Verteilungsstörung von Glukosetransportern an die Zellmembran zurückgeführt werden. Ursache ist eine Störung des Proteins Rab11 durch mutantes Huntingtin (Li et al. 2012). Ähnliche Mechanismen sind auch im Muskel- und Fettgewebe denkbar.

Neben dem Glukosestoffwechsel sind auch der Protein- und Fettstoffwechsel betroffen. Präsymptomatische HD-Patienten zeigen erniedrigte Plasmaspiegel der

verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin (Mochel et al. 2007). Erhöhte Glycerinspiegel und eine erniedrigte Sekretion des Hormons Leptin, das im Fettgewebe produziert wird, sprechen für eine Beteiligung des Fettgewebes an der metabolischen Dysregulation bei HD (Underwood et al. 2006; Aziz et al. 2010b).

1.2.2. Metabolische Veränderungen bei den R6/2-Huntington-Mäusen

Drei Jahre nach der Entdeckung des *HTT*-Gens gelang der Arbeitsgruppe um Gillian Bates 1996 die Entwicklung der ersten transgenen Mauslinie. Durch die Integration eines 1,9 kbp großen Genomfragments aus dem 5'-Ende des humanen *HTT*-Gens in das murine Genom entstanden die R6-Linien. Aus der R6-Linie ist die R6/2-Mauslinie am genauesten charakterisiert. Die R6/2-Tiere exprimieren einen Abschnitt des humanen Exon 1 mit 145 CAG-Wiederholungen unter dem humanen *IT15*-Promoter ubiquitär in allen Geweben. Das Produkt auf Proteinebene ist ein aminoterminales Fragment des humanen Huntingtin-Proteins mit einem verlängerten Polyglutaminabschnitt. Neben dem transgenen Exon 1-Fragment werden die beiden murinen *Htt*-Allele exprimiert (Mangiarini et al. 1996).

Die R6/2-Tiere zeigen einen ausgeprägten Phänotyp und sind daher in der Huntington-Forschung ein verbreitetes Modell. Die ersten Symptome treten im Alter von ca. 6 Wochen auf. Im Verlauf zeigen die Tiere progressive motorische Symptome mit stereotypen Bewegungen und Ruhetremor. Zudem kommt es zu einem deutlichen Gewichtsverlust und zu epileptischen Anfällen (Mangiarini et al. 1996; Menalled u. Chesselet 2002). Die Lebenserwartung der R6/2-Tiere beträgt etwa 12-14 Wochen (Stack et al. 2005).

Bei den R6/2-Tieren sind progrediente Veränderungen des zentralen Nervensystems beschrieben. Ab der 5. Woche zeigt sich ein vermindertes Hirnvolumen, eine Volumenreduktion des Striatums und damit einhergehend eine Volumenzunahme der Seitenventrikel. Histopathologisch zeigt sich eine Reduktion striataler Neurone. In kortikalen, striatalen und hippocampalen Neuronen treten Huntingtin- und Ubiquitin-positive intranukleäre Einschlüsse auf, die im Verlauf zunehmen (Davies et al. 1997; Stack et al. 2005). Nukleäre Einschlüsse finden

sich bei den R6/2-Mäusen zudem auch in verschiedenen nicht-neuronalen Geweben, z.B. im Muskel, dem Pankreas, der Leber, braunem Fettgewebe oder in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes (Sathasivam et al. 1999).

Ein progressiver Gewichtsverlust, wie er bei Huntington-Patienten beschrieben ist, tritt bei den R6/2-Mäusen ab einem Alter von 8 bis 9 Wochen auf. Das Bewegungsverhalten der transgenen Tiere unterscheidet sich dabei nicht von Wildtyptieren und der Gewichtsverlust ist, wie beim Menschen, nicht mit vermehrter motorischer Aktivität assoziiert (van der Burg et al. 2008). Auch eine verminderte Nahrungsaufnahme scheidet als Ursache aus. Ab der 6. Lebenswoche nehmen die R6/2-Tiere mehr Futter auf und verbringen ab der 10. Lebenswoche signifikant mehr Zeit mit der Nahrungsaufnahme als Wildtyptiere. Im Alter von 6 und 12 Wochen zeigen die R6/2-Tiere als Zeichen metabolischer Hyperaktivität einen deutlich höheren Sauerstoffverbrauch als Wildtypmäuse (van der Burg et al. 2008). Messungen der Energiefreisetzung bestätigen die vermehrte Stoffwechselaktivität bei Tieren im Alter von 14 Wochen (Goodman et al. 2008).

Ein weiteres Mausmodell, die HD-N171-N82Q-Maus, zeigt das gleiche katabole Stoffwechselprofil mit erhöhten Glycerin- und Malonatspiegeln und verändertem Aminosäureprofil, das sich auch bei HD-Patienten findet (Underwood et al. 2006).

Auch die Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels finden sich im Tiermodell wieder. Ab der 7. Woche kommt es bei R6/2-Tieren zu erhöhten Glukosespiegeln im Blut. Die Hyperglykämie nimmt im Krankheitsverlauf zu und ab der 12. Woche manifestiert sich bei fast allen R6/2-Tieren ein atypischer Diabetes mellitus mit erniedrigter pankreatischer Insulinsekretion (Hurlbert et al. 1999; Andreassen et al. 2002). Ab der 5. Lebenswoche sind in den Kernen der pankreatischen β-Zellen Huntingtin-Aggregate nachweisbar, die im weiteren Verlauf zunehmen. Durch die Interaktion von mutantem Huntingtin mit β-Tubulin kommt es zu einer intrazellulären Transportstörung insulinhaltiger Granula in den β-Zellen der Langerhans'schen Inseln und damit zu einer reduzierten Insulinsekretion. Gleichzeitig ist die Insulinsynthese auf Transkriptionsebene vermindert (Andreassen et al. 2002; Björkqvist et al. 2005). Über die periphere Insulin-sensitivität der R6/2-Tiere gibt es derzeit in der Literatur widersprüchliche

Angaben. Hurlbert und Andreassen beschreiben eine erhaltene Reaktion auf eine exogene Insulingabe, die gegen das Vorliegen einer peripheren Insulinresistenz spricht (Hurlbert et al. 1999; Andreassen et al. 2002). Im Gegensatz dazu wurde in einer weiteren Mauskohorte eine verminderte Insulinsensitivität in der 7. Woche, wahrscheinlich durch erhöhte Cortisolspiegel, beschrieben (Björkqvist et al. 2006). Die Aussagen zur Insulinsensitivität leiten sich dabei indirekt aus der Reaktion auf eine systemische, intraperitoneale Insulingabe ab. Bisher gibt es nur eine Untersuchung, die die Wirkung von Insulin direkt an isolierten Fettdepots beschreibt und ein intaktes Ansprechen der R6/2-Tiere auf eine Insulinstimulation zeigt (Fain et al. 2001).

Neben den R6/2-Mäusen zeigen auch Mäuse aus der R6/1-Linie mit 115 CAG-Wiederholungen eine gestörte Glukosetoleranz. Die Tiere entwickeln jedoch keinen Diabetes mellitus und haben nüchtern und postprandial normale Glukosespiegel. Lediglich nach exogener, intraperitonealer Glukosebelastung kommt es zu erhöhten Glukose- und Insulinspiegeln mit einem verzögerten Absinken der Blutzuckerwerte (Josefsen et al.2008).

Weitere metabolische Veränderungen finden sich im Fettgewebe der R6/2-Tiere. Ab einem Alter von 8 Wochen verändert sich die Fettverteilung. Die R6/2-Tiere zeigen trotz sinkendem Körpergewicht eine Akkumulation von intraabdominalem Fettgewebe (Fain et al. 2001; Björkqvist et al. 2006; Phan et al. 2009). Die Expression adipogener Marker im Fettgewebe, z.B. PPARγ2, C/EBPα oder aP2 ist bis zu einem Alter von 4 Wochen erhöht und sinkt danach ab. Dieses Expressionsmuster zeigt sich auch beim CAG140-Mausmodell. Es kann durch die Expression von mutantem Huntingtin in Zellen der 3T3-L1-Adipozytenlinie reproduziert werden. Mutantes Huntingtin verursacht in den Zellen zudem eine Störung der Triglyceridspeicherung und beeinträchtigt die Co-Aktivierung des PPAR-response element (PPRE) über PGC-1α (Phan et al. 2009).
Die Hormonsekretion aus dem Fettgewebe ist ebenfalls verändert. So zeigen R6/2-Mäuse, wie auch HD-Patienten, verminderte Leptinspiegel. Zusätzlich ist Adiponektin erniedrigt. Auswirkungen der veränderten Adipokinspiegel auf die Regulation des Gesamtstoffwechsels sind wahrscheinlich, aber noch nicht näher untersucht (Phan et al. 2009).

Neben dem weißen Fettgewebe ist bei Huntington-Mäusen auch die Funktion des braunen Fettgewebes verändert. Mutantes Huntingtin stört auch dort die Aktivität von PGC-1α und verhindert so die Induktion von UCP1, das für die mitochondriale Thermogenese wichtig ist (Weydt et al. 2006).

1.3. Der insulinsensitive Glukosetransporter GLUT4

Skelettmuskel und Fettgewebe sind die Hauptspeicher für Glukose und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutzuckerspiegels. Die Glukoseaufnahme und -speicherung in Muskel- und Fettgewebe ist insbesondere für die Vermeidung postprandialer Blutzuckerfluktuationen bedeutend. Eine gestörte Glukoseaufnahme in periphere Speicher führt zu erhöhten Blutzuckerspiegeln nach einer Glukosebelastung (Cooke u. Lane 1999). Die Glukoseaufnahme in Adipozyten erfolgt passiv durch erleichterte Diffusion über die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4. GLUT1 ist dabei permanent in der Plasmamembran lokalisiert und für die basale Glukoseaufnahme bei niedrigen Blutzuckerspiegeln zuständig. Die insulininduzierte Glukoseaufnahme bei hohen Plasmaglukosespiegeln, z. B. postprandial, erfolgt über GLUT4 (Bryant et al. 2002).

In Abwesenheit von Insulin ist nur ein geringer Anteil von GLUT4 in der Plasmamembran lokalisiert, der überwiegende Teil zirkuliert zwischen verschiedenen intrazellulären Speichern. Insulin löst über den Insulinrezeptor eine komplexe Signalkaskade aus, die zur Translokation von GLUT4 an die Plasmamembran führt. Insulin aktiviert die Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors und führt über die Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats zur Rekrutierung der PI_3-Kinase, die Phosphatidilinositolbiphosphat zu Phosphatidylinositol-triphosphat (PIP_3) phosphoryliert. PIP_3 aktiviert die Proteinkinase B, die die GLUT4-Translokation an die Zellmembran vermittelt. Die Glukoseaufnahme in die Adipozyten erhöht sich durch den steigenden GLUT4-Gehalt in der Plasmamembran um ein Vielfaches (Bryant et al. 2002).

Nach Beendigung des Insulinstimulus überwiegt die Endozytose und GLUT4 wird über die Recyclingendosomen wieder in das insulinsensitive Kompartiment

aufgenommen. Am Transport von GLUT4 aus den Recyclingendosomen ist Rab11 beteiligt (Ishikura et al. 2008), ein G-Protein, das unter anderem durch Huntingtin aktiviert wird. In der Anwesenheit von mutantem Huntingtin ist die Rab11-Aktivität beeinträchtigt (Li et al. 2008). Dieser Mechanismus könnte zu einer Transportstörung von GLUT4 und damit zu einer veränderten Glukoseaufnahme in Adipozyten führen.

Neben der GLUT4-Translokation beeinflusst auch die GLUT4-Expression die Glukoseaufnahme. Obwohl das Fettgewebe im Vergleich zum Skelettmuskel weniger zur Glukoseaufnahme beiträgt, haben Veränderungen der GLUT4-Expression im Fettgewebe Einfluss auf die systemische Glukosehomöostase. Eine verminderte GLUT4-Expression im Fettgewebe tritt bei Diabetes mellitus Typ 2 auf und beeinflusst die Insulinsensitivität des ganzen Organismus. Im Gegensatz dazu verbessert die Überexpression von GLUT4 im Fettgewebe die systemische Insulinsensitivität (Carvalho et al. 2005).

Die Regulation der GLUT4-Expression im Fettgewebe ist noch nicht vollständig erforscht. Das Sterol response element binding protein-1c (SREBP-1c), Liver X receptor α (LXRα), CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP-α) und die Aktivierung des T3-Rezeptors scheinen die GLUT4-Expression zu induzieren. Im Gegensatz dazu vermindern der Tumor necrosis factor α (TNFα), freie Fettsäuren und der Peroxisome proliferators-activated receptor-gamma (PPAR-γ) die GLUT4-Expression (Im et al. 2007). Insulin vermittelt über den Nuclear factor-1 (NF-1) ebenfalls eine Reduktion der GLUT4-Expression (Cooke u. Lane 1999).

1.4. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Wie beschrieben, sind Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels inzwischen bei Huntington-Patienten und bei Huntington-Mausmodellen durch zahlreiche Publikationen belegt. Als mögliche Ursachen werden Störungen der Pankreasfunktion, Beeinträchtigungen der Stoffwechselregulation durch Veränderungen des Cortisolspiegels und direkte Effekte von mutantem Huntingtin im peripheren Gewebe diskutiert. Die direkten Effekte von Huntingtin auf den Glukosestoffwechsel in metabolisch aktiven Geweben, wie z.B. dem Fettgewebe, sind dabei noch kaum untersucht.
Aufgrund der veränderten Homonspiegel bei HD-Patienten und im Tiermodell, insbesondere von Insulin und Cortisol, ist eine Beurteilung des peripheren Glukosemetabolismus schwierig. In-vivo-Assays, wie z.B. Untersuchungen der Glukosetoleranz, erlauben keine sichere Aussage über die Aktivität des peripheren Gewebes, da das Ergebnis immer auch von der systemischen, hormonellen Situation beeinflusst wird. So kann z.B. bei erhöhten Cortisolspiegeln nicht sicher beurteilt werden, ob eine verminderte Insulinsensitivität cortisolbedingt ist oder durch eine Störung direkt im Zielgewebe verursacht wird.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Glukoseaufnahme über den insulinsensitiven Glukosetransporter 4 (GLUT4) in das Fettgewebe der transgenen R6/2-Huntington-Mäuse zu untersuchen. Es wurden folgende Hypothesen überprüft:

Die Expression des insulinsensitiven Glukosetransporters GLUT4 im Fettgewebe der R6/2-Mäuse ist aufgrund des mutanten Huntingtin-Fragmentes verändert. Zusätzliche ist durch das mutante Huntingtin der Transport von GLUT4 in die Plasmamembran gestört. Als Folge der veränderten GLUT4-Expression und des gestörten GLUT4-Transports ändert sich auch die Glukoseaufnahme in das Fettgewebe.

Ausgehend von diesen Hypothesen wurden folgende Fragen beantwortet:

1. Ist die Expression des insulinsensitiven Glukosetransporters GLUT4 im Fettgewebe des R6/2-Mausmodells verändert?

2. Sind die Lokalisation von GLUT4 in den Zellen und die insulininduzierte GLUT4-Translokation an die Zellmembran durch mutantes Huntingtin verändert?

3. Spielt eine veränderte Expression von Rab11, das am intrazellulären Transport von GLUT4 beteiligt ist, eine Rolle?

4. Ist die Glukoseaufnahme in primäre Adipozyten, die aus dem Fettgewebe von R6/2-Tieren isoliert wurden, verändert?

5. Ist die Umwandlung von Glukose zu Triglyceriden in primären Adipozyten, die aus dem Fettgewebe von R6/2-Tieren isoliert wurden, verändert ?

6. Beeinflusst mutantes Huntingtin die adipogene Differenzierung primärer Adipozyten, die aus dem Fettgewebe von R6/2-Tieren isoliert wurden?

Die Untersuchung der GLUT4-Translokation und der Glukoseaufnahme *in vitro* an Organ- bzw. Zellkulturen unter standardisierten hormonellen Bedingungen sollen dabei Aufschluss über die Insulinsensitivität des Fettgewebes geben.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Auflistung der verwendeten Substanzen in alphabetischer Reihenfolge mit Angabe des Herstellers: **A**crylamid 30 % *(AppliChem, Darmstadt),* Agarose *(Lonza, Schweiz),* Ammoniumpersulfat *(Sigma-Aldrich, USA),* **B**icinchoninsäure *(Sigma-Aldrich, USA),* Bromphenolblau *(Sigma-Aldrich, USA),* $\mathbf{C}_2H_3NaO_2$ *(Fluka, Schweiz),* ^{14}C-DOG 100 µCi/ml *(Perkin Elmer, USA)*, ^{14}C-Glukose 20 µCi/ml *(Perkin Elmer, USA)*, $CaCl_2 \cdot 2\ H_20$ *(Merck, Darmstadt)*, **D**API *(Sigma-Aldrich, USA)*, DDT *(AppliChem, Darmstadt),* DMSO *(Sigma-Aldrich, USA),* DNA-Ladepuffer 6-fach *(Fermentas, Litauen), d*NTPs *(Roche, Schweiz),* DOG *(Sigma-Aldrich, USA),* **E**DTA-Lösung 0,5 M *(AppliChem, Darmstadt),* EDTA *(Sigma-Aldrich, USA),* EGTA *(AppliChem, Darmstadt),* Essigsäure 100 % *(Merck, Darmstadt),* Eosin *(Merck, Darmstadt),* Eselserum *(Jackson ImmunoResearch, USA)*, Ethanol absolut *(AppliChem, Darmstadt),* Ethidiumbromidlösung 1 % *(Merck, Darmstadt),* Eukitt *(O-Kindler, Freiburg),* **F**ree Glycerol Reagent *(Sigma-Aldrich, USA),* **G**lycerin *(AppliChem, Darmstadt),* Glycerin Standardlösung 2,8 mM *(Sigma-Aldrich, USA),* Glycin *(AppliChem, Darmstadt),* **H**ämalaun *(Merck, Darmstadt),* HEPES *(Sigma-Aldrich, USA),* H_20 – molbiol. *(Invitrogen, USA),* H_20_2 30 %ige Lösung *(Thermo Scientific, USA),* Hexan *(Sigma-Aldrich, USA),* **I**sopropanol *(Sigma-Aldrich, USA),* **K**CL *(Calbiochem, USA),* $KHCO_3$ *(Sigma-Aldrich, USA),* Kupfer(II)-Sulfatlösung *(Sigma-Aldrich, USA),* **M**ethanol *(Sigma-Aldrich, USA),* $MgCl_2$ 50 mM - molbiol. *(Invitrogen, USA),* $MgSO_4 \cdot 7\ H_20$ *(Merck, Darmstadt)*, Milchpulver *(Roth, Karlsruhe),* Mowiol *(Calbiochem, USA),* $\mathbf{N}a_2HPO_4$ *(Merck, Darmstadt),* $Na_4P_2O_7$ *(Sigma-Aldrich, USA),* NaCl *(Sigma-Aldrich, USA),* NaH_2PO_4 *(Merck, Darmstadt),* $NaH_2PO_4 \cdot H_20$ *(Merck, Darmstadt),* NaOH *(AppliChem, Darmstadt)* NH_4Cl *(Sigma-Aldrich, USA),* Natriumdesoxycholat *(AppliChem, Darmstadt),* Natriumcitrat *(JT Baker, Niederlande),* **O**il Red O *(Sigma-Aldrich, USA),* **P**araformaldehyd *(Sigma-Aldrich, USA),* Paraffin *(Leica Biosystems, Nußloch),* PCR-Puffer 10-fach *(Invitrogen, USA),* Pferdeserum *(Gibco, USA),* Propanol *(VWR International, USA),* Proteaseinhibitor complete EDTA free *(Roche, Schweiz)*, Pyruvat *(Sigma-*

Aldrich, USA), **S**DS 20 %ige Lösung *(AppliChem, Darmstadt),* SDS *(Serva, Heidelberg),* Sucrose *(Sigma-Aldrich, USA),* Szintillationslösung RotiScint®eco *(Roth, Karlsruhe)*, **T**AQ-Polymerase 5 U/µl *(Invitrogen, USA),* TEMED *(Fluka, Schweiz),* Triglyceride Reagent *(Sigma-Aldrich, USA),* Tris *(Sigma-Aldrich, USA),* Tris-HCl *(AppliChem, Darmstadt)*, Triton X-100 *(Sigma-Aldrich, USA),* Trypanblau *(Sigma-Aldrich, USA)*, Tween 20 *(Sigma-Aldrich, USA),* **S**igma Fast® DAB *(Sigma-Aldrich, USA),* Sigma Fast® Urea + H_20_2 *(Sigma-Aldrich, USA),* **X**ylol *(Sigma-Aldrich, USA),* **Z**iegenserum *(Invitrogen, USA).*

Reaktionskits:

MemCode® - Reversible Protein Stain Kit for PVDF Membranes *(Thermo Scientific, USA),* Pierce ECL Western Blotting Substrate *(Thermo Scientific, USA),* Vectastain Elite® ABC Kit *(Vector Laboratories, USA).*

Größenmarker für Elektrophorese:

DNA-Ladder 100 kbp *(Fermentas, Litauen),* PageRuler Plus für Proteine *(Thermo Scientific, USA).*

Substanzen und Medien für Zellkultur:

Biotin *(Sigma-Aldrich, USA)*, Bovine Serum Albumin *(Roth, Karlsruhe),* Corticosteron *(Sigma-Aldrich, USA),* DMEM:F12 (1:1) *(Invitrogen, USA),* FCS *(Invitrogen, USA),* IBMX *(Sigma-Aldrich, USA),* Insulin *(Sigma-Aldrich, USA),* Kollagenase Typ IV *(Sigma-Aldrich, USA),* M199 *(Invitrogen, USA),* Panthotenat *(Sigma-Aldrich, USA)*, PBS *(Invitrogen, USA),* Penicillin/ Streptomycin *(Invitrogen, USA)*, Rosiglitazone *(Cayman Chemical, USA),* Transferrin *(Sigma-Aldrich, USA),* 0,25 % Trypsin/ EDTA *(Invitrogen, USA),* T3 *(Sigma-Aldrich, USA).*

2.1.2. Zusammensetzung von Lösungen und Puffern

ABC-Lösung Vectastain:
3 Tropfen Reagenz A
3 Tropfen Reagenz B in 5 ml PBS verdünnen und 30 min bei RT stehen lassen

Ammoniumpersulfatlösung:
10 % APS in demin. H_20 lösen

^{14}C-Glukoselösung:
10 µCi/ml ^{14}C-Glukose in Basalmedium

DOG-Gebrauchslösung:
2 mM DOG
4 µCi/ml ^{14}C-DOG in KRH-Puffer

Elektrodenpuffer:
pH 8,3
25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS in demin. H_20 lösen

Erythrozytenlysepuffer:
155 mM NH_4Cl
10 mM $KHCO_3$
0,1 mM EDTA in demin. H_20 lösen und steril filtrieren

Kollagenaselösung 0,15 %:
0,15 % Kollagenase IV
2 % BSA in DMEM lösen und steril filtrieren

KRH-Puffer:
pH 7,4
130 mM NaCl
10 mM HEPES
10 mM $MgSO_4 \cdot 7\ H_20$
2,5 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_20$
4,6 mM KCl
2,5 mM $CaCl_2 \cdot 2\ H_20$
2,5 mM Pyruvat
1 % BSA in Aqua dest. lösen und steril filtrieren

Ladepuffer (6-fach):	7 ml Tris 0,5 M mit 0,4 % SDS
für Western Blot	3 ml Glycerin
	1 g SDS
	0,93 g DDT
	1 mg Bromphenolblau
Lysepuffer für Fettgewebe:	20 mM Tris-HCL
pH 7,5	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	2,5 mM $Na_4P_2O_7$
	1 % Triton-X-100
	Proteaseinhibitor complete EDTA free mini
	(1 Tbl/ 10 ml) in demin. H_20 lösen
Oil-Red-Arbeitslösung:	Oil-Red-Stammlösung im Verhältnis 6:4 mit H_2O verdünnen, Lösung durch 0,2 µm Filter filtrieren
Oil-Red-Stammlösung:	0,35 % Oil Red O in
	99 % Isopropanol lösen
	und durch einen 0,2 µm Filter filtrieren
10-fach PBS nach Sörensen:	0,8 M Na_2HPO_4
pH 7,4	0,2 M NaH_2PO_4
	1,54 M NaCl in demin. H_20 lösen
PBS:	10-fach PBS im Verhältnis 1:10 mit demin. H_20 verdünnen
PBS-T:	PBS
	0,1 % Tween 20
PFA-Lösung 4 %ig:	4 % PFA bei 60 °C unter Rühren in PBS lösen

PFA-Lösung 10 %ig:	10 % PFA bei 60 °C unter Rühren in PBS lösen
RIPA-Puffer: pH 7,4	150 mM NaCl 10 mM Tris (pH 7,4) 5 mM EDTA 0,1 % SDS 1 % Triton X-100 1 % Natriumdesoxycholat in demin. H_20 lösen
Sammelgelpuffer: pH 6,8	0,5 M Tris-HCL in demin. H_20 lösen
Sucrosegradient 38,5 %: pH 7,4	1,12 M Sucrose 20 mM Tris 1 mM EDTA in demin. H_20 lösen
50-fach TAE-Puffer: pH 8,0	2 M Tris 250 mM $C_2H_3NaO_2$ 50 mM EDTA in demin. H_20 lösen
TAE-Puffer:	50-fach TAE-Puffer 1:50 in demin. H_20 verdünnen
TBS: pH 7,4	10 mM Tris 150 mM NaCl in demin. H_20 lösen
TBS-T: pH 7,4	TBS 0,1 % Tween 20
TES-Puffer: pH 7,4	250 mM Sucrose, 20 mM Tris 1 mM EDTA Proteaseinhibitor complete EDTA free (1 Tbl./ 50 ml) in demin. H_20 lösen

Transferpuffer:	25 mM Tris
pH 8,3	192 mM Glycin
	0,1 % SDS in demin. H_20 lösen
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCL in demin. H_20 lösen
pH 8,8	

2.1.3. Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Basalmedium:	10 % FCS
	33 µM Biotin
	17 µM Panthotensäure
	100 IE/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin in DMEM:F12
Differenzierungsmedium:	10 nM Insulin
	100 nM Corticosteron
	0,2 nM T3
	0,25 mM IBMX
	1 µM Rosiglitazone in Basalmedium lösen
Erhaltungsmedium:	10 nM Insulin
	100 nM Corticosteron
	0,2 nM T3 in Basalmedium lösen

2.1.4. Zusammensetzung der Elektrophoresegele

Agarosegel 3 %ig:	3 g Agarose in
	100 ml TAE-Puffer lösen und aufkochen, unter ständigem Rühren auf 50 °C abkühlen und
	5 µl Ethidiumbromidlösung hinzufügen

Sammelgel 4 % Acrylamid:	3,0 ml H_2O
	0,65 ml 30 %ige Acrylamidlösung
	1,25 ml Sammelgelpuffer
	20 µl 20 %ige SDS-Lösung
	25 µl 10 %ige APS-Lösung
	5 µl TEMED

Trenngel 5 % Acrylamid:	5,7 ml H_2O
	4 ml 30 %ige Acrylamidlösung
	1,7 ml Trenngelpuffer
	50 µl 20 %ige SDS-Lösung
	75 µl 10 %ige APS-Lösung
	10 µl TEMED

Trenngel 12 % Acrylamid:	3,4 ml H_2O
	4 ml 30 %ige Acrylamidlösung
	2,5 ml Trenngelpuffer
	50 µl 20 %ige SDS-Lösung
	75 µl 10 %ige APS-Lösung
	10 µl TEMED

2.1.5. Antikörper

2.1.5.1. Antikörper für Western Blot

Primäre Antikörper

Anti-Na^+K^+ATPase-alpha-1	Upstate Biotechnology, USA *(05-369)*
Monoclonal Anti-β-Tubulin I	Sigma-Aldrich, USA *(T7816)*
Mouse Anti-Huntingtin Protein	Merck Millipore, Darmstadt *(MAB2166)*
Purified Mouse Anti-Rab11	BD Transduction Laboratories, USA *(610657)*
Rabbit polyclonal to GLUT4	Abcam, Großbritannien *(ab654)*

Sekundäre Antikörper

Goat-Anti-Rabbit HRP-conjugated	Bio-Rad Laboratories, München *(172-1019)*
Goat-Anti-Mouse HRP-conjugated	Bio-Rad Laboratories, München *(172-1011)*

2.1.5.2 Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Primäre Antikörper

Anti-Huntingtin Antibody 2B4	Merck Millipore, Darmstadt *(MAB5492)*
Polyclonal Antibody to Rab11A	Acris Antibodies, Herford *(AP16057PU-N)*
Purified Mouse Anti-Rab11	BD Transduction Laboratories, USA *(610657)*
Rabbit polyclonal to GLUT4	Abcam, Großbritannien *(ab654)*

Sekundäre Antikörper

Biotinylated Anti-Rabbit-IgG	Vector Laboratories, USA *(BA-1000)*
Biotinylated Anti-Mouse-IgG	Vector Laboratories, USA *(BA-2000)*
DyLight ™ 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, USA *(711-485-152)*
DyLight ™ 549-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG	Jackson ImmunoResearch, USA *(705-505-147)*

2.1.6. PCR-Primer

Tabelle 1 Übersicht der zur Genotypisierung der Versuchstiere verwendeten Primer. *Die Primer lagen in einer Konzentration von 100 µM vor.*

Primer	Sequenz	Hersteller
33935	5'-CGGCTGAGGCAGCAGCGGCTGT-3'	Biomers.net, Ulm
35093	5'-GCAGCAGCAGCAGCAACAGCCGCCACCGCC-3'	Biomers.net, Ulm

Tabelle 2 Übersicht der zur Abschätzung der Länge der Cytosin-Adenin-Guanin-Abschnitte verwendeten Primer. *Die Primer lagen in einer Konzentration von 100 µM vor.*

Primer	Sequenz	Hersteller
31329	5'- ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC -3'	Biomers.net, Ulm
33934	5'- GGCGGCTGAGGAAGCTGAGGA-3'	Biomers.net, Ulm

2.1.7. Verbrauchsmaterialien

Ausgießförmchen	Leica Biosystems, Nußloch
Biopsiekassetten	Leica Biosystems, Nußloch
Deckgläser (24 x 60 mm)	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmalkanülen (6 G x 1/2”)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Falconröhrchen (15 ml und 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Filter (Porengröße 0,45 und 0,2 µm)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Filterpapier	Bio-Rad Laboratories, München
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, USA
Petrischalen (Ø 9,4 cm)	Greiner bio-one, Österreich
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
PVDF-Membran ImmunoBlot	Bio-Rad Laboratories, München
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Siebgewebe monofil (150 µm Maschenweite)	Schubert & Weiss, München
Spritzen (1 ml)	BD Transduction Laboratories, USA
Szintillationsröhrchen	Perkin Elmer, USA
Zellkulturflaschen 75 cm²	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellkulturplatten (12- und 24-Well)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellsiebe (Porengröße: 100 µm, 30 µm)	BD Bioscience, USA
Zentrifugenröhrchen für Rotor SW 40 T1	Beckmann Coulter GmbH, Sinsheim
Zentrifugenröhrchen für Rotor SS 34	Nalgene Centrifuge Ware, USA

2.1.8. Geräte

CCD-Kamera LAS 4000	GE Healthcare, Großbritannien
Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Durchlichtmikroskop BX51	Olympus, Japan
Elektrophoresekammer Mini Protean 3	Bio-Rad Laboratories, München
Gerät zur automatischen Gewebeinfiltration TP1020 (Histokinette)	Leica Biosystems, Nußloch
Glasplatten Mini Protean 3 System (7 x 10 cm, Abstand 1 mm)	Bio-Rad Laboratories, München
Geldokumentationssystem Genosmart	VWR International, USA

Gewebehomogenisator 15 cm³, Typ Potter-Elvehjem mit glattem Pistill	VWR International, USA
Inkubator Heraeus CO_2-Auto-Zero	Heraeus Instruments, Hanau
Kämme für Mini Protean 3 (10- und 15-Well)	Bio-Rad Laboratories, München
Konfokales Mikroskop LSM 710	Carl Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Magnetrührer Ret basic	IIKA-Werke, Staufen im Breisgau
Mikroplate Reader ELX Universal 800 UV	BioTek Instruments, USA
Mikrotom RM 2135	Leica Biosystems, Nußloch
Paraffinausgießstation EG1150 H	Leica Biosystems, Nußloch
Pipetten Eppendorf Research (0,1-2,5 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Schütteltisch 3005	GFL GmbH, Burgwedel
Spannungsquelle Power Pac HC	Bio-Rad Laboratories, München
Sterilbank HeraSafe HS	Heraeus Instruments, Hanau
Teflonplatten	wissenschaftliche Werkstatt der Universität Ulm
Transfersystem Mini Trans Blot cell	Bio-Rad Laboratories, München
Ultra Turrax T8	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Ultra Turrax T18	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Ultrazentrifuge Optima XL 90	Beckmann Coulter GmbH, Sinsheim
Vortexmixer VWR analog	VWR International, USA
Waage BL 610	Sartorius AG, Göttingen
Wärmeschrank Heraeus UT 6050	Thermo Scientific, USA
Wasserbad 1083	GFL GmbH, Burgwedel
Wasserbad HI 1210	Leica Biosystems, Nußloch
Zählkammer Neubauer improved bright line	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Sorvall RC 5C	Thermo Scientific, USA
Zentrifuge Varifuge 3.2.S	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.9. Software

cell^F 2.5	Olympus, Japan
GNU Image Manipulation Program 2.6.11	Free Software Foundation, USA
GraphPad Prism® Version 5.00	GraphPad Software, USA
ImageJ Version 1.42q	National Institutes of Health, USA
ImageQuant™ Version 1.2	GE Healthcare, Großbritannien
KCJunior Version 1.41	Bio-Tek Instruments , USA
Open Office.org 3.2.0 Calculator	Sun Microsystems Inc., USA
Zen System 2011	Carl Zeiss, Oberkochen

2.2. Methoden

2.2.1. Zucht und Tierhaltung

Tierzucht und -haltung erfolgten gemäß geltender Tierschutzbestimmungen in den Tierversuchsanlagen der Universität Ulm.

Die erste Generation männlicher transgener R6/2-Zuchttiere des Stammes [B6CBATg(HDexon1)62Gpb/1J] wurde von *Charles River Laboratories International* bezogen. Die transgenen Männchen wurden für die Zucht mit weiblichen C57BL6J/CBA-F1-Hybriden verpaart. Die neugeborenen Jungtiere wurden im Alter von drei Wochen von der Mutter getrennt und durch einen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe genotypisiert. Ein Teil der transgenen Männchen wurde im Alter von 7 Wochen mit C57BL6J/CBA-F1-Weibchen verpaart, um die Zucht fortzusetzen.

Die Tierhaltung erfolgte nach Geschlecht getrennt in Gruppen mit bis zu fünf Tieren pro Käfig. Die Umgebungstemperatur betrug konstant 22 °C (+/- 1 °C) und die Tiere waren einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt. Trinkwasser und Standardfutter der Firma Ssniff *(Nr. V1124-3)* stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

2.2.1.1. PCR zur Abschätzung der CAG-Repeat-Länge

Die Anzahl der CAG-Wiederholungen im Exon 1 des Huntingtin-Gens der Versuchstiere kann durch eine PCR-Reaktion mit anschließender Elektrophorese im Ethidiumbromid-Agarosegel abgeschätzt werden. Die zur PCR verwendeten Primer flankieren das transgene Exon 1 (Riess et al. 1993). Die Größe der flankierenden DNA-Abschnitte beträgt dabei 85 Basenpaare (Mangiarini et al. 1996) und die Länge der synthetisierten PCR-Produkte variiert in Abhängigkeit von der Anzahl der CAG-Wiederholungen im Exon 1.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

5 µl DNA-Probe
2,5 µl DMSO
0,5 µl dNTPs (10 mM)
0,2 µl Primer 31329 (100 µM)
0,2 µl Primer 33934 (100 µM)
0,25 µl TAQ-Polymerase (5 U/µl)
2,5 µl 10-fach PCR-Puffer
2 mM $MgCl_2$
mit 13,1 µl H_20 molbiol auf 25 µl Gesamtvolumen auffüllen

Für den PCR-Ansatz wurden DNA-Proben verwendet, die zur Genotypisierung der Tiere isoliert wurden und für weitere Untersuchungen archiviert waren. Zur Kontrolle der Spezifität der Reaktion diente eine Wasserprobe, die Wasser anstelle der DNA enthielt. Die PCR-Reaktion erfolgte im Thermocycler. Im ersten Schritt wurden die Proben zur DNA-Denaturierung auf 94 °C erhitzt (1:30 min). Danach folgten 35 Synthesezyklen (94 °C/0:30 min; 65 °C/0:30 min, 72 °C/1:30 min). Am Ende wurden die Proben 10 min lang bei 72 °C erhitzt und anschließend auf 8 °C abgekühlt (Mangiarini et al. 1996). Vor dem Auftragen auf das 3 %ige Agarosegel wurden die Proben mit je 5 µl 6-fach DNA-Ladepuffer versetzt. Pro Tasche wurden 10 µl der vorbereiteten Probe aufgetragen. In die beiden Randtaschen wurde ein Größenmarker pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte über 2:15 h bei einer Spannung von 100 mV in TAE-Puffer. Im Anschluss wurden die ethidiumbromidmarkierten DNA-Banden im Gel mit einem Geldetektionssystem

bei einer Wellenlänge von 300 nm dargestellt. Anhand des Größenmarkers wurde die Anzahl der Basenpaare der PCR-Produkte abgeschätzt und daraus nach folgender Formel die Anzahl der CAG-Wiederholungen errechnet:

(bp des PCR-Produktes – 85 bp)/ 3= Anzahl der CAG-Wiederholungen

2.2.1.2. Gewebepräparation

Ein Mitarbeiter der Arbeitsgruppe mit entsprechender Ausbildung tötete die Tiere im Alter von 12 bzw. 8 Wochen durch zervikale Dislokation. Direkt im Anschluss wurde das Gewebe entnommen. Zur Untersuchung des weißen Fettgewebes wurde das gonadale Fettdepot verwendet, da es einfach zugänglich ist und im Vergleich zu anderen Depots eine hohe Fettmasse bietet. Das braune Fettgewebe wurde aus den interscapulären Fettdepots entnommen.

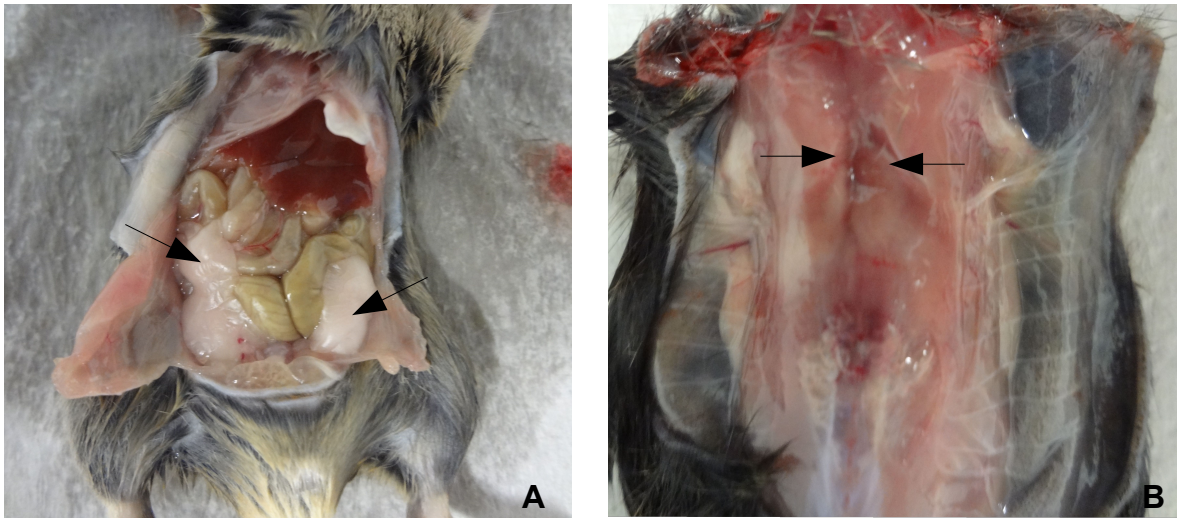


Abbildung 1 Präparation des Fettgewebes. *Das weiße Fettgewebe wurde aus den gonadalen Fettdepots der Versuchstiere gewonnen (A). Das braune Fettgewebe wurde aus den interscapulären Fettdepots präpariert (B). Die Pfeilspitzen markieren in beiden Bildern die Fettdepots.*

Gewebe, das für Western Blot bestimmt war, wurde nach der Präparation in Eppendorfgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Das Gewebe für Zell- bzw. Organkulturen wurde mit sterilem Präparationsbesteck gewonnen und nach der Präparation in Zell- bzw. Organkulturmedium gesammelt.

Bei der Präparation wurden das Körpergewicht der Tiere und das Gewicht der gonadalen Fettdepots ermittelt. Aus den Werten wurde der prozentuale Anteil der gonadalen Fettdepots am Gesamtkörpergewicht errechnet *([Gewicht der Fettdepots/ Körpergewicht]·100).*

2.2.2. Histologische Methoden

2.2.2.1. Gewebefixierung und Herstellung von Paraffinschnitten

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Tiere nach dem Töten mit 4 %iger PFA-Lösung perfundiert und eine Woche bei 8 °C im Kühlraum gelagert. Dann erfolgte die Präparation des weißen und braunen Fettgewebes, das für die Paraffinfixierung in Biopsiekassetten gegeben wurde.

Die Fixierung erfolgte automatisiert mit der Histokinette TP1020 nach folgendem Protokoll: 12 h 50 % Isopropanol, 1 h 75 % Isopropanol I, 1 h 75 % Isopropanol II, 1 h 96 % Isopropanol I, 1 h 96 % Isopropanol II, 1 h 100 % Isopropanol I, 1 h 100 % Isopropanol II, 1 h 100 % Isopropanol III, 1 h Xylol I, 1 h Xylol II, 1 h Paraffin I, 5 h Paraffin II.

Anschließend wurde das fixierte Gewebe in 70 °C heißes Paraffin eingegossen. Nach dem Abkühlen der Paraffinblöckchen wurden mit dem Mikrotom 6 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden bei 60 °C im Wärmeschrank 30 min getrocknet.

2.2.2.2. Bestimmung der Zellgröße im weißen Fettgewebe

Zur Bestimmung der Adipozytengröße wurden Schnitte aus weißem Fettgewebe mit Hämalaun gefärbt. Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll vorbehandelt: 2 x 15 min Xylol, 2 x 5 min 100 % Ethanol, 2 x 5 min 95 % Ethanol, 5 min 80 % Ethanol, 5 min 70 % Ethanol.

Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen, kurz mit Hämalaun gefärbt und unter fließendem Wasser gespült. Am Ende wurden die Schnitte mit einer

aufsteigenden Alkoholreihe (2 min 70 % Ethanol, 2 min 80 % Ethanol, 2 x 2 min 95 % Ethanol, 2 x 2 min 100 % Ethanol, 2 x 2 min Xylol) wieder entwässert und mit Eukitt und Deckgläschen bedeckt.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit dem Mikroskop BX51 (Olympus) und der Software cell^F 2.5. Bei 10-facher Vergrößerung wurden Bilder der Schnitte angefertigt und mit der Software ein Gitter mit Linien im Abstand von 200 µm eingefügt. Daraus ergaben sich Felder mit einer Größe von 0,04 mm². Pro Tier wurden in vier zufällig ausgewählte Felder in zwei unterschiedlichen Schnitten die Adipozytenanschnitte ausgezählt und aus den Werten der Mittelwert errechnet. Durch Division der Fläche (0,04 mm²) durch die Zahl der Zellanschnitte wurde die durchschnittliche Zellgröße errechnet.

2.2.2.3. Immunhistochemische Färbung

Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte wie unter 2.2.2.2. beschrieben mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe vorbehandelt. Um Epitope, die durch die Fixierung denaturiert wurden, wieder für den primären Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Schnitte 10 min mit einer 90 °C heißen, 10 mM Natrium-citralösung (pH 6) behandelt und dann erneut in PBS gewaschen. Zur Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität wurde das Gewebe 10 min mit 40 % Methanol und 1 % H_20_2 behandelt und danach mit PBS gewaschen.
Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen und so unspezifische Reaktionen der sekundären Antikörper zu minimieren, wurden die Schnitte 1:00 h in Blockinglösung (5 % Serum, 0,3 % Triton-X-100 in PBS) inkubiert. Es wurde jeweils Serum des Tieres, von dem der sekundäre Antikörper stammte, verwendet. Vor Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen. Die primären Antikörper wurden in PBS mit 3 % Serum verdünnt und jeder Schnitt wurde mit 200 µl der Antikörperlösung benetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nach weiteren Waschschritten mit PBS folgte die Inkubation mit den biotinmarkierten, sekundären Antikörpern, die im Verhältnis 1:200 in PBS und 1,5 % Serum verdünnt wurden. Die Inkubation erfolgte über 1:00 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Es folgten drei weitere Waschschritte mit PBS.

***Tabelle 3 Übersicht der primären Antikörper**, die für die immunhistochemische Färbung des Fettgewebes verwendet wurden mit Angabe des Antigens und der eingesetzten Verdünnung.*

Primärer Antikörper	Antigen	Verdünnung in PBS und 3 % Serum
Rabbit IgG polyclonal to GLUT 4	GLUT 4	1:1000
Purified Mouse IgG Anti-Rab11	Rab11	1:1000, 1:500, 1:200
Mouse IgG 2B4 Anti-Huntingtin	Huntingtin	1:200

***Tabelle 4 Übersicht der sekundären Antikörper**, die für die immunhistochemische Färbung des Fettgewebes verwendet wurden mit Angabe des Antigens und des verwendeten Serums. Die Verdünnung betrug 1:200.*

Sekundärer Antikörper	Antigen	Verwendetes Serum
Biotinylated Goat Anti-Rabbit-IgG	Kaninchen IgG	Ziege
Biotinylated Horse Anti-Mouse-IgG	Maus IgG	Pferd

Danach wurden die Schnitte 30 min mit der ABC-Arbeitslösung behandelt. Der darin enthaltene Avidin-Peroxidase-Komplex (Hsu u. Raine 1981) bindet während der Inkubation an das Biotin der sekundären Antikörper. Zur Detektion wurden je eine Tablette Sigma Fast® DAB und Sigma Fast® Urea + H_20_2 in H_20 gelöst und als Substrat für die Peroxidasereaktion auf die Schnitte pipettiert. Nach 10 min zeigte die Farbreaktion die gewünschte Intensität. Die DAB-Lösung wurde von den Schnitten entfernt und die Schnitte mit PBS gewaschen.

Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurden die Schnitte kurz mit Hämalaun gefärbt und danach unter fließenden Wasser gespült. Am Ende wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe 2.2.2.2.) entwässert und mit Eukitt und Deckgläschen bedeckt.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit dem Mikroskop BX1 (Olympus) und der Software cell^F 2.5. Bei 10-, 40-, bzw. 100-facher Vergrößerung wurden Bilder von repräsentativen Ausschnitten angefertigt.

2.2.3. SDS-PAGE und Western Blot

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteingemische durch Elektrophorese in einem SDS-haltigen Acrylamidgel anhand des Molekulargewichtes aufgetrennt (Laemmli 1970). Anschließend werden die Proteine im Western-Blot-Verfahren durch elektrophoretischen Transfer auf eine PVDF-Membran übertragen (Towbin et al. 1979). Der spezifische Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgt durch eine Antikörperreaktion. Zunächst werden die Proteine mit einem spezifischen primären Antikörper markiert. An den primären Antikörper bindet dann der sekundäre Antikörper, an den das Enzym Meerrettichperoxidase gebunden ist. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol zu 3-Aminophthalat (Frey et al. 2007). Die dabei freiwerdende Chemilumineszenz ist proportional zur Menge des gebunden Antikörpers und kann mit einer CCD-Kamera detektiert und quantifiziert werden.

2.2.3.1. Herstellung von Proteinlysat aus Fettgewebe

Die bei -80 °C gelagerten Gewebeproben wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen (1,5 ml) auf Eis aufgetaut. Pro 100 mg Gewebe wurden 500 µl gekühlter Lysepuffer zu den Proben gegeben und dann das Gewebe mit Hilfe des Ultra Turrax T8 auf Stufe 6 mechanisch zerkleinert. Um das Lysat von Zellkernen zu befreien und um das herausgelöste Fett abzutrennen, wurde es 10 min bei 16 000 *g* und 4 °C zentrifugiert. Das Fett bildete nach der Zentrifugation eine klar abgegrenzte Schicht über dem Lysat, das mit Hilfe einer Kanüle unter der Fettschicht abgesaugt und in frische Eppendorfreaktionsgefäße überführt wurde. Um letzte Fettreste abzutrennen, wurde die Zentrifugation wiederholt (Dreja 2009). Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung mit dem BCA-Assays beruht auf der Bildung eines violetten Farbkomplexes aus BCA und Cu^{+}. Die Intensität der Farbreaktion ist dabei abhängig von der Proteinkonzentration (Smith et al. 1985) und kann mit Hilfe eines Photometers anhand der Absorption bei 570 nm bestimmt werden. Die Reaktion kann durch Substanzen, die Ionenkomplexe bilden, wie z.B. EDTA,

gestört werden. Die EDTA-Konzentration im verwendenden Lysepuffer ist mit 1 mM aber so gering, dass die Reaktion nicht beeinträchtigt wird (Smith et al. 1985).

Zunächst wurden Standardlösungen mit den folgenden Proteinkonzentrationen hergestellt: 0,0 mg/ml; 0,8 mg/ml, 1,6 mg/ml; 3,2 mg/ml, 6,4 mg/ml; 12,8 mg/ml. Dazu wurde BSA in den entsprechenden Konzentrationen in Lysepuffer gelöst. In einer 96 Well-Platte wurden zunächst pro Well 5 µl Standardlösung bzw. Proteinlysat vorgelegt. Anschließend wurden Bicinchoninsäure und eine 4 %ige Kupfer(II)-Sulfatlösung im Verhältnis 50:1 gemischt und in jedes Well 200 µl der Mischung pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption der Proben bei 570 nm mit dem ELX Universal 800 UV Mikroplate Reader bestimmt. Anhand der Standardwerte wurde eine Standardkurve erstellt und die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese

Anhand der Proteinkonzentration wurde für jede Probe die benötigte Lysatmenge für 15 µg Protein errechnet. Das Lysat wurde dann mit 3,33 µl 6-fach Ladepuffer versetzt und mit Lysepuffer auf 20 µl aufgefüllt. Die Endkonzentration betrug so in allen Proben 0,75 µg/µl Protein. Für die Gelelektophorese wurden pro Tasche 15 µl Probe bzw. 11,25 µg Protein auf das Elektrophoresegel aufgetragen.

2.2.3.2. Gelelektrophorese und Transfer

Das Molekulargewicht von GLUT4 liegt bei ca. 50 kDa. Für eine optimale Auftrennung der Proteine in diesem Bereich wurden bei Experimenten zum GLUT4-Gehalt 12 %ige Acrylamidgele verwendet (Dechert 2007). Das Molekulargewicht des Huntingtin-Proteins liegt bei etwa 350 kDa (Cattaneo et al. 2005). Zum Huntingtin-Nachweis im Fettgewebe wurden, entsprechend dem hohen Molekulargewicht des Proteins, 5 %ige Acrylamidgele verwendet.

Herstellung der Gele

Zunächst wurden die Glasplatten zum Gießen der Gele gereinigt und in das Halterungssystem eingespannt. Dann wurde das Trenngel gemischt und zwischen

die Glasplatten gegossen. Um die Oberfläche zu glätten, wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Sobald das Trenngel fest war, wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und die Kämme als Platzhalter für die Geltaschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren bei Raumtemperatur wurden die Gele für die Elektrophorese verwendet.

Gelelektrophorese

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit Elektrodenpuffer aufgefüllt. Die Platzhalter für die Taschen wurden entfernt und die Taschen mit Elektrodenpuffer gespült. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben in die Taschen pipettiert (15 µl Probe bzw. 11,25 µg Protein pro Tasche). In eine der Randtaschen wurde ein gefärbter Größenmarker pipettiert.
Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel und einer Spannung von maximal 150 V.

Transfer

Der Transfer erfolgte im Wet-Blot-Verfahren mit einem Wet-Blot-Transfersystem. Zunächst wurde die PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten, in Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert. Die Gele wurden aus der Elektrophoresekammer genommen, von den Glasplatten gelöst und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert.

Zum Zusammenbau der Wet-Blot-Apparatur wurde zunächst ein puffergetränktes Schwämmchen auf das Gitter der aufgeklappten Transferkassette gelegt, dann folgten ein getränktes Filterpapier und das Gel. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt und mit Filterpapier und einem weiteren Schwämmchen bedeckt. Dann wurde das „Sandwich“ mit dem zweiten Gitter bedeckt und die Transferkassette verriegelt. Pro Transferkammer wurden zwei Transferkassetten eingesetzt und die Kammer dann mit Transferpuffer aufgefüllt. Das Gel zeigte dabei zur Kathode, die Membran zur Anode. Der Transfer erfolgte über 1:30 h bei 150 mA und einer Spannung von maximal 35 V.

2.2.3.3. Proteinfärbung mit MemStain

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge der einzelnen Banden und zur Kontrolle des Transfers wurde das MemCode®-Kit zur reversiblen Proteinfärbung verwendet (Antharavally et al. 2004). Die MemStain-Färbung eignet sich aufgrund ihres Färbeverhaltens zur Quantifizierung der geblotteten Proteinmenge (Tang et al. 2009).

Vor der Färbung wurden die Membranen kurz in Methanol äquilibriert und dann nacheinander je 2 min mit der Sensitizerlösung und der Färbelösung inkubiert, bis die Bandenfärbung die gewünschte Intensität zeigte. Durch Waschen mit Destainlösung wurde die unspezifische Hintergrundfärbung entfernt. Anschließend wurden die Membranen getrocknet. Nach dem Trocknen wurden von den Membranen mit der CCD-Kamera Graustufenbilder angefertigt. Danach wurden die Membranen mit Methanol reaktiviert, mit Eraserlösung entfärbt und für den spezifischen Proteinnachweis verwendet.

2.2.3.4. Spezifischer Proteinnachweis

Um alle Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran abzusättigen und so unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Membranen zunächst 1:00 h bei Raumtemperatur in 5 % Trockenmilchpulver in TBS-T inkubiert.

Danach folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Die Antikörper wurden dazu in TBS-T mit 5 % Milchpulver verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlraum (8 °C). Pro Membran wurden ca. 5 ml verdünnte Antikörperlösung eingesetzt. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal 10 min in TBS-T gewaschen und dann mit den HRP-konjungierten sekundären Antikörpern inkubiert. Diese wurden ebenfalls in TBS-T mit 5 % Milchpulver verdünnt. Die Inkubation erfolgte über 1:00 h bei Raumtemperatur. Vor der Detektion des Antikörpersignales durch Chemilumineszenz wurden die Membranen erneut dreimal 10 min in TBS-T gewaschen.

Tabelle 5 Übersicht der primären Antikörper, *die zur Proteindetektion im Western Blot verwendet wurden mit Angabe von Antigen, Molekulargewicht des detektierten Proteins in Kilodalton (kDa) und der eingesetzten Verdünnung.*

Primärer Antikörper	**Antigen**	**Molekular-gewicht (kDa)**	**Verdünnung**
Rabbit IgG polyclonal to GLUT 4	GLUT 4	50	1:3000
Purified Mouse IgG Anti-Rab11	Rab11	24	1:2000
Mouse IgG Anti-Huntingtin Protein (MAB 2166)	Huntingtin	348	1:1000
Mouse IgG Anti-Na^+K^+ATPase-alpha-1	Na^+K^+ATPase	100	1:2000
Monoclonal Anti-β-Tubulin I	β-Tubulin I	55	1:20000

Tabelle 6 Übersicht der sekundären Antikörper*, die zur Proteindetektion im Western Blot eingesetzt wurden mit Angabe der verwendeten Verdünnung.*

Sekundärer Antikörper	**Antigen**	**Verdünnung**
Goat-Anti-Rabbit HRP-conjugated	Kaninchen IgG	1:2500
Goat-Anti-Mouse HRP-conjugated	Maus IgG	1:2500

Detektion des Antikörpersignals

Die ECL-Arbeitslösung wurde vor jeder Detektion frisch angesetzt. Dazu wurden das ECL-Substrat und die Verstärkerlösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Membran wurde auf eine Teflonplatte gelegt und gleichmäßig mit 1,5 ml ECL-Arbeitslösung benetzt. Nach kurzer Inkubation wurde die freigesetzte Chemilumineszenz mit der CCD-Kamera detektiert. Zusätzlich wurde ein Bild des Größenmarkers angefertigt, um das Molekulargewicht des detektierten Proteins und damit die Spezifität der Antikörperreaktion zu überprüfen.

Quantifizierung der Proteinmenge

Die Intensität der Banden sowie die Intensität der MemStain-Färbung wurde mit der Software ImageQuant detektiert. Der Wert der Proteinbande aus der

spezifischen Nachweisreaktion wurde durch die Gesamtproteinmenge, die anhand der MemStain-Färbung ermittelt wurde, dividiert. Anschließend wurden die Mittelwerte der zu vergleichenden Gruppen (Wildtyp - transgen bzw. weiblich - männlich) errechnet. Zur einfacheren Darstellung und um die Versuche vergleichbar zu machen, wurden alle Werte auf den Mittelwert der Wildtypproben normiert. Wurden weibliche und männliche Tiere verglichen, so diente der Mittelwert der weiblichen Tiere als Referenz.

2.2.4. Subfraktionierung insulinstimulierter Gewebeproben

Weißes Fettgewebe kann nach der Präparation bis zu zwei Wochen *in vitro* kultiviert und für Stoffwechselversuche verwendet werden. Das Ansprechen auf hormonelle Stimulation bleibt während dieser Zeit erhalten (Fried u. Moustaid-Moussa 2001). Anschließend kann das hormonstimulierte Fettgewebe durch differentielle Ultrazentrifugation in die Plasmamembranfraktion (PM) und die Fraktion der „low density microsomes“ (LDM) aufgetrennt werden (Thamotharan et al. 2003). Die Proteinzusammensetzung der unterschiedlichen Kompartimente kann dann durch Western Blot verglichen werden und so z.B. die insulininduzierte GLUT4-Translokation dargestellt werden (Joost u. Schürmann 2001).

2.2.4.1. Organkultur und Insulinstimulation

Für die Organkultur wurde das epididymale Fettgewebe direkt nach der Präparation in gekühltem Organkulturmedium M199 gesammelt. Um eine ausreichende Gewebemenge zu erhalten, wurde das epididymale Fettgewebe von mindestens vier Mäusen vereinigt. Zur Vermeidung von Gewebsnekrosen wurde das Gewebe zügig unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet.
Zunächst wurden die Proben mit einer sterilen Schere in ca. 5-10 mg schwere Fragmente zerkleinert. Bei dieser Größe ist die Versorgung der gesamten Gewebefragmente über das Kulturmedium gesichert (Fried u. Moustaid-Moussa 2001). Anschließend wurde das Gewebe mit PBS gewaschen. Dazu wurde steriles Nylonsiebgewebe auf einem Trichter befestigt. Die Gewebefragmente wurden auf das Siebgewebe gegeben und mit ca. 200 ml PBS gespült. Danach wurde das Gewebe gewogen und auf Petrischalen (Ø 9,4 cm) verteilt. Pro Schale wurden

800 - 900 mg Fettgewebe und 25 ml M199 eingesetzt. Um für die Insulinstimulation einen metabolischen Basalzustand des Gewebes zu erreichen, wurden die Gewebeproben 24 h bei 37 °C unter 5 %iger CO_2-Atmosphäre im Inkubator kultiviert.

Insulinstimulation der Gewebeproben:
Nach 24 h wurde das Kulturmedium aus den Petrischalen abgesaugt und durch Kulturmedium mit 10 nM Insulin (Fain et al. 2001) ersetzt. Für die unstimulierten Kontrollproben wurde frisches M199 ohne Insulinzusatz verwendet. Die Inkubation der Proben erfolgte über 30 min bei 37 °C. Danach wurde das Kulturmedium zügig entfernt, die Gewebeproben in Eppendorfgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bis zur Subfraktionierung bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2. Subfraktionierung der Gewebeproben durch Ultrazentrifugation

Die gefrorenen Organkulturproben wurden in 50 ml Falconröhrchen überführt. Pro Probe wurde 15 ml gekühlter TES-Puffer dazugegeben und die Proben mit dem Ultra Turrax T18 auf Stufe 4 15 sec lang homogenisiert. Das Lysat wurde in einen Gewebehomogenisator gegeben und durch 10 Stöße mit einem Teflonpistill weiter fragmentiert. Dann folgte die Zentrifugation nach dem in Abb. 2 dargestellten Schema. Die Zentrifugationsschritte bei 16 000 *g* und 48 000 *g* erfolgten in der Sorvall RC 5C Zentrifuge mit dem Rotor SS34. Für die Ultrazentrifugationsschritte wurden die Beckmann Optima XL 90 Ultrazentrifuge und der Rotor SW 40 T1 verwendet.

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Pellets in 100 µl RIPA-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 16 000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde wie unter Punkt 2.2.4. beschrieben für Western Blot verwendet. Aufgrund der geringeren Ausbeute an Proteinen lag die Proteinkonzentration in den vorbereiteten Proben vor dem Auftragen bei 0,18 µg/µl. Es wurden Gele mit 10 Taschen verwendet und ein Probevolumen von 25 µl pro Tasche aufgetragen. Die aufgetragene Proteinmenge pro Tasche lag damit bei 4,5 µg.

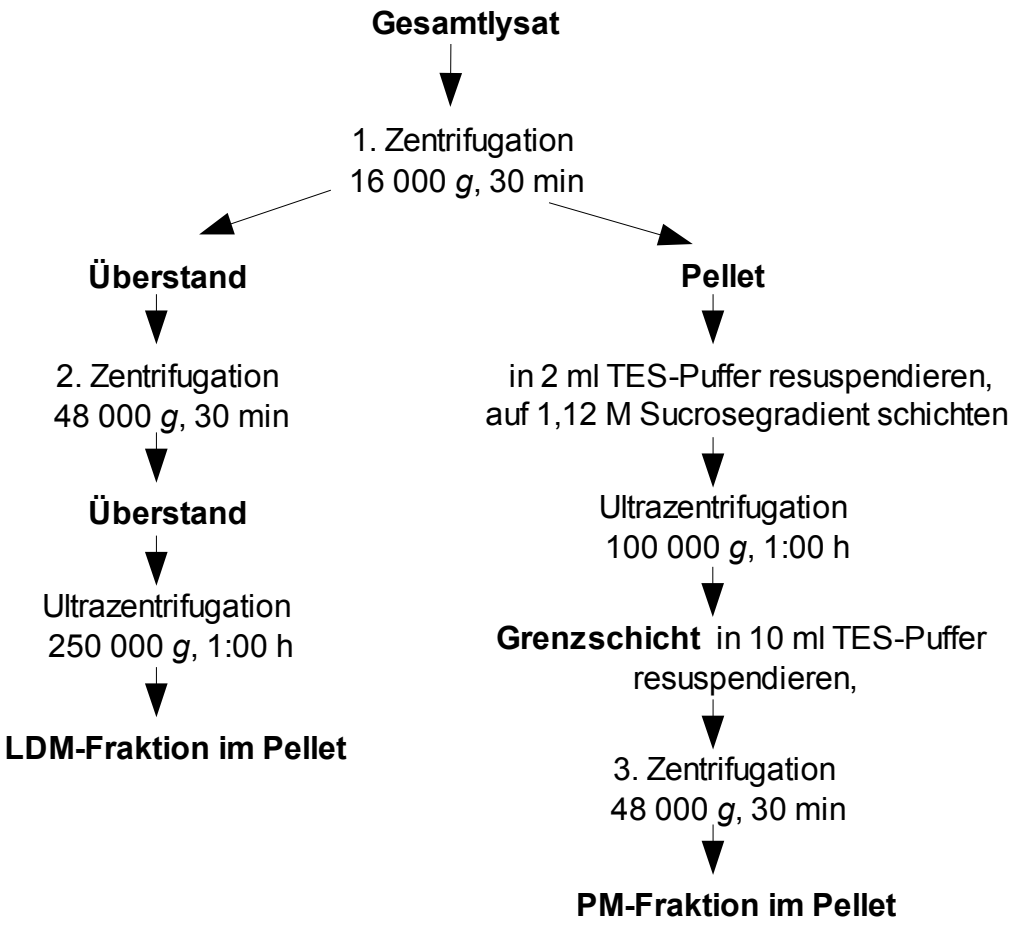


Abbildung 2 Zentrifugationsschema für die Subfraktionierung von weißem Fettgewebe. *Durch die Zentrifugationsschritte erfolgt eine Auftrennung des Gesamtlysats in die Plasmamembran- (PM) und die low density microsome-Fraktion (LDM). TES= Tris-EDTA-Sucrose, g= Erdbeschleunigung (Thamotharan et al. 2003).*

2.2.4.3. Auswertung

Zur Kontrolle der Reinheit der beiden Fraktionen diente der Nachweis von Na^+K^+-ATPase in der Plasmamembranfraktion. Ein kleiner Anteil des Proteins in der LDM-Fraktion wurde toleriert, da die Na^+K^+-ATPase nach der Translation über das mikrosomale System zur Membran transportiert wird und dadurch die Membranproteine immer auch in der LDM-Fraktion nachweisbar sind (Rehm 2006). Die insulininduzierte GLUT4-Translokation wurde durch den Vergleich des GLUT4-Gehaltes in den unterschiedlichen Fraktionen dargestellt (Joost u. Schürmann 2001). Als Referenzwert diente der GLUT4-Gehalt in der Wildtyp-PM-Fraktion im Basalzustand.

2.2.5. Adipozytenkultur

Aus weißem Fettgewebe lassen sich fibroblastenähnliche Adipozytenvorläuferzellen gewinnen. Diese Präadipozyten können durch den Zusatz adipogener Faktoren im Kulturmedium zu Adipozyten differenziert werden (Hauner et al. 1989).

2.2.5.1. Präadipozytenisolation aus epididymalem Fettgewebe

Die Präparation des Fettgewebes erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Gewebeproben wurden in DMEM gesammelt. Um eine ausreichende Menge an Fett zu erhalten, wurde dabei das Gewebe von drei bis vier Tieren gepoolt. Anschließend wurde das Gewebe in 50 ml Falconröhrchen überführt und gewogen.

Um die Zellen zu vereinzeln, wurde das Gewebe zunächst mit einer Schere mechanisch zerkleinert. Die weitere Vereinzelung erfolgte durch Behandlung des Gewebes mit Kollagenase IV. Pro Gramm Gewebe wurden dazu 3 ml 0,15 %ige Kollagenaselösung eingesetzt und das Gewebe darin 1:00 h bei 37 °C im Wasserbad verdaut. Danach wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb (Porengröße 100 µm) gefiltert und anschließend 10 min bei 400 *g* zentrifugiert. Der Überstand mit den adulten Adipozyten und der Kollagenaselösung wurde verworfen. Das Pellet wurde in Erythrozytenlysepuffer (Hauner et al. 1989) resuspendiert und darin 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 400 *g* für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die aufgereinigten Zellen in 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Um letzte Verunreinigungen zu entfernen, wurde die Zellsuspension erneut durch ein Zellsieb (30 µm Porengröße) gefiltert. 20 µl der Zellsuspension wurden für die Bestimmung der Zellzahl mit Trypanblau angefärbt. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in 75 cm² Zellkulturflaschen in Basalmedium ausgesät.

Nach 24 h erfolgte die Aussaat in 12- bzw. 24-Well-Zellkulturplatten. Dazu wurde zunächst das Medium aus den Flaschen abgesaugt und die Zellen mit PBS

gewaschen. Die adhärenten Präadipozyten wurden mit 0,25 %iger Trypsinlösung aus den Flaschen gelöst. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 4 ml Basalmedium pro Flasche abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in 15 ml Falconröhrchen überführt, 10 min bei 400 *g* abzentrifugiert und das Pellet in 0,5 ml Kulturmedium resuspendiert. Durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen mit einer Dichte von 6 900 Zellen/ cm² in 12- oder 24-Well-Platten ausgesät.

2.2.5.2. Adipogene Differenzierung der isolierten Zellen

Am 3. Tag nach der Aussaat (Tag 1 der adipogenen Differenzierung) wurde das Basalmedium durch Differenzierungsmedium ersetzt. Nach 48 h fand ein weiterer Mediumwechsel statt und die Zellen wurden in Erhaltungsmedium weiter kultiviert. Am 7. Tag nach Zugabe des Differenzierungsmediums war die adipogene Differenzierung der Zellen abgeschlossen.

Tabelle 7 Zeitverlauf der adipogenen Differenzierung: *Die Vorläuferzellen, die aus dem weißen Fettgewebe der Versuchstiere isoliert wurden, differenzieren sich durch adipogene Faktoren im Medium innerhalb von 7 Tagen zu reifen Adipozyten.*

Tag -3	Tag -2	Tag -1	Tag 1	Tag 2	Tag 3	...	Tag 7
Aussaat			Differenzierungs-medium		Erhaltungs-medium		Start der Versuche

Bestimmung der Differenzierungsrate

Bevor die Zellen für die weiteren Versuche eingesetzt wurden, wurde die Differenzierungsrate bestimmt. Dies erfolgte durch Zählen der Zellen bei 10-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Fischer-Posovszky et al. 2010). Dabei wurden in einem Gesichtsfeld mit einer Fläche von 1 mm² die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl differenzierter Adipozyten bestimmt. Um repräsentative Werte zu erhalten, wurden drei zufällig ausgewählte Gesichtsfelder in drei unterschiedlichen Wells ausgezählt und anschließend der Mittelwert errechnet. Um die Adipozytenzahl in den 3,6 cm² großen Wells zu errechnen, wurden die Mittelwerte für die 1 mm² großen Gesichtsfelder mit dem Faktor 360 multipliziert.

2.2.5.3. Oil-Red-Färbung

Mit dem lipophilen Farbstoff Oil Red O können selektiv Lipide in formalinfixierten Zellen angefärbt werden (Hauner et al. 2001). Zunächst wurden die Zellen dazu mit 10 %iger PFA Lösung eine Stunde lang bei Raumtemperatur fixiert. Nach Abschluss der Fixierung wurden die Zellen kurz mit 60 %igem Isopropanol gewaschen und getrocknet. Sobald die Wells komplett abgetrocknet waren, wurden 500 µl Oil-Red-Arbeitslösung in jedes Well gegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbelösung entfernt und Farbreste unter fließendem Wasser abgespült. Die gefärbten Zellen wurden bei Raumtemperatur getrocknet und unter dem Durchlichtmikroskop fotografiert.

2.2.5.4. Triglyceridbestimmung

Die Triglyceridbestimmung setzt sich aus mehreren enzymatischen Reaktionen zusammen. Im ersten Schritt spaltet eine Lipase die gelösten Triglyceride in Glycerin und freie Fettsäuren. Das freigesetzte Glycerin reagiert dann in mehreren enzymatisch katalysierten Schritten zu Dihydroxyacetonphosphat und H_2O_2. Im letzten Schritt reagiert dann das H_2O_2 mit 4-AAP und ESPA zu einem roten Farbstoff, der bei 540 nm im Photometer quantifiziert werden kann. Die Menge des Farbstoffes ist linear zur Glycerinkonzentration (Fossati u. Prencipe 1982).

Im ersten Schritt wurden die Triglyceride mit 500 µl Hexan/ Isopropanol (Verhältnis 3:2) pro Well aus den Zellen gelöst. Um die Triglyceride möglichst vollständig zu lösen wurde der Vorgang dreimal mit frischem Lösungsmittel wiederholt und das Lösungsmittel in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Zur Vermeidung von Fehlern durch unterschiedliche Lösungsmittelmengen, die durch Verdampfen entstehen, wurde das ursprüngliche Lösungsmittel zunächst komplett bei 30 °C verdampft und anschließend die Proben in 100 µl Isopropanol (100 %) resuspendiert.

Zur Herstellung einer Standardkurve wurde Glycerinstandardlösung mit 100 % Isopropanol verdünnt. Als Standardkonzentration wurden 130 µg/ml, 65 µg/ml, 32,5 µg/ml, 16,25 µg/ml, 8,13 µg/ml, 4,06 µg/ml und 0 µg/ml Glycerin eingesetzt.

Die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte. Dazu wurden 10 µl der Standard- bzw. Probelösung pro Well vorgelegt. Anschließend wurden 200 µl der Arbeitslösung (Free Glycerol Reagent und Triglyceride Reagent im Verhältnis 4:1) dazugegeben und die Platte bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Während dieser Zeit bildete sich der rote Farbstoff, der im Photometer bei 540 nm quantifiziert wurde. Anhand der Glycerinstandardkurve wurde die Glycerinkonzentration in den Proben errechnet.

Die Umrechnung von der Glycerin- auf die Triglyceridkonzentration erfolgte durch Multiplikation der Glycerinkonzentration mit dem Faktor 9,615. Da es bereits durch die unterschiedlichen Differenzierungsraten von Wildtyp- und transgenen Zellen zu Unterschieden im Triglyceridgehalt kommen kann, wurde die Triglyceridmenge pro 10^4 Adipozyten errechnet. Um Proben aus unterschiedlichen Zellisolationen vergleichen zu können, wurde zusätzlich der relative Triglyceridgehalt berechnet. Dazu wurden alle Werte in Bezug zum mittleren Triglyceridgehalt der Wildtypproben aus der jeweiligen Isolation gesetzt.

2.2.5.5. Immunzytochemische Färbung nach Insulinstimulation

Für die immunzytochemische Färbung wurden die Präadipozyten in 24-Well-Platten auf Deckgläschen ausgesät und adipogen differenziert. Nach Abschluss der Differenzierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Medium gegen Basalmedium ausgetauscht. 24 h später erfolgte die Insulinstimulation mit 10 nM Insulin in DMEM:F12 über 15 min bei 37 °C. Für die unstimulierten Kontrollproben wurde DMEM:F12 mit 1 µM HCl verwendet, die HCl-Konzentration entsprach damit der HCl-Konzentration im Stimulationsmedium.

Um die zellulären Transportvorgänge abzustoppen, wurden die Zellen nach der Stimulation sofort auf Eis gekühlt und mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 4 %iger PFA-Lösung (500 µl/Well). Nach Entfernen des PFAs wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann für die Färbung verwendet. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen und um die Zellen zu permeabilisieren, wurden die Zellen nach der Fixierung 1:00 h mit Blockinglösung (1 % BSA, 5 % Eselserum, 0,1 % Triton X-100 in PBS) behandelt.

Danach erfolgte über Nacht die Inkubation mit dem Erstantikörper, der in PBS mit 1 % BSA und 1,5 % Eselserum verdünnt wurde.

Tabelle 8 Übersicht der primären und sekundären Antikörper, *die für die immunzytochemische Färbung von Adipozyten verwendet wurden mit Angabe des Antigens und der eingesetzten Verdünnung.*

Antikörper	Antigen	Verdünnung
Rabbit IgG polyclonal to GLUT 4	GLUT 4	1:1000
Polyclonal Antibody to Rab11A	Rab11	1:150 und 1:300
DyLight ™ 488-conjugated Donkey Anti-Rabbit IgG	Kaninchen IgG	1:500
DyLight ™ 549-conjugated Donkey Anti-Rabbit IgG	Ziegen IgG	1:500

Nach drei Waschschritten mit PBS (je 10 min) erfolgte die Inkubation mit dem fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper, der ebenfalls in PBS mit 1 % BSA und 1,5 % Eselserum verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt über 1:00 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit 3 nM DAPI angefärbt. Nach einem letzten Waschschritt mit PBS wurden die Glasplättchen mit Mowiol auf Objektträger geklebt.

Die Darstellung der gefärbten Zellen erfolgte bei 40-facher Vergrößerung mit dem konfokalen Lasermikroskop LSM 710 und der Zen 2011 Software. Bei allen Aufnahmen wurden die gleichen Aufnahmeparameter verwendet.

2.2.6. *In-vitro*-Untersuchung des Zellstoffwechsels

Am 7. Tag nach Beginn der Differenzierung wurden die Zellen für die Messung der Glukoseaufnahme und der Lipogenese vorbereitet. Um einen metabolischen Basalzustand der Zellen zu erreichen, wurde das Erhaltungsmedium gegen serum- und hormonfreies Basalmedium ausgetauscht und die Zellen darin weitere 24 h kultiviert (Fischer-Posovszky et al. 2010). Das Erhaltungsmedium wurde zur Bestimmung des Glyceringehaltes gesammelt.

2.2.6.1. Messung der Glukoseaufnahme

Die Glukoseaufnahme in Adipozyten kann mithilfe von ^{14}C-DOG, einem β-Strahler, bestimmt werden (Fischer-Posovszky et al. 2010). Die ^{14}C-DOG wird dabei von den Zellen aufgenommen, kann aber nicht weiter metabolisiert werden. So sammelt sich radioaktive ^{14}C-DOG in den Zellen. Durch Messung der abgegebenen β-Strahlung kann die in die Zellen aufgenommene Glukosemenge quantifiziert werden. Durch Zugabe von Insulin in unterschiedlichen Konzentrationen kann die Glukoseaufnahme in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration bestimmt werden.

Vor der Insulinstimulation wurde das Basalmedium gegen 850 µl KRH-Puffer pro Well ausgetauscht. Dann erfolgte die Zugabe des Insulins in den folgenden Konzentrationen: 0 M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M. Alle Insulinkonzentrationen wurden als Tripletts getestet.
Nach dem Insulinstimulus wurden die Zellen 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden je 50 µl DOG-Gebrauchslösung pro Well hinzugefügt und die Zellen weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Endkonzentration in den Wells betrug so 0,2 µCi/ml ^{14}C-DOG und 100 µM DOG. Nach der Inkubation wurde der Puffer abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 0,1 M NaOH (2 ml/Well) suspendiert und in Szintillationsröhrchen, die mit je 8 ml Szintillationslösung befüllt waren, überführt. Die Messung der β-Strahlung erfolgte durch das Isotopenlabor der Universität Ulm mit einem β-Zähler. Die Werte wurden als „counts-per-minute“ (cpm) angegeben und anhand der Differenzierungsraten auf 10^4 Adipozyten normalisiert.

2.2.6.2. De-novo-Lipogenese

Zur Messung der De-Novo-Lipogenese werden ausdifferenzierte Adipozyten über 24 h mit ^{14}C-markierter Glukose behandelt. Während der Inkubationszeit synthetisieren die Adipozyten aus der radioaktiven Glukose neue Lipide, die dann ebenfalls mit dem β-Strahler ^{14}C markiert sind. Anhand der β-Strahlung, die anschließend in den Proben gemessen wird, können Rückschlüsse auf die Menge an neu synthetisierten Lipiden gezogen werden (Grigem et al. 2005).

Zur Messung der Lipogenese bei unterschiedlichen Insulinkonzentrationen wurden die Zellen in 1 ml Basalmedium pro Well kultiviert und mit Insulin (0 M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M) stimuliert. Alle Insulinkonzentrationen wurden als Tripletts getestet. Dann wurden pro Well 10 µl der ^{14}C-Glukoselösung hinzugegeben. Die Endkonzentration betrug so 0,1 µCi pro Well. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.
Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,1 M NaOH (2ml/Well) aus den Kulturplatten gelöst und in Szintillationsröhrchen überführt. Die Röhrchen enthielten je 8 ml lipophile Szintillationslösung, durch die die Lipide aus den Zellen gelöst wurden. Die Messung der von den Proben abgegebenen β-Strahlung erfolgte durch das Isotopenlabor der Universität Ulm. Die cpm-Werte wurden auf cpm/ 10^4 Adipozyten umgerechnet.

2.2.6.3. Basale Lipolyse

Durch die Bestimmung des freien Glycerins im Medium kann die lipolytische Aktivität der Adipozyten beurteilt werden (Fischer-Posovszky et al. 2008). Das Prinzip der enzymatischen Glycerinbestimmung ist unter Punkt 2.2.5.4. beschrieben.

Nach Abschluss der adipogenen Differenzierung wurde das Medium in Eppendorfcups gesammelt. Vor der Bestimmung wurden die Proben mit frischem Erhaltungsmedium im Verhältnis 1:2 verdünnt und eine Standardreihe mit den folgenden Glycerinkonzentrationen hergestellt: 5,5 µM, 10,9 µM, 21,9 µM, 43,8 µM, 87,5 µM, 175 µM, 350 µM. Dazu wurde die Glycerinstandardlösung in Erhaltungsmedium verdünnt.

Die Messung erfolgte in einer 96-Well-Platte. Pro Well wurden zunächst 100 µl Standardlösung bzw. 100 µl der Probe vorgelegt und anschließend 100 µl Free Glycerol Reagent hinzugegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben bei 540 nm photometrisch bestimmt und anhand der Standardkurve die Glycerinkonzentration der Proben errechnet. Die Glycerinkonzetration wurde auf 10^4 Adipozyten normalisiert

2.2.7. Statistische Methoden

Die Berechnung des Anteils der Fettdepots am Körpergewicht, die Normierung des Proteingehalts auf die Referenzproben, die Berechnung der Differenzierungsraten und die Umrechnung der Werte aus den Stoffwechselversuchen auf 10^4 Adipozyten erfolgte mit dem Open Office Calculator.

Die weitere statistische Auswertung und die Erstellung der Graphiken erfolgte mit GraphPad Prism® Version 5.00. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

Bei den Daten zu Körpergewicht, Adipozytengröße, Expression von GLUT4 und Rab11, Proteingehalt in der PM- und LDM-Fraktion nach der Subfraktionierung, Triglyceridgehalt und Differenzierungsrate der primären Adipozyten wurde nicht von einer Normalverteilung der ungepaarten Proben ausgegangen und daher der Mann-Whitney-Test eingesetzt. Für die Analyse von Glukoseaufnahme und Lipogenese in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration wurde der two-way ANOVA-Test verwendet.
Für alle Experimente wurde als Signifikanzgrenze ein P-Wert < 0,05 festgelegt. P-Werte < 0,01 wurden als hoch signifikant und P-Werte < 0,001 als höchst signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Versuchstiere

3.1.1. Abschätzung der CAG-Wiederholungszahl im Exon 1

Um die Anzahl der CAG-Tripletts der untersuchten transgenen Tiere abschätzen zu können, wurden DNA-Proben mit Primern amplifiziert, die flankierend an das transgene Exon 1 binden. Als Referenz dienten Proben aus der ersten R6/2-Zuchtgeneration des Labors. Zusätzlich wurde eine Wildtypprobe und eine Wasserprobe aufgetragen, um die Spezifität der PCR-Reaktion zu überprüfen. Aus jeder der Mausgenerationen, die für die weiteren Versuche verwendet wurden, wurden zwei Tiere nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und die Länge der CAG-Wiederholungen bestimmt.

In den Gelspuren mit der Wasser- und der Wildtypprobe stellte sich kein PCR-Produkt im Gel dar. Das Fehlen eines PCR-Produktes in der Wildtypprobe zeigt, dass bei der PCR lediglich das transgene Exon 1, nicht aber das Exon 1 der endogenen Huntingtin-Allele, amplifiziert wurde.

Die PCR-Produkte der ersten R6/2-Zuchtgeneration zeigten eine Länge von ca. 410 bp. Die PCR-Produkte der Versuchstiere stellten sich deutlich verlängert mit einer Länge zwischen 850 und 950 bp dar. Für die erste R6/2-Generation ergab sich daraus eine errechnete Anzahl von ca. 110 CAG-Wiederholungen. Die Anzahl der CAG-Wiederholungen der Versuchstiere lag im Bereich zwischen 255 und 288. Da die CAG-Wiederholungszahl der Versuchstiere deutlich höher war als beim original R6/2-Mausmodell, werden die untersuchten Tiere im folgenden Abschnitt nicht mehr als „R6/2-Tiere“ sondern als „R6/2-Q300-Mäuse“ oder „transgen“ bezeichnet.

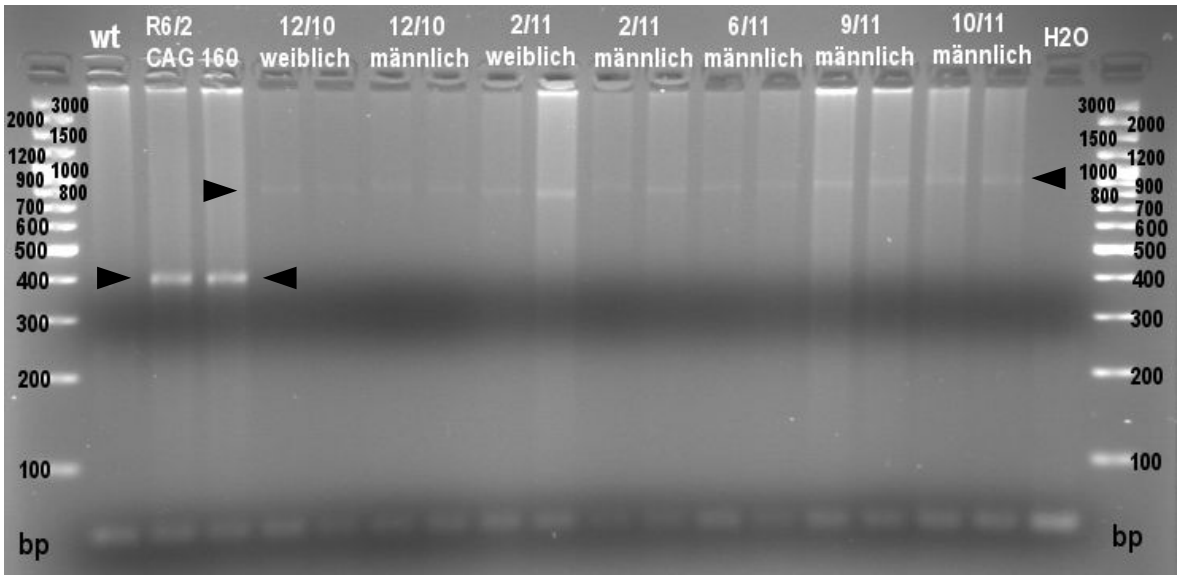


Abbildung 3 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Bestimmung der Anzahl der Cytosin-Adenin-Guanin (CAG)-Wiederholungen im Exon 1 der untersuchten R6/2-Mäuse. *Das Bild zeigt die PCR-Produkte (markiert durch Pfeile) nach Auftrennung im Agarosegel mit Größenmarker und Angabe der Größe in Basenpaaren (bp). Aus jeder untersuchten Mausgeneration wurden DNA-Proben von zwei zufällig ausgewählten Tieren amplifiziert. Die Daten in der obersten Zeile beziehen sich auf den Zeitpunkt (Monat/Jahr) der Präparation der Mausgeneration. In der zweiten und dritten Spur von links wurden als Referenz Proben von R6/2-Mäusen mit 160 CAG-Wiederholungen aufgetragen. Die Wildty- (wt) und Wasserprobe (H_2O) dienten zur Kontrolle der Spezifität der PCR-Reaktion.*

3.1.2. Körpergewicht und Fettdepotmasse

Zur Bestimmung von Körpergewicht und Fettdepotmasse wurden die Tiere bei der Präparation gewogen und das Gewicht der präparierten Fettdepots bestimmt. Die Daten mit Standardabweichung und der statistischen Auswertung mit dem Mann-Whitney-Test sind in Tabelle 9 dargestellt.

Im Alter von 8 Wochen bestand bei den männlichen Tieren kein signifikanter Unterschied zwischen den transgenen Mäusen und den Wildtyptieren. Die Masse der epididymalen Fettdepots und der prozentuale Anteil der Fettdepots am Körpergewicht waren jedoch bei den R6/2-Q300 Tieren tendenziell erhöht.

Bei den 12 Wochen alten, männlichen Tieren waren die R6/2-Q300 Mäuse mit durchschnittlich 22,72 g signifikant leichter als die Wildtyptiere, die im Mittel 27,87 g wogen ($P < 0,01$). Die absolute Fettdepotmasse war bei den transgenen Tieren tendenziell höher als bei den Wildtyptieren, der Unterschied war jedoch

nicht signifikant. Der prozentuale Anteil der Fettdepotmasse am Körpergewicht betrug bei den transgenen Tieren 1,9 % und war damit signifikant höher als bei den Wildtyptieren mit 1,22 % ($P < 0,05$).

Im Gegensatz zu den männlichen Tieren zeigte sich bei den weiblichen Mäusen im Alter von 12 Wochen kein signifikanter Unterschied bezüglich des Körpergewichts. Die Fettdepotmasse war jedoch mit durchschnittlich 0,53 g bei den R6/2-Q300-Weibchen deutlich höher als bei den Wildtypmäusen, bei denen die Fettdepotmasse durchschnittlich 0,25 g betrug ($P < 0,01$). Der prozentuale Anteil der Fettdepotmasse am Körpergewicht der transgenen Weibchen war ebenfalls signifikant höher als bei den Wildtyptieren.

Tabelle 9 Körpergewicht und Fettdepotmasse der Versuchstiere. *Bei der Präparation wurden das Körpergewicht (KG) und die Masse der gonadalen Fettdepots von Wildtyp- (wt) und transgenen (tg) Mäusen ermittelt und daraus der prozentualer Anteil der Fettdepots am KG errechnet. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Tiere (n) pro Gruppe und die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante (P < 0,05) und höchst signifikante P-Werte (P < 0,001) sind fett markiert.*

Alter und Geschlecht	**Genotyp**	**Körpergewicht (g)**	**Fettdepot (g)**	**(Fettdepot/ KG)·100**
8 Wochen männlich	wt *(n= 5)*	25,63 ± 1,24	0,20 ± 0,04	0,76 ± 0,12
	tg *(n= 6)*	24,61 ± 1,11	0,25 ± 0,09	1,02 ± 0,34
	P-Wert	*0,13*	*0,2*	*0,18*
12 Wochen männlich	wt *(n= 14)*	27,87 ± 1,93	0,35 ± 0,15	1,22 ± 0,45
	tg *(n= 12)*	22,72 ± 1,36	0,44 ± 0,17	1,9 ± 0,67
	P-Wert	***P < 0,001***	*0,18*	***0,015***
12 Wochen weiblich	wt *(n= 14)*	21,39 ± 1,33	0,25 ± 0,12	1,13 ± 0,46
	tg *(n= 14)*	20,68 ± 1,81	0,53 ± 0,19	2,55 ± 0,8
	P-Wert	*0,25*	***P < 0,001***	***P < 0,001***

3.2. Histologische Charakterisierung des Fettgewebes

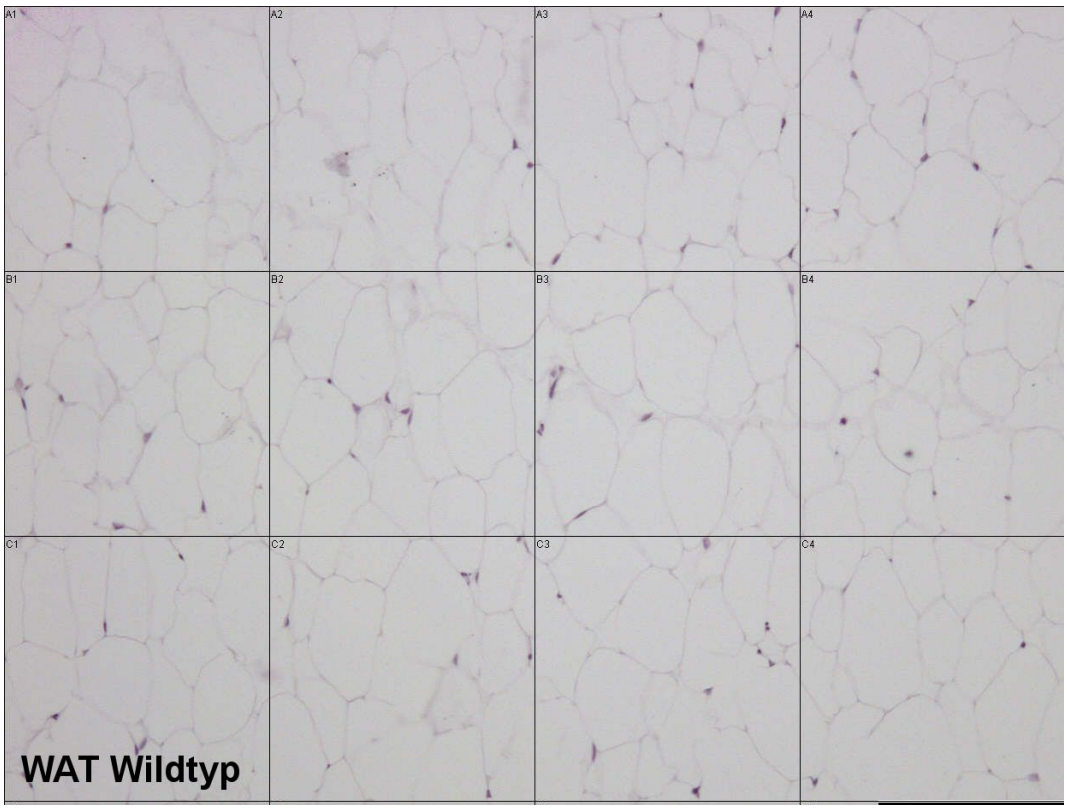
Für die histologische Charakterisierung wurde das weiße und braune Fettgewebe männlicher Wildtyptiere (n=5) und männlicher transgener Tiere (n=5) im Alter von 12 Wochen PFA-fixiert und in Paraffin eingebettet.

3.2.1. Vergleich der Adipozytengröße in weißem Fettgewebe

Bei den männlichen Wildtypmäusen (n=5) betrug die durchschnittliche Zahl der Zellanschnitte 27,1 (± 2,8) pro Quadrat (200 µm x 200 µm). Im weißen Fettgewebe der R6/2-Q300 Tiere war die Zahl der Zellanschnitte mit durchschnittlich 36,3 (± 4,8) pro Quadrat signifikant höher ($P < 0,05$).

Die Berechung der Adipozytengröße ergab bei den Wildtyptieren eine mittlere Adipozytengröße von 1489 µm² (± 162,1). Bei den transgenen Tieren betrug die errechnete mittlere Adipozytengröße 1120 µm² (± 165,1). Die Adipozyten der transgenen Tiere sind damit signifikant kleiner als die Adipozyten der Wildtyptiere ($P < 0,05$). Bilder von repräsentativen Ausschnitten sind in Abb. 4 dargestellt.

Da es bei der Paraffineinbettung des Fettgewebes zur Schrumpfung des Gewebes kommt, entsprechen die so errechneten Werte für die Adipozytengröße nicht der tatsächlichen Zellgröße *in vivo*. Da das Gewebe aller untersuchten Tiere nach dem gleichen Protokoll fixiert und eingebettet wurde, sind die Werte jedoch untereinander vergleichbar.



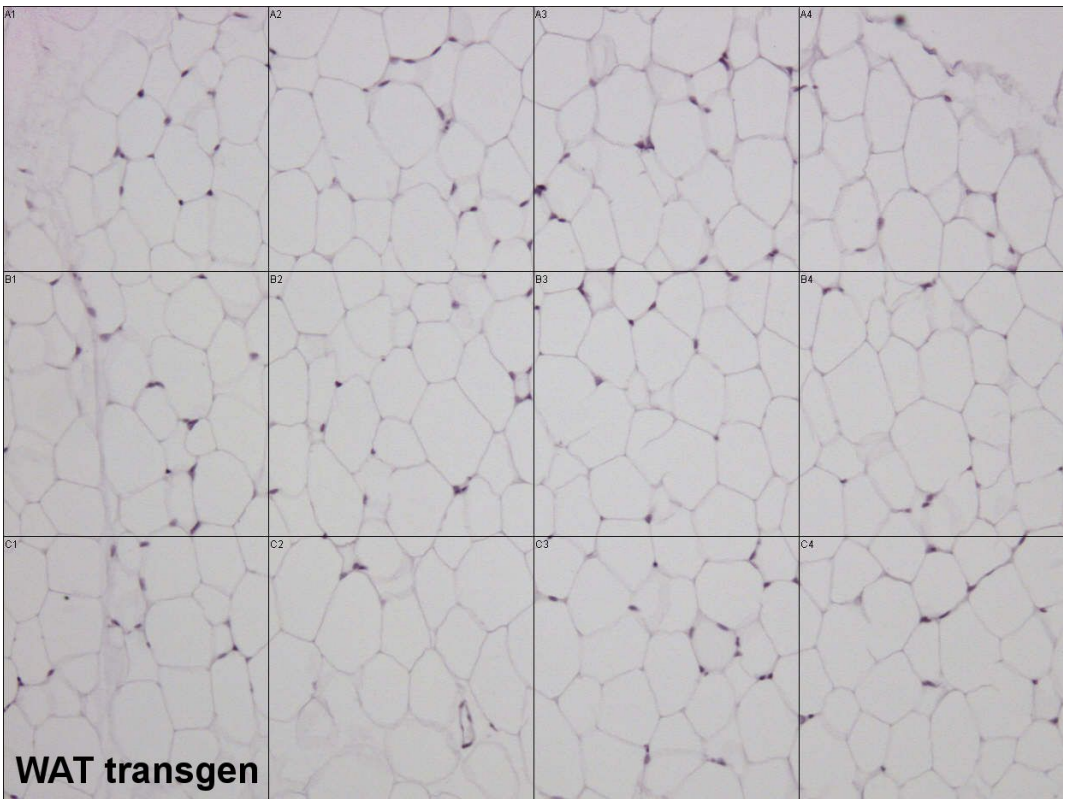


Abbildung 4 Erhöhte Zellzahl im weißen Fettgewebe (WAT) der R6/2-Q-300-Mäuse. *Die Abbildung zeigt 6µm dicke, hämalaungefärbte Paraffinschnitte aus dem WAT 12 Wochen alter, männlicher Mäuse bei 10-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Bilder mit einem Raster (200µm x 200µm) versehen und die Zahl der Zellanschnitte in vier Quadraten pro Schnitt gezählt. Im WAT der transgenen R6/2-Mäuse zeigt sich dabei aufgrund der kleineren Zellen eine höhere Zahl von Zellanschnitten.*

3.2.2. Immunhistochemische Darstellung von GLUT4 und Rab11

Um Unterschiede in der Verteilung von GLUT4 in weißem und braunem Fettgewebe darzustellen, wurden Paraffinschnitte aus WAT (wt n=5; tg n=4) und BAT (wt n=3; tg n=4) 12 Wochen alter, männlicher Tiere mit einem Anti-GLUT4-Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Repräsentative Ausschnitte der gefärbten Schnitte sind in Abb. 5 dargestellt.

Der Vergleich der gefärbten Proben mit den Negativkontrollen zeigte sowohl in WAT als auch in BAT eine spezifische Färbung mit dem GLUT4-Antikörper. Das weiße Fettgewebe der transgenen Tiere zeigte im Vergleich zum Wildtypgewebe eine etwas intensivere Färbung, was auf einen höheren GLUT4-Gehalt hindeutet. Das braune Fettgewebe erscheint bei den transgenen Tieren ebenfalls etwas intensiver angefärbt. Bei der Paraffinfixierung wurden die Lipidvakuolen und damit der Großteil der intrazellulären Bestandteile aus den weißen Adipozyten ausgewaschen. In den Schnitten sind dadurch nur die Membranen und Kerne der weißen Fettzellen zu erkennen, was die Methode ungeeignet für die Beurteilung der zellulären Verteilung von GLUT4 macht.

Neben GLUT4 sollte auch Rab11 immunhistochemisch dargestellt werden. Mit dem verwendeten Antikörper „Purified Mouse Anti-Rab11“ von BD Transduction Laboratories konnte jedoch trotz unterschiedlicher Antikörperkonzentrationen keine spezifische Färbung erzielt werden (Abb. 6).

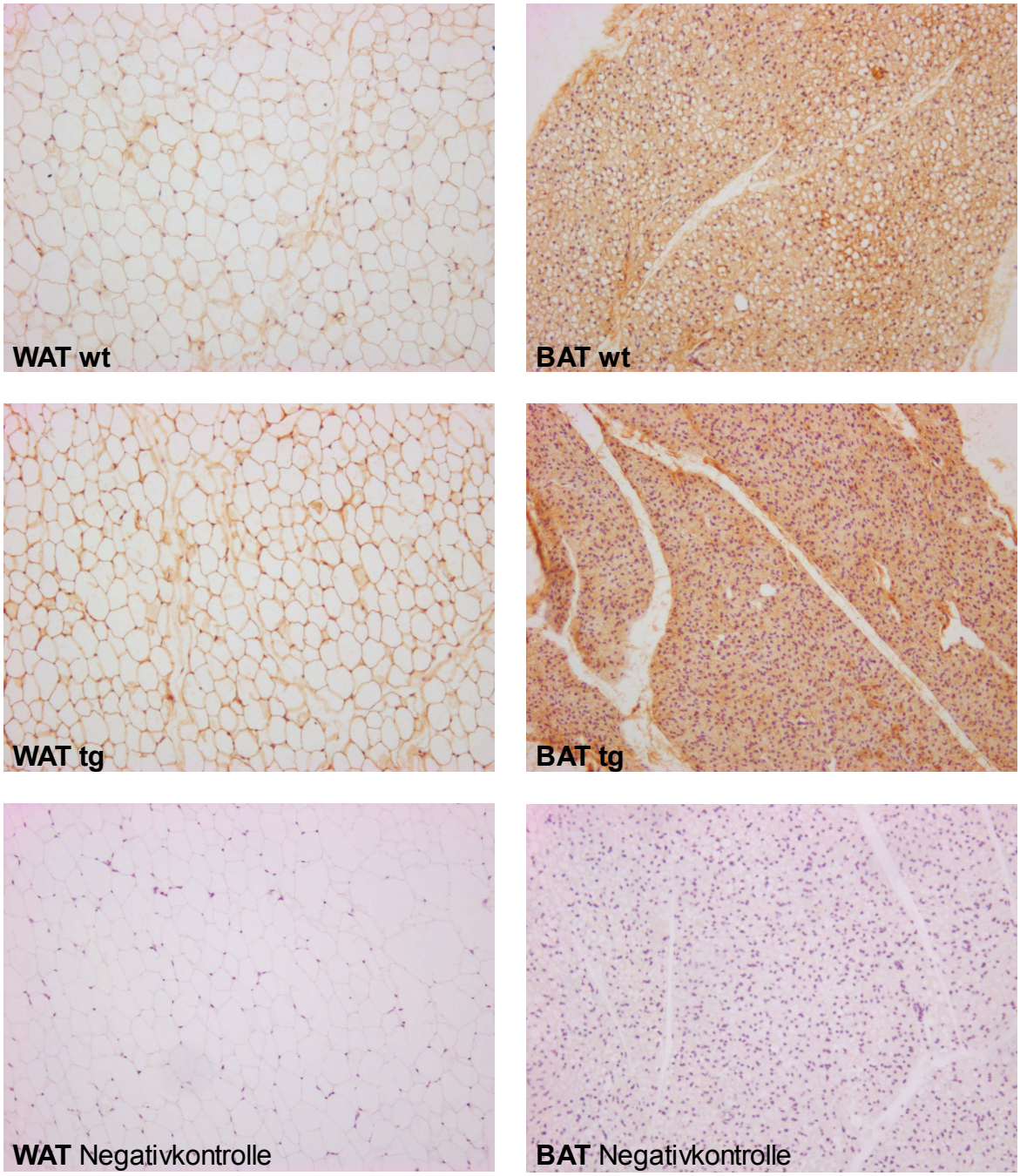


Abbildung 5 Immunhistochemische Darstellung des Glukosetransporters 4 (GLUT4) im Fettgewebe. *Die Abbildung zeigt 6 µm dicke Paraffinschnitte aus weißem (WAT) und braunem Fettgewebe (BAT) 12 Wochen alter, männlicher Mäuse nach der Färbung mit einem Anti-GLUT4-Antikörper bei 10-facher Vergrößerung. Die Zellkerne sind mit Hämalaun angefärbt. Die Negativkontrollen wurden nur mit dem sekundären Antikörper behandelt. Das Gewebe stammte von Wildtypmäusen (wt) und transgenen R6/2-Q300-Mäusen (tg).*

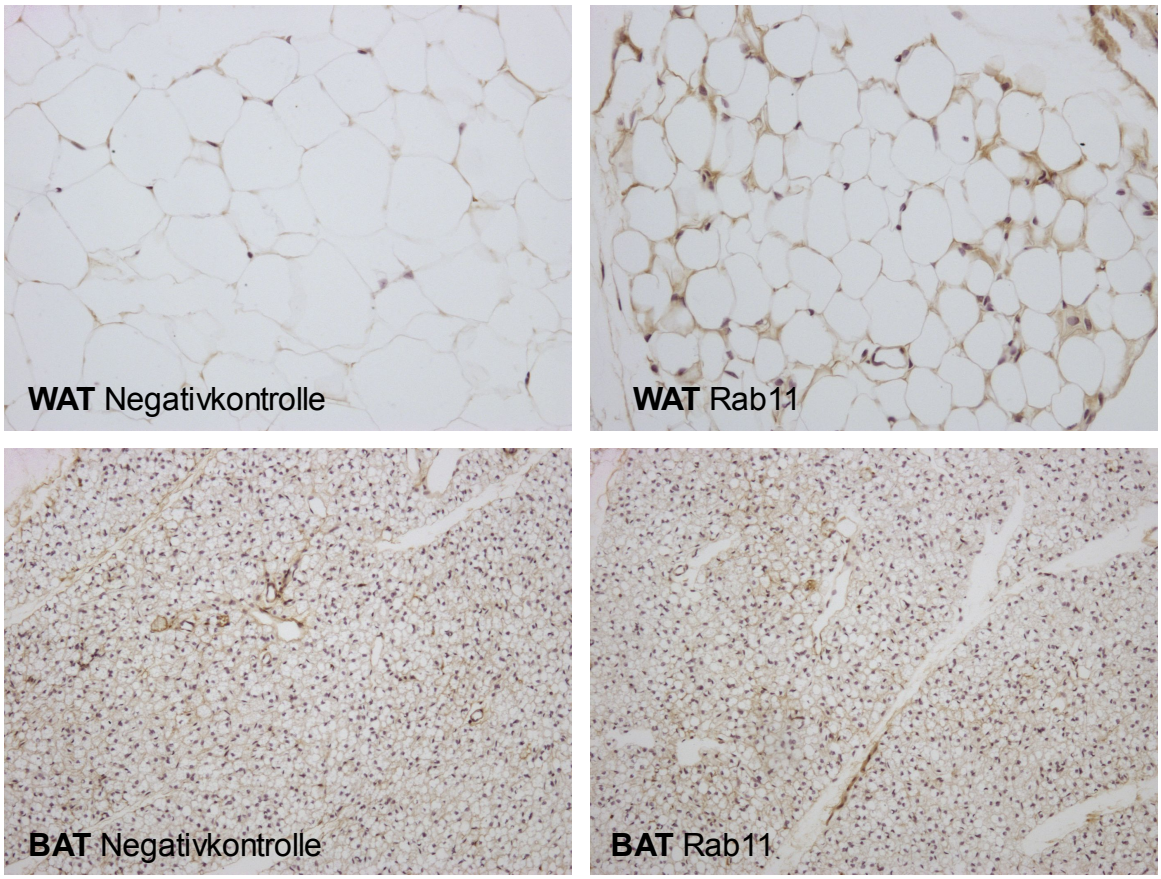


Abbildung 6 Versuch der immunhistochemischen Rab11-Darstellung im Fettgewebe. *Mit dem Antikörper Purified Mouse Anti-Rab11 (BD Transduction Laboratories) sollte das Protein Rab11 in Paraffinschnitten aus weißem (WAT) und braunem (BAT) Fettgewebe 12 Wochen alter, männlicher Mäuse dargestellt werden. Zusätzlich wurden die Schnitte mit Hämalaun gefärbt. Die Negativkontrollen wurden nur mit dem sekundären Antikörper behandelt um die Spezifität der Färbung zu überprüfen. Bei 20-facher (WAT) bzw. 10-facher Vergrößerung ist kein Unterschied zwischen den Negativkontrollen und den gefärbten Proben zu erkennen. Eine spezifische Färbung gelang mit dem 1:200 verdünnten Anti-Rab11-Antikörper nicht.*

3.3. Huntingtin-Expression in weißem und braunem Fettgewebe

Die Expression des Huntingtin-Proteins in den untersuchten Geweben bei Wildtyp- und transgenen Mäusen wurde durch den Nachweis von Huntingtin im Western Blot überprüft. Die intrazelluläre Huntingtin-Verteilung und das Vorkommen von Huntingtin-Aggregaten wurden durch eine immunhistochemische Färbung dargestellt.

3.3.1. Huntingtin-Nachweis im Western Blot

Mit dem Anti-Huntingtin-Antikörper MAB 2166, der endogenes Huntingtin detektiert, konnte in braunem und weißen Fettgewebe eine spezifische Bande bei ca. 350 kDa dargestellt werden. Huntingtin wird also in beiden Geweben und sowohl bei transgenen als auch bei Wildtypmäusen exprimiert.

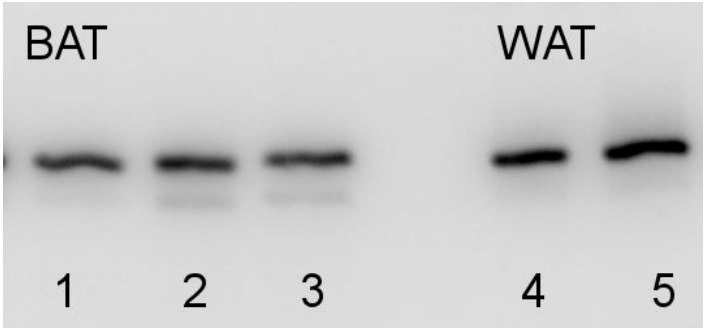


Abbildung 7 Nachweis von endogenem Huntingtin in weißem (WAT) und braunem (BAT) Fettgewebe im Western Blot. *Mit dem Anti-Huntingtin-Antikörper MAB 2166, der endogenes Huntingtin detektiert, zeigt sich im Western Blot in WAT und BAT eine spezifische Bande für Huntingtin bei ca. 350 kDa. Die Banden lässen sich bei Proben aus dem Fettgewebe 12 Wochen alter, transgener R6/2-Q300-Mäuse (1,4) und bei Proben aus dem Fettgewebe gleichaltriger Wildtypmäuse (2,3,5) darstellen.*

3.3.2. Immunhistochemischer Huntingtin-Nachweis

Bei der immunhistochemischen Färbung mit dem Anti-Huntingtin-Antikörper 2B4 zeigte sich im weißen Fettgewebe der transgenen Tiere eine intensivere Färbung als im Wildtypgewebe. Am ausgeprägtesten war die Färbung im Bereich der Zellkerne der transgenen Tiere. Intranukleäre Aggregate ließen sich jedoch auch bei 100-facher Vergrößerung nicht darstellen.

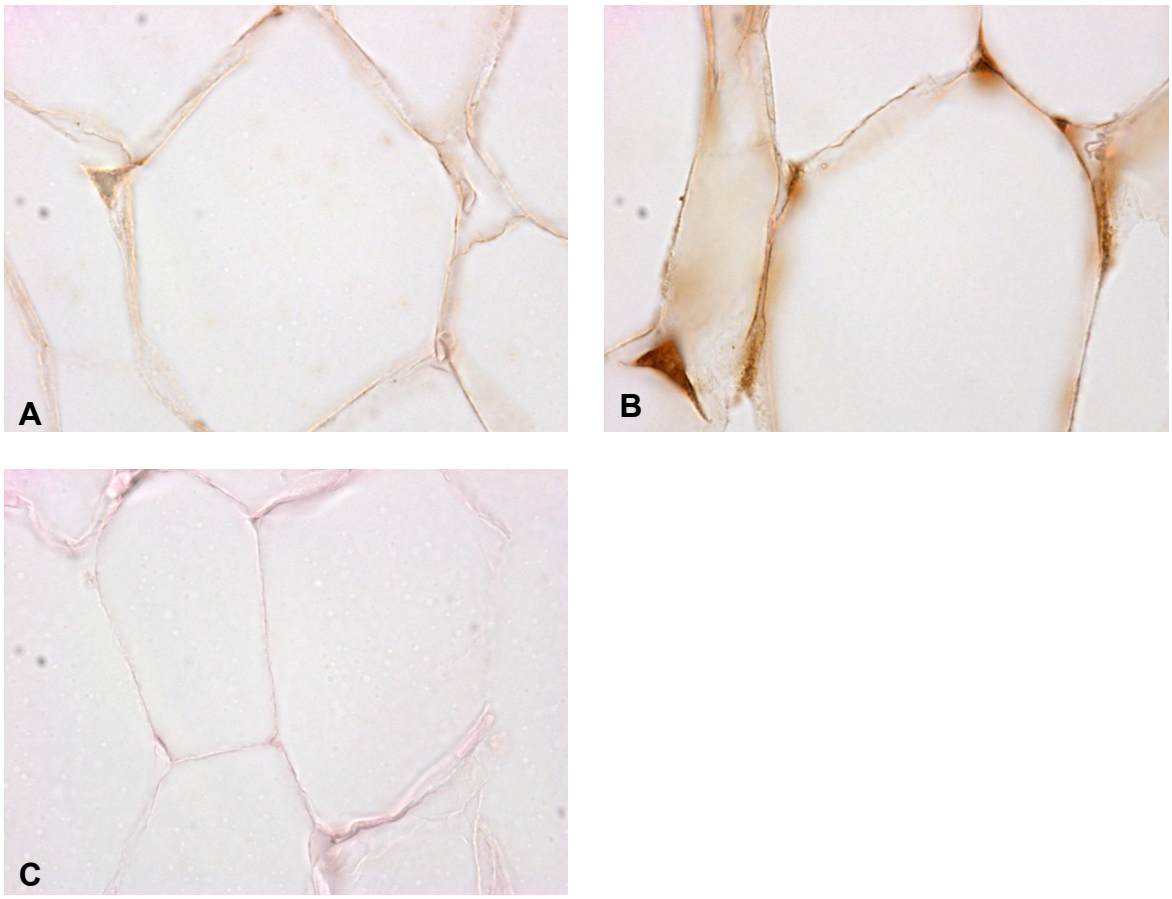


Abbildung 8 Immunhistochemische Darstellung von Huntingtin in weißem Fettgewebe. *Mit dem Anti-Huntingtin-Antikörper 2B4, der sowohl endogenes Huntingtin als auch das transgene Exon 1 detektiert, wurden Paraffinschnitte aus dem weißen Fettgewebe 12 Wochen alter, männlicher Mäuse immunhistochemisch gefärbt. Die Abbildung zeigt die Schnitte bei 100-facher Vergrößerung. Der Vergleich mit der Negativkontrolle (C) zeigt eine spezifische Färbung, die im Gewebe der transgenen R6/2-Q300-Maus (B) ausgeprägter ist als im Fettgewebe der Wildtypmaus (A). Intranukleäre Huntingtin-Aggregate sind nicht zu erkennen.*

3.4. GLUT4-Expression in weißem und braunem Fettgewebe

Da die immunhistochemische Färbung für den Vergleich der GLUT4-Expression zu ungenau war, wurde der GLUT4-Gehalt im Western Blot semiquantitativ bestimmt. In den Abbildungen des folgenden Abschnitts sind jeweils die sechs mittleren Proteinbanden der Western Blot-Membranen dargestellt.

3.4.1. GLUT4-Expression im Fettgewebe männlicher R6/2-Mäuse

GLUT4-Expression im Fettgewebe männlicher Tiere im Alter von 8 Wochen

Insgesamt wurden sechs transgene R6/2-Q300-Tiere und sechs Wildtyp-vergleichstiere aus der gleichen Tiergeneration untersucht. Im weißen Fettgewebe zeigte sich bezüglich der GLUT4-Expression kein signifikanter Unterschied zwischen transgenen Tieren und den Wildtypmäusen. Im Gegensatz dazu war die GLUT4-Expression im braunen Fettgewebe der transgenen Tiere auf das 1,6-Fache (± 0,13) der Expression der Wildtyptiere erhöht (P < 0,01).

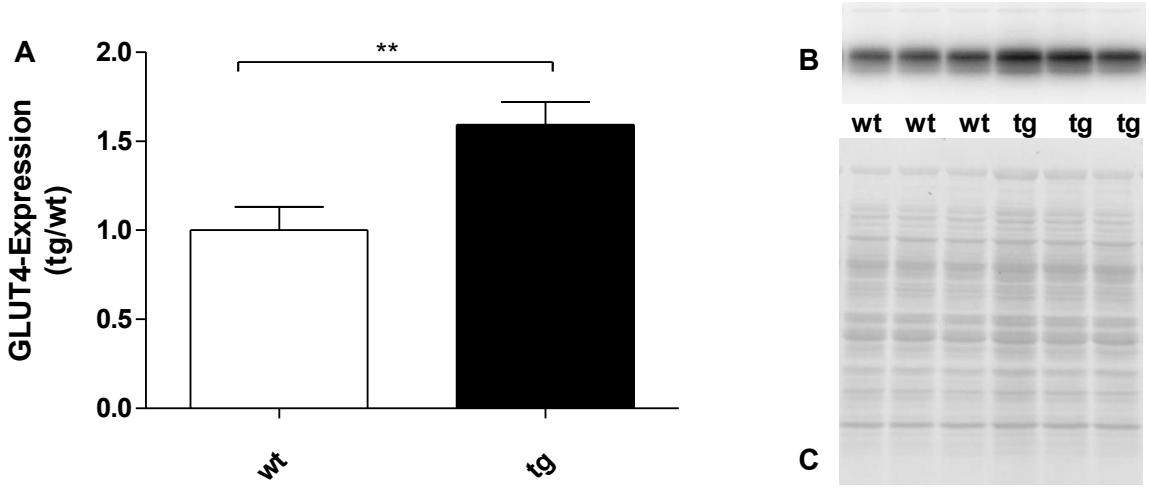


Abbildung 9 Erhöhte Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) im braunen Fettgewebe (BAT) männlicher R6/2-Q300-Tiere im Alter von 8 Wochen. *Die Graphik (A) zeigt die GLUT4-Expression im BAT der transgenen (tg, n=6) Tiere relativ zur Expression im BAT 8 Wochen alter Wildtypmäuse (wt, n=6). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt. Der Unterschied ist mit P < 0,01 (**) hoch signifikant. Auf der Western-Blot-Membran stellte sich eine spezifische Bande für GLUT4 bei ca. 50 kDa dar (B), darunter ist die Proteinfärbung zur Ladekontrolle abgebildet (C).*

GLUT4-Expression im Fettgewebe männlicher Tiere im Alter von 12 Wochen

Insgesamt wurde das weiße Fettgewebe von 18 Wildtyptieren und 18 transgenen R6/2-Q300-Tiere aus drei unterschiedlichen Zuchtgenerationen untersucht. Im epididymalen weißen Fettgewebe der transgenen Tiere war die GLUT4-Expression höchst signifikant auf das 1,46-Fache (± 0,4) erhöht (P < 0,001).

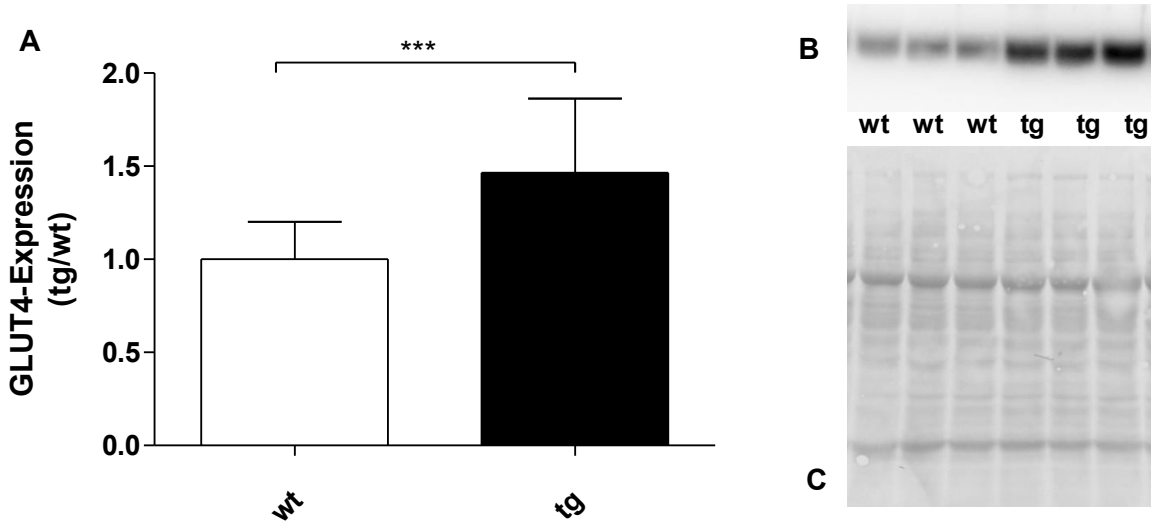


Abbildung 10 Erhöhte Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) im weißen Fettgewebe (WAT) männlicher R6/2-Q300-Tiere im Alter von 12 Wochen. *Die Graphik (A) zeigt die GLUT4-Expression im WAT der transgenen (tg, n= 18) Tiere relativ zur Expression im WAT 12 Wochen alter Wildtypmäuse (wt, n=18). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt. Der Unterschied ist mit P < 0,001 (***) höchst signifikant. Auf der Western-Blot-Membran stellte sich eine spezifische Bande für GLUT4 bei ca. 50 kDa dar (B), darunter ist die Proteinfärbung zur Ladekontrolle abgebildet (C).*

Im braunen Fettgewebe war die durchschnittliche GLUT4-Expression bei den transgenen Tieren (n=12) nur leicht auf das 1,1-Fache erhöht, der Unterschied zu den Wildtyptieren (n=13) war jedoch nicht signifikant.

GLUT4-Expression im Fettgewebe bei R6/2-Tieren mit 160 CAG-Tripletts

Um die Auswirkungen der erhöhten Anzahl an CAG-Wiederholungen auf die GLUT4-Expression im Fettgewebe beurteilen zu können, wurde das weiße Fettgewebe von 12 Wochen alten R6/2-Tieren (n=5) mit 160 CAG-Wiederholungen mit dem Fettgewebe gleichaltriger Wildtyptiere (n=6) verglichen.

Dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte GLUT4-Expression im weißen Fettgewebe der transgenen Tiere auf das 1,86-Fache (± 0,42) der Expression bei den Wildtyptieren ($P < 0,01$). Die Erhöhung der GLUT4-Expression im weißen Fettgewebe war damit bei den R6/2-Tieren mit 160 CAG-Wiederholungen ausgeprägter als bei den R6/2-Q300-Mäusen.

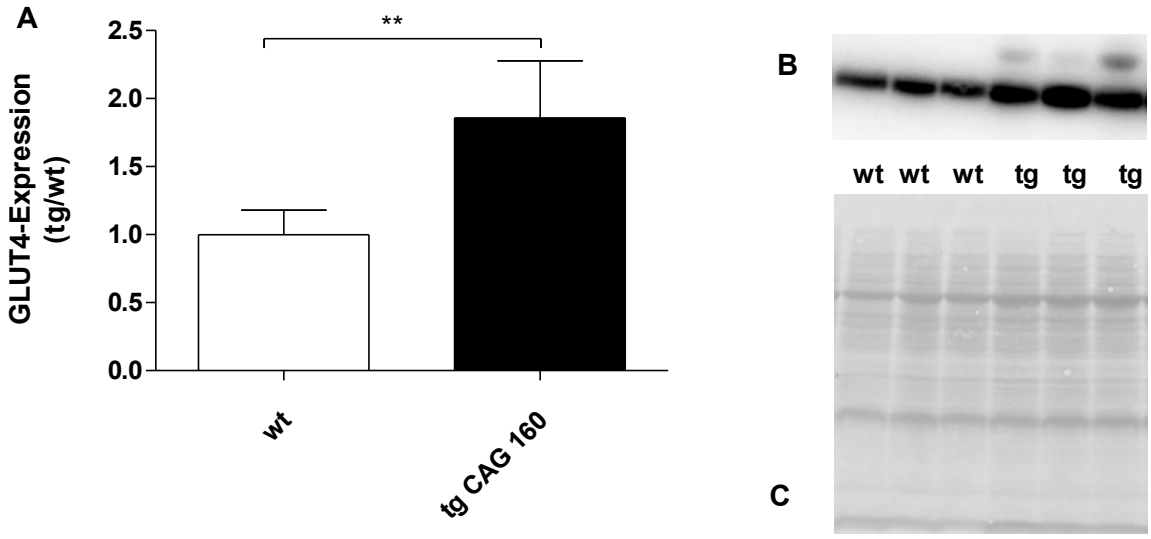


Abbildung 11 Erhöhte Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) im weißen Fettgewebe (WAT) 12 Wochen alter, männlicher R6/2-Tiere mit 160 Cytosin-Adenin-Guanin-Wiederholungen (CAG 160) im Exon 1. *Die Graphik (A) zeigt die GLUT4-Expression im WAT der transgenen (tg, n= 5) Tiere relativ zur Expression im WAT 12 Wochen alter Wildtypmäuse (wt, n=6). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt. Der Unterschied ist mit P < 0,01 (**) hoch signifikant. Auf der Western-Blot-Membran stellte sich eine spezifische Bande für GLUT4 bei ca. 50 kDa dar (B), darunter ist die Proteinfärbung zur Ladekontrolle abgebildet (C).*

Während im braunen Fettgewebe der R6/2-Q300-Mäuse die GLUT4-Expression nur leicht erhöht war, zeigte sich bei den R6/2-Tieren (n=4) eine Erhöhung der GLUT4-Expression auf das 2,25-Fache (± 0,21) der Expression im BAT der Wildtyptiere (n=5; P < 0,05). Die Veränderung der GLUT4-Expression war damit auch im braunen Fettgewebe bei den R6/2-Tieren mit 160 CAG-Wiederholungen ausgeprägter als bei den Tieren mit den verlängerten CAG-Abschnitten.

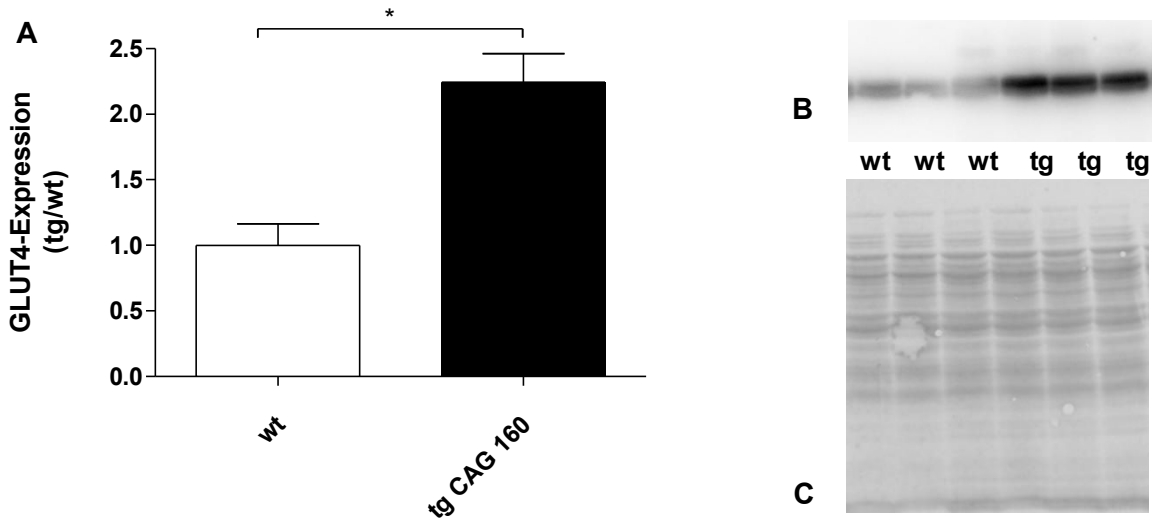


Abbildung 12 Erhöhte Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) im braunen Fettgewebe (BAT) 12 Wochen alter, männlicher R6/2-Tiere mit 160 Cytosin-Adenin-Guanin-Wiederholungen (CAG 160) im Exon 1. *Die Graphik (A) zeigt die GLUT4-Expression im BAT der transgenen (tg, n=4) Tiere relativ zur Expression im BAT 12 Wochen alter Wildtypmäuse (wt, n= 5). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt. Der Unterschied ist mit P < 0,05 (*) signifikant. Auf der Western-Blot-Membran stellte sich eine spezifische Bande für GLUT4 bei ca. 50 kDa dar (B), darunter ist die Proteinfärbung zur Ladekontrolle abgebildet (C).*

3.4.2. GLUT4-Expression im Fettgewebe weiblicher R6/2-Q300-Mäuse

Die GLUT4-Expression im Fettgewebe der 12 Wochen alten, weiblichen Tiere wurde bei 12 transgenen Tiere und 13 Wildtypmäusen aus zwei unterschiedlichen Zuchtgenerationen verglichen.

Im Gegensatz zu den männlichen Tieren zeigte sich bei den weiblichen transgenen Tieren eine signifikant verminderte GLUT4-Expression im weißen Fettgewebe auf das 0,58-Fache (± 0,21) der Expression bei den Wildtyptieren ($P < 0,001$). Die GLUT4-Expression im braunen Fettgewebe zeigt auch bei den weiblichen, transgenen Tieren keine signifikante Veränderung.

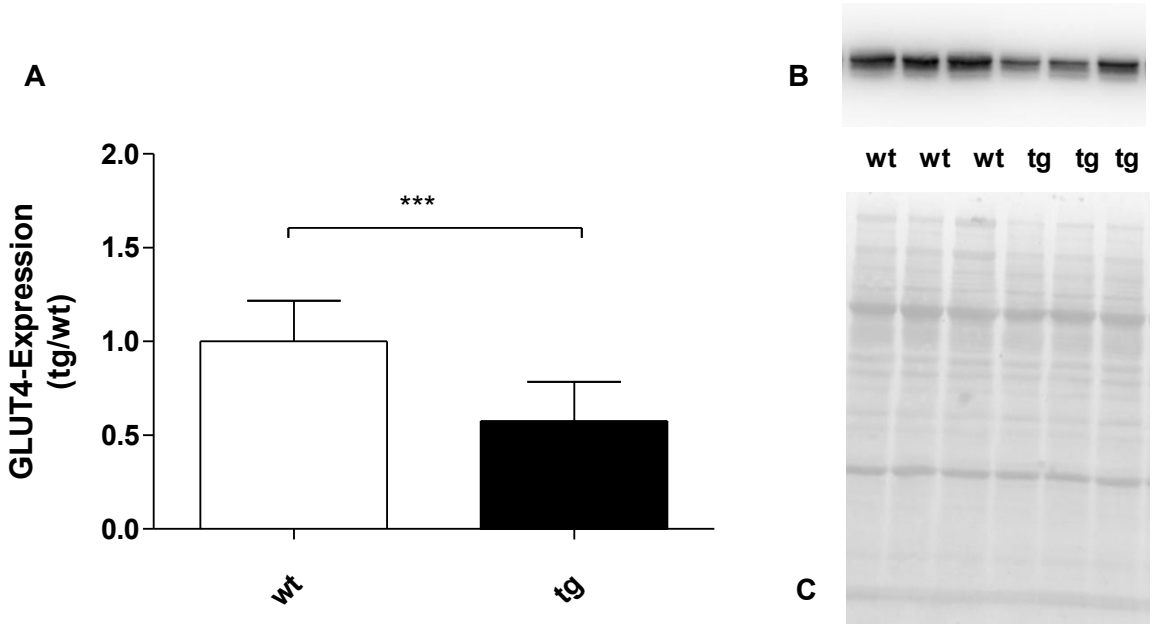


Abbildung 13 Verminderte Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) im weißen Fettgewebe (WAT) 12 Wochen alter, weiblicher R6/2-Q300-Mäuse. *Die Graphik (A) zeigt die GLUT4-Expression im WAT der transgenen (tg, n= 12) Tiere relativ zur Expression im WAT der 12 Wochen alten Wildtypmäuse (wt, n=13). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt. Der Unterschied ist mit P< 0,001 (***) höchst signifikant. Auf der Western-Blot-Membran stellte sich eine spezifische Bande für GLUT4 bei ca. 50 kDa dar (B), darunter ist die Proteinfärbung zur Ladekontrolle abgebildet (C).*

3.4.3. Geschlechtsspezifische GLUT4-Expression in WAT und BAT

Da sich die GLUT4-Expression sich bei männlichen und weiblichen Tieren gegensinnig verhielt, wurde zusätzlich die GLUT4-Expression männlicher und weiblicher Tiere verglichen. Dazu wurde das Fettgewebe von 6 bis 7 Tieren pro Genotyp und Geschlecht untersucht. Die Tiere stammten alle aus der gleichen Zuchtgeneration.

Bei den Wildtyptieren zeigte sich im weißen Fettgewebe der männlichen Tiere eine hoch signifikant niedrigere GLUT4-Expression. Sie betrug im Mittel nur das 0,64-Fache (± 0,17) der Expression bei den weiblichen Wildtyptieren ($P < 0,01$).
Da sich bei diesem Experiment bei der Proteinfärbung eine große Luftblase auf der Membran zeigte, konnte die MemStain-Färbung nicht als Ladekontrolle verwendet werden. Die Membran wurde darum zusätzlich mit einem Anti-Tubulin-β-Antikörper inkubiert und die Tubulin-β-Bande zur Normalisierung der Werte verwendet.

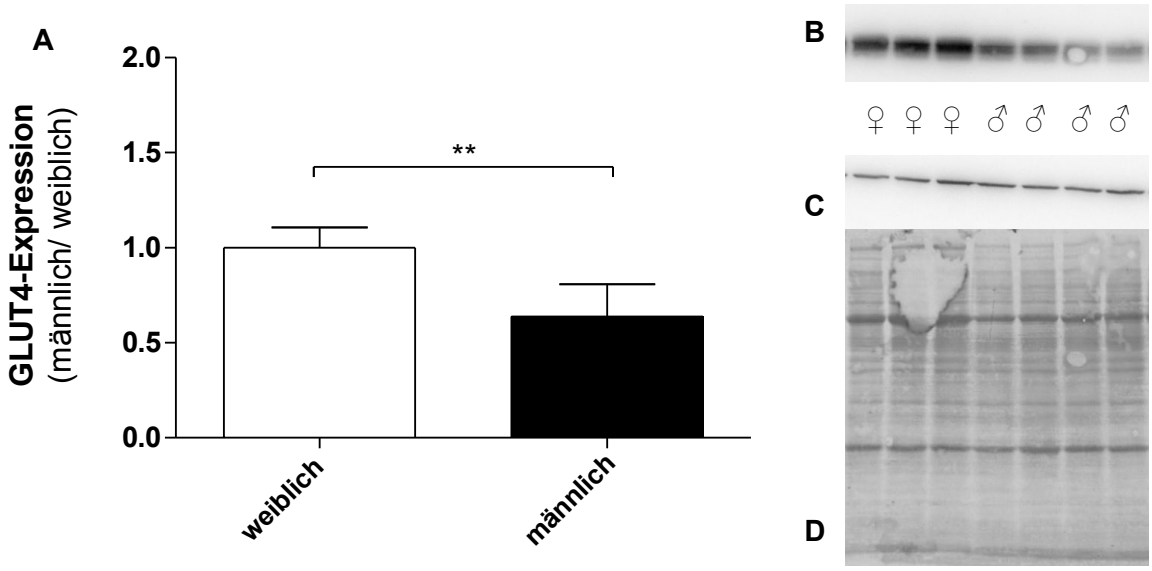


Abbildung 14 Geschlechtsspezifische Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) im weißen Fettgewebe (WAT) 12 Wochen alter Wildtypmäuse. *Die Graphik (A) zeigt die GLUT4-Expression im WAT der männlichen (♂, n= 6) Mäuse relativ zur Expression im WAT gleichaltriger Weibchen (♀, n=6). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt. Der Unterschied ist mit P < 0,01 (**) hoch signifikant. Auf der Western-Blot-Membran stellte sich eine spezifische Bande für GLUT4 bei ca. 50 kDa dar (B). Da die Proteinfärbung (D) aufgrund der großen Luftblasen nicht als Ladekontrolle ausgewertet werden konnte, wurde zusätzlich die Tubulin- β-Bande bei ca. 55 kDa detektiert (C). Die zweite Bande von rechts wurde wegen der Luftblase im Bereich der GLUT4-Bande aus der Auswertung genommen.*

Bei den R6/2-Q300-Tieren zeigte sich im weißen Fettgewebe ein entgegengesetzter Effekt des Geschlechts auf die GLUT4-Expression. Verglichen mit den transgenen, weiblichen Tieren, war der GLUT4-Gehalt bei den männlichen, transgenen Tieren auf das 1,73-Fache (± 0,36) erhöht (P < 0,01).

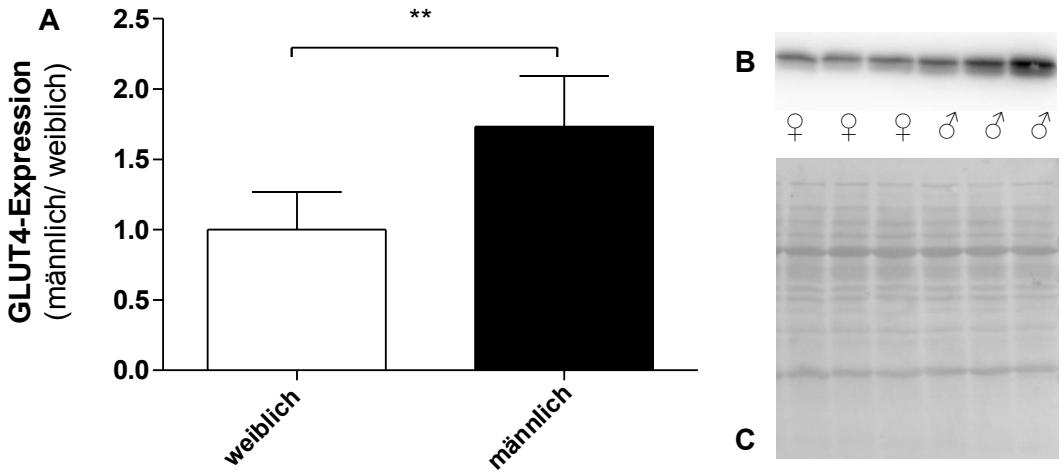


Abbildung 15 Geschlechtsspezifische Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) im weißen Fettgewebe (WAT) 12 Wochen alter R6/2-Q300-Mäuse. *Die Graphik (A) zeigt die GLUT4-Expression im WAT der männlichen (♂, n= 6) Mäuse relativ zur Expression im WAT gleichaltriger weiblicher R6/2-Q300-Mäuse (♀, n=7). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt. Der Unterschied ist mit P < 0,01 (**) hoch signifikant. Auf der Western-Blot-Membran stellte sich eine spezifische Bande für GLUT4 bei ca. 50 kDa dar (B); darunter ist die Proteinfärbung zur Ladekontrolle abgebildet (C).*

Im braunen Fettgewebe der Wildtyptiere bestand bezüglich der GLUT4-Expression kein signifikanter Geschlechtsunterschied. Bei den transgenen Tieren zeigte sich im Gegensatz dazu bei den Männchen eine 1,68 (± 0,64)-fach höhere GLUT4-Expression im braunen Fettgewebe als bei den transgenen Weibchen (P < 0,05).

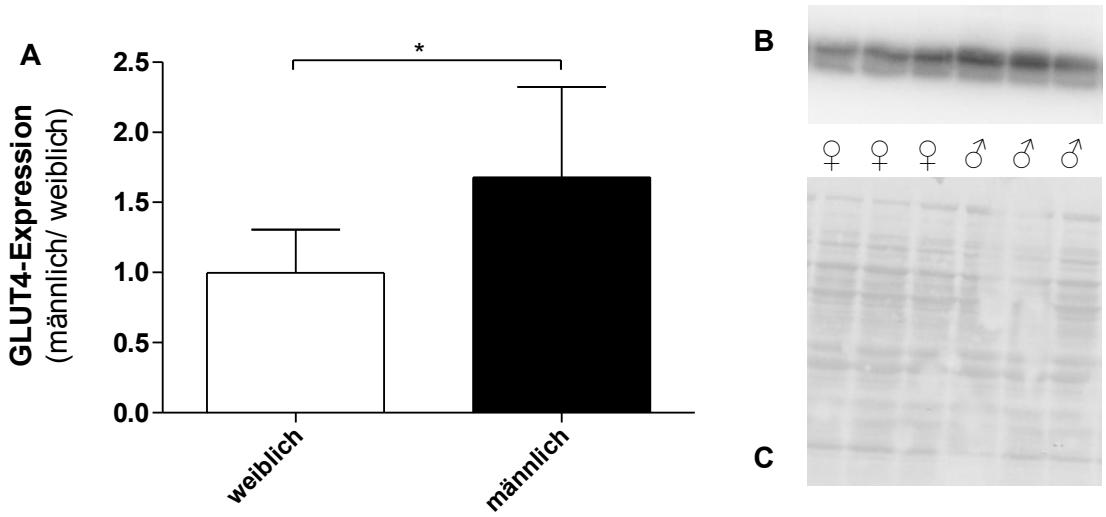


Abbildung 16 Geschlechtsspezifische Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) im braunen Fettgewebe (BAT) 12 Wochen alter R6/2-Q300-Mäuse. *Die Graphik (A) zeigt die GLUT4-Expression im BAT der männlichen (♂, n= 7) Mäuse relativ zur Expression im BAT gleichaltriger weiblicher R6/2-Q300-Mäuse (♀, n=7). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt. Der Unterschied ist mit P < 0,05 (*)signifikant. Auf der Western-Blot-Membran stellte sich eine spezifische Bande für GLUT4 bei ca. 50 kDa dar (B); darunter ist die Proteinfärbung zur Ladekontrolle abgebildet (C).*

3.5. Rab11-Expression in weißem und braunem Fettgewebe

Die Expression von Rab11 wurde in weißem und braunem Fettgewebe 12 Wochen alter Tiere untersucht. Im Fettgewebe der männlichen Tiere zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypmäusen (n=7) und R6/2-Q300-Tieren (n=7).

Bei den weiblichen Mäusen war die Rab11-Expression im weißen Fettgewebe der transgenen Tiere unverändert. Im braunen Fettgewebe zeigte sich bei den transgenen Weibchen (n=7) eine hoch signifikante Reduktion von Rab11 auf das 0,7-Fache (± 0,11) der Expression der Wildtyptiere (n=7, P< 0,01).

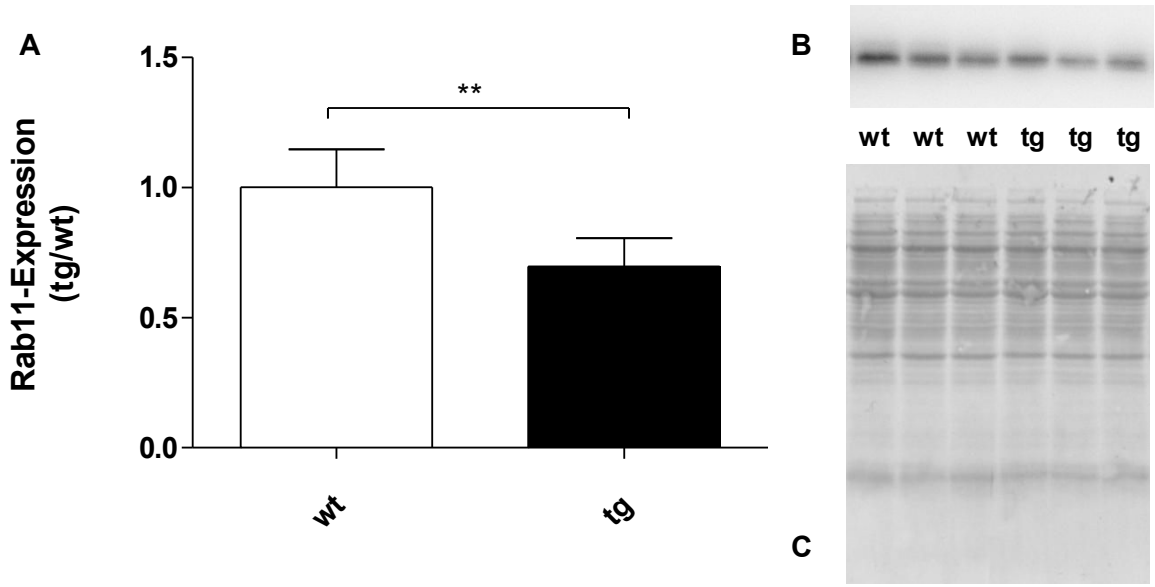


Abbildung 17 Verminderte Expression des Transportproteins Rab11 im braunen Fettgewebe (BAT) 12 Wochen alter R6/2-Q300-Weibchen. *Die Graphik (A) zeigt die Rab11-Expression im BAT der transgenen (tg, n=7) Mäuse relativ zur Expression im WAT gleichaltriger Wildtypmäuse (wt, n=7). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt. Der Unterschied ist mit P < 0,01 (**) hoch signifikant. Auf der Western-Blot-Membran stellte sich eine spezifische Bande für Rab11 bei ca. 25 kDa dar (B); darunter ist die Proteinfärbung zur Ladekontrolle abgebildet (C).*

3.6. Lokalisation von GLUT4 in weißem Fettgewebe

Da für die Funktion des Glukosetransporters GLUT4 die insulininduzierte Translokation des Transporters an die Plasmamembran entscheidend ist, wurde die intrazelluläre Lokalisation von GLUT4 im Basalzustand und nach Insulinstimulation untersucht.

3.6.1. Darstellung der GLUT4-Lokalisation durch Immunzytochemie

Mit einem Anti-GLUT4-Antikörper sollte die GLUT4-Lokalisation in methanol-fixierten Adipozyten dargestellt und die Lokalisation nach Insulinstimulation und im Basalzustand verglichen werden. Zusätzlich sollte das Protein Rab11, das am intrazellulären Transport von GLUT4 beteiligt ist, mit einem Antikörper dargestellt und die Kolokalisation von GLUT4 und Rab11 untersucht werden. Die Protokolle für die Färbung wurden zunächst mit Adipozyten, die aus mesenchymalen, embryonalen Fibroblasten differenziert wurden, etabliert. Diese Zellen standen in größeren Mengen zur Verfügung als die primären Adipozyten aus dem Fettgewebe der R6/2-Mauslinie.

Insgesamt konnte dreimal eine Färbung an Adipozyten, die aus dem epididymalen Fettgewebe männlicher, 12 Wochen alter Tiere isoliert wurden, durchgeführt werden. Repräsentative Bilder der gefärbten Zellen von transgenen Tieren und Wildtyptieren sind in Abb. 18 dargestellt. Mit dem Anti-GLUT4-Antikörper zeigte sich sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den transgenen Zellen ein deutliches Farbsignal (grün). In der Negativkontrolle stellten sich lediglich die DAPI-gefärbten Zellkerne (blau) dar, das erzielte Färbesignal mit dem Antikörper ist also spezifisch für GLUT4.

Die Zellen im Basalstadium (control) zeigten eine gleichmäßige, intrazelluläre Verteilung von GLUT4 um die lipidhaltigen Vakuolen herum. Es war kein Unterschied zwischen den transgenen Zellen und den Wildtypzellen zu erkennen. Bei den insulinstimulierten Zellen erschien das GLUT4-Signal etwas vermehrt an den äußeren Zellgrenzen. Intrazellulär zeigte sich das Signal etwas abgeschwächt und die Lipidvakuolen kontrastieren sich schwächer.

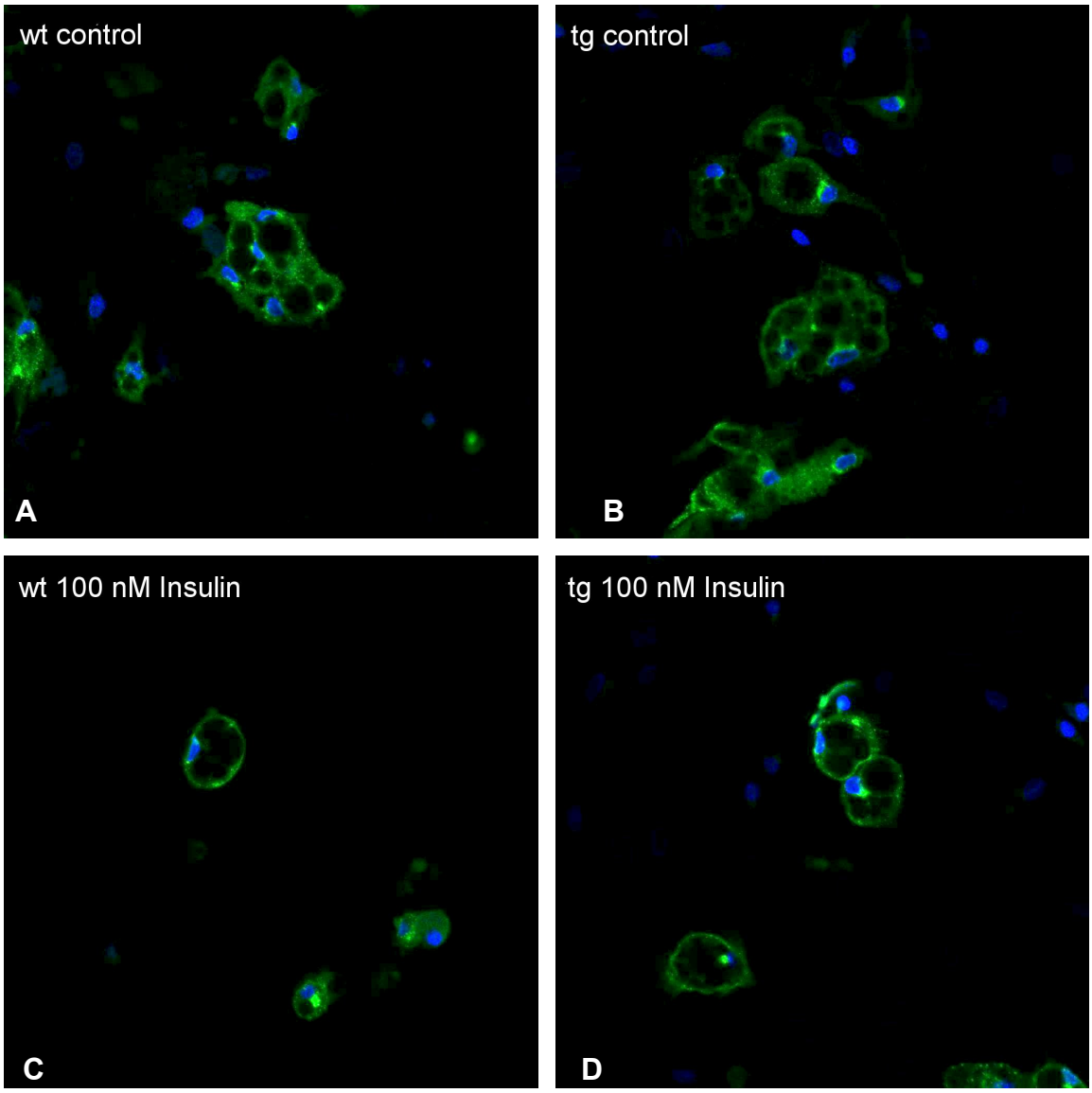


Abbildung 18 Immunzytochemische Darstellung des Glukosetransporters 4 (GLUT4) in primären Adipozyten nach Insulinstimulation (100 nM). *Die Zellen wurden aus dem weißen Fettgewebe 12 Wochen alter, männlicher Mäuse (Wildtyp und R6/2-Q300) isoliert und adipogen differenziert. Die Färbung erfolgte an Tag 7 des Differenzierungsprotokolls mit einem Anti-GLUT4-Antikörper (Signal in grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Bild A zeigt unstimulierte Wildtypzellen (wt), Bild B unstimulierte Zellen der R6/2-Q300-Mäuse (tg), Bild C zeigt wt-Zellen nach Insulinstimulation und Bild D tg-Zellen nach Insulinstimulation.*

Die insulininduzierte Translokation stellte sich nicht so deutlich dar wie erwartet und es war kein Unterschied zwischen den Wildtyp- und den transgenen Zellen zu erkennen. Zudem gab es keinen Unterschied zwischen Zellen, die mit 10 nM Insulin (Bilder nicht dargestellt) und Zellen, die mit 100 nM Insulin stimuliert wurden. Die Insulinkonzentrationen zur Stimulation war so hoch, dass eine zu niedrige Insulinkonzentration als Ursache für die schwache Translokation ausgeschlossen werden kann. Die Stimulationszeit von 15 min war so gewählt wie

beim Versuch zur Glukoseaufnahme und damit ausreichend lang. Möglicherweise kam es bei der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen zur Umverteilung von Membranabschnitten, die die Darstellung der Translokation beeinträchtigte.

Die Beurteilung der Bilder wird dadurch erschwert, dass sich benachbarte Zellen kaum voneinander abgrenzen und dass es bei den Aufnahmen kaum gelang, vergleichbar große Zellen in einem Bildabschnitt darzustellen. Grund dafür war der hohe Zellverlust durch das Platzen der Zellen während der zahlreichen Waschschritte, so dass nach Abschluss der Färbung nur wenige intakte Zellen auf den Deckgläschen verblieben. Insgesamt ist das Ergebnis der immun-zytochemischen Darstellung von GLUT4 als unbefriedigend zu bewerten. Eine sichere Aussage zur GLUT4-Lokalisation und zur insulininduzierten Translokation kann anhand der Färbung nicht getroffen werden.

Mit dem Rab11-Antikörper *Polyclonal Antibody to Rab11A* (Acris Antibodies) konnte keine zufriedenstellende Darstellung von Rab11 erreicht werden. Eine Beurteilung der Rab11-Verteilung in den Zellen und der Kolokalisation von GLUT4 und Rab11 war anhand der Färbung nicht möglich.

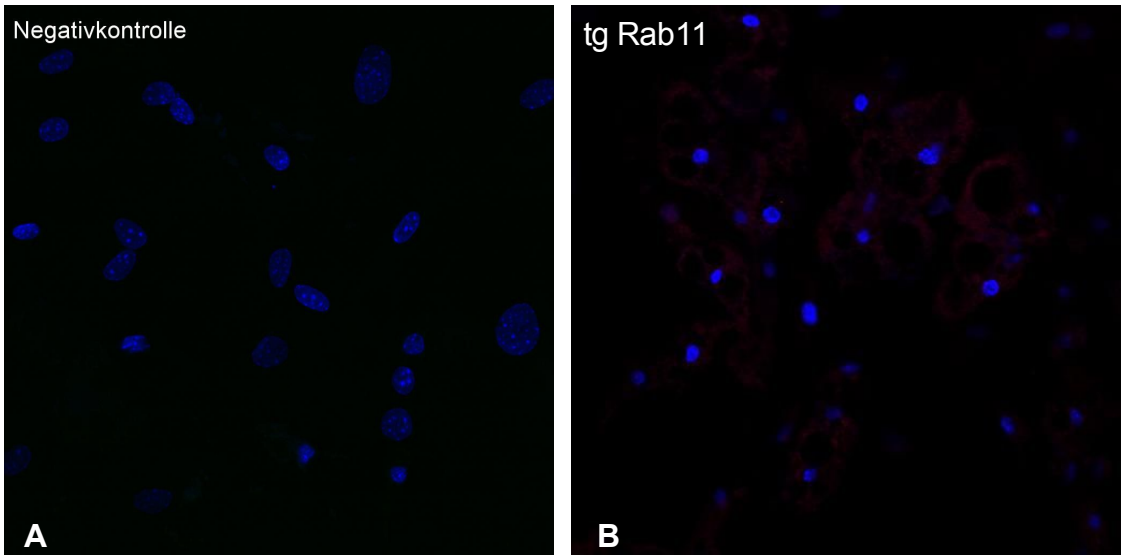


Abbildung 19 Immunhistochemische Darstellung des Transportproteins Rab11 in primären Adipozyten. *Die Zellen wurden aus dem weißen Fettgewebe 12 Wochen alter, männlicher Mäuse (Wildtyp und R6/2-Q300) isoliert und adipogen differenziert. Die Färbung erfolgte an Tag 7 des Differenzierungsprotokolls mit einem Anti-Rab11-Antikörper (Signal in rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Die Negativkontrolle (A) ist bei 100-facher Vergrößerung, die Rab11-Färbung (B) bei 40-facher Vergrößerung abgebildet.*

3.6.2. GLUT4-Translokation in insulinstimulierten Gewebeproben

Da eine Aussage zur GLUT4-Lokalisation und Translokation anhand der immunzytochemischen Färbungen nicht möglich war, wurde ein Protokoll zur Organkultur von weißem Fettgewebe etabliert. Die Gewebeproben konnten *in vitro* mit Insulin stimuliert werden und anschließend durch Ultrazentrifugation in die Plasmamembranfraktion und die LDM-Fraktion aufgetrennt werden. Durch die Bestimmung des GLUT4-Gehalts in der PM-Fraktion im Western Blot war so eine Beurteilung der insulininduzierten GLUT4-Translokation an die Zellmembran möglich.

3.6.2.1. Überprüfung der Subfraktionierung

Um die Effektivität des Subfraktionierungsprotokolls zu überprüfen und zur Kontrolle der Reinheit der unterschiedlichen Fraktionen, wurde der Gehalt an Na^+K^+ATPase, einem Markerprotein der Zellmembran, in der PM- und der LDM-Fraktion im Western Blot verglichen.

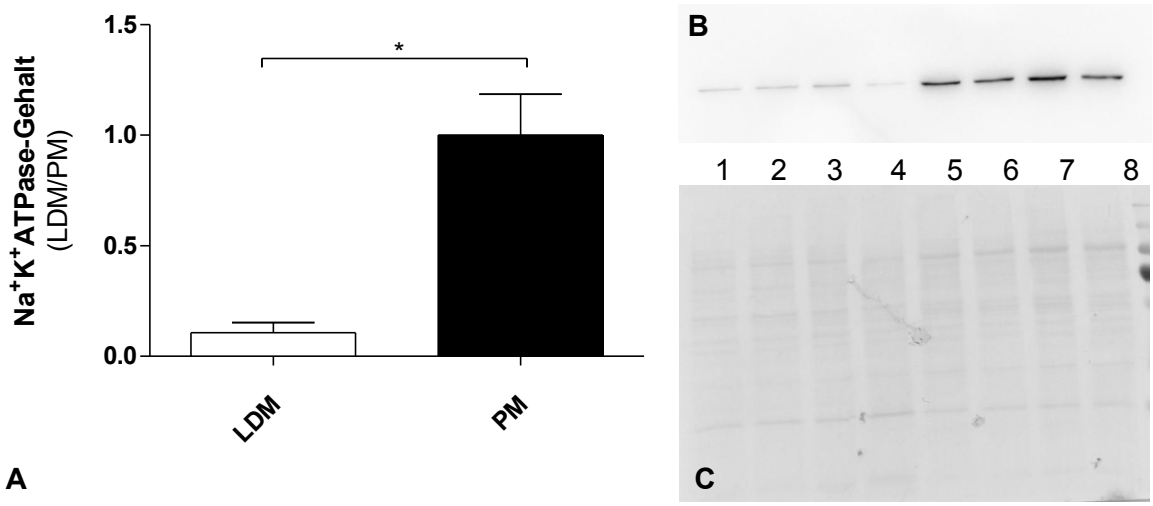


Abbildung 20 Na^+K^+ATPase-Gehalt in der low density microsome (LDM)- und der Plasmamembranfraktion (PM). *Die Membranfraktionen wurden durch die Subfraktionierung von Gewebeproben aus murinem weißem Fettgewebe gewonnen. Die Fraktionen stammen alle aus dem selben Experiment. Die LDM-Fraktionen (Proben 1-4) zeigten einen signifikant niedrigeren Na^+K^+ATPase-Gehalt als die PM-Fraktionen (Proben 5-8), $P < 0,05$ (*). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt(A). Auf der Western-Blot-Membran zeigte sich eine spezifische Bande bei ca. 100 kDa (B), darunter ist die Proteinfärbung zur Ladekontrolle dargestellt (C).*

Der verwendete Anti-Na^+K^+ATPase-Antikörper zeigte eine spezifische Bande bei ca. 100 kDa. Bei der Auswertung wurde der Na^+K^+ATPase-Gehalt der LDM-Fraktionen in Bezug zum Na^+K^+ATPase-Gehalt der PM-Fraktionen gesetzt. In den PM-Fraktionen betrug der mittlere Na^+K^+ATPase-Gehalt 1,0 (± 0,19). Der durchschnittliche Gehalt an Na^+K^+ATPase in den LDM-Fraktionen war im Vergleich mit 0,11 (± 0,05) in etwa um den Faktor 10 niedriger ($P < 0,05$). Der Vergleich zeigt, dass es bei der Subfraktionierung gelang, die Na^+K^+ATPase in der PM-Fraktion anzureichern. Wie erwartet, enthielt auch die LDM-Fraktion einen geringen Anteil an Na^+K^+ATPase. Dieser ist darauf zurückzuführen, dass das Protein intrazellulär synthetisiert und über die Mikrosomenfraktion an die Plasmamembran transportiert wird.

3.6.2.2. GLUT4-Gehalt in der Plasmamembranfraktion

Für die Subfraktionierung wurde das Gewebe von 12 Wochen alten, männlichen Tieren verwendet. Für jedes Experiment wurde das Gewebe von fünf Tieren pro Genotyp gepoolt, um eine ausreichende Gewebemenge zu erhalten. Die Insulinstimulation der Proben mit 10 nM Insulin über 15 min und die anschließende Subfraktionierung konnte dreimal erfolgreich durchgeführt werden. Im Western Blot wurde dann der GLUT4-Gehalt der Fraktionen bestimmt. Als Referenz diente der GLUT4-Gehalt der Wildtyp-PM-Fraktion im Basalstadium. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 dargestellt. Zur besseren Übersicht sind in der Graphik nur die Daten für die PM-Fraktion dargestellt.

Nach der Insulinstimulation war der GLUT4-Gehalt in der PM-Fraktion der Wildtypproben auf das 1,89-Fache (± 0,72) des basalen GLUT4-Gehalts erhöht. Die Stimulation mit Insulin führte zu einer Verschiebung von GLUT4 an die Plasmamembran. Bei den Proben, die von transgenen Tieren stammten, war der GLUT4-Gehalt der PM-Fraktion im Basalstadium auf das 1,7-Fache (± 0,93) des Gehalts bei den Wildtypproben erhöht. Durch die Insulinstimulation nahm der GLUT4-Gehalt auf des 2,53-Fache (± 1,27) des Gehalts der Wildtypproben im Basalstadium zu. Die Insulinstimulation führte somit auch im Fettgewebe der transgenen Tiere zu einer Verschiebung von GLUT4 zur Zellmembran. Sowohl bei den unstimulierten Proben als auch nach Insulinstimulation war der GLUT4-Gehalt

in der PM-Fraktion der transgenen Proben höher als bei den Wildtypproben. Aufgrund der breiten Streuung der Werte und der geringen Anzahl an Proben (n=3 pro Genotyp) sind die gefundenen Unterschiede jedoch nicht signifikant.

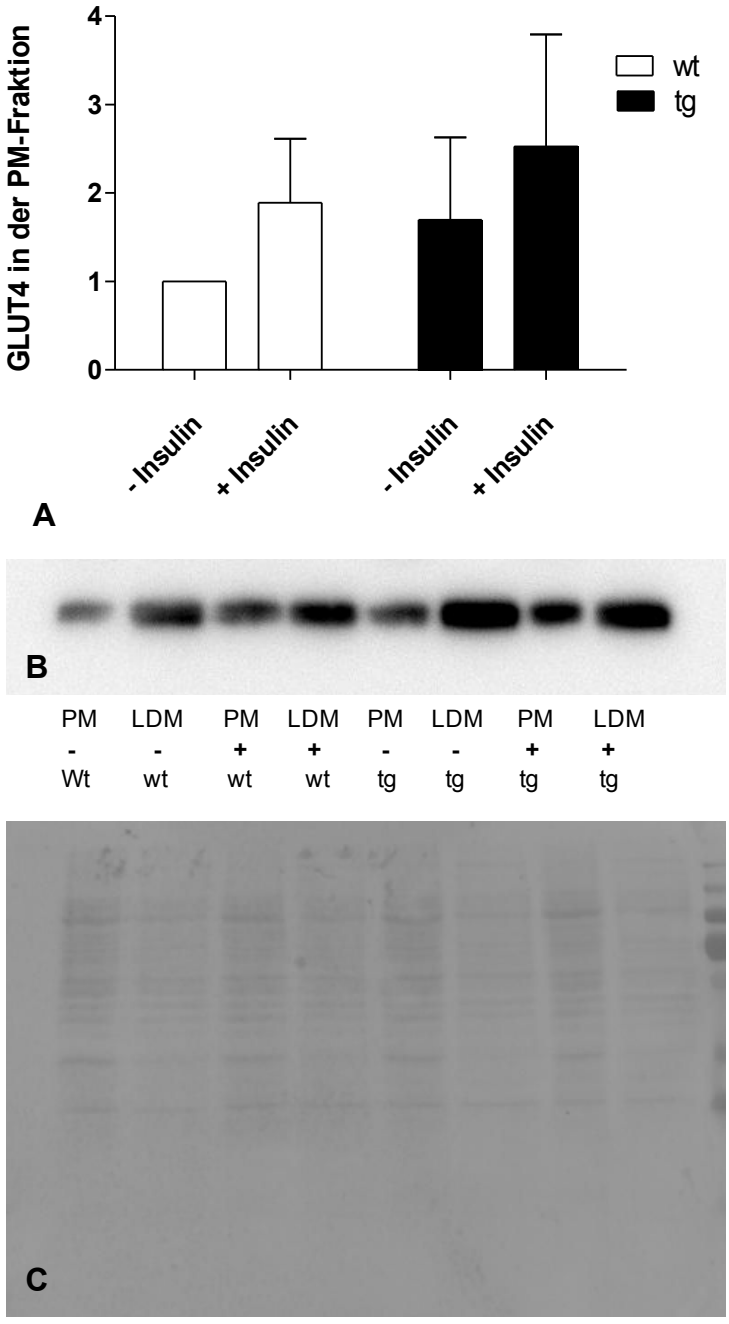


Abbildung 21 Gehalt des Glukosetransporters 4 (GLUT4) in der low density microsome (LDM)- und der Plasmamembranfraktion (PM) basal (-) und nach Stimulation mit 10 nM Insulin (+). *Die Zellfraktionen stammen von Organkulturproben, die aus den gonadalen Fettdepots 12 Wochen alter, männlicher Mäuse gewonnen wurden (Wildtyp= wt, R6/2-Q300= tg). Die Graphik (A) zeigt den GLUT4-Gehalt der PM-Fraktion basal und nach Insulinstimulation bezogen auf die Referenzprobe (wt basal). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt und stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Unterschiede sind nicht signifikant. Auf der Western-Blot-Membran (B) zeigen sich spezifische Banden für GLUT4 bei ca. 50 kDa (B), darunter ist die Proteinfärbung zur Ladekontrolle (C) abgebildet.*

3.7. Stoffwechselveränderungen primärer Adipozyten *in vitro*

Um die funktionellen Auswirkungen der veränderten GLUT4-Expression auf die metabolische Aktivität der Adipozyten zu untersuchen, wurden aus dem epididymalen Fettgewebe 12 Wochen alter, männlicher Tiere Präadipozyten isoliert und adipogen differenziert. Um eine ausreichende Gewebemenge für die Isolation zu erreichen, wurde dazu für jede Zellisolation das Gewebe von drei bis fünf Tieren gepoolt. Insgesamt konnten drei Zellisolationen aus drei unterschiedlichen Tiergenerationen erfolgreich adipogen differenziert werden.

3.7.1. Charakterisierung der primären Adipozyten

Bevor die Zellen für die Stoffwechselversuche eingesetzt wurden, wurden die Differenzierungsrate und der Triglyceridgehalt der Zellen bestimmt. Anhand der Differenzierungsrate wurde die durchschnittliche Adipozytenzahl pro Well errechnet, die zur Normierung der Ergebnisse aus den Stoffwechselversuchen verwendet wurde.

3.7.1.1. Differenzierungsrate

Am 7. Tag nach Induktion der adipogenen Differenzierung zeigten die Wildtyp-zellen eine mittlere Differenzierungsrate von 68 % (± 0,13). Bei den Zellen, die aus dem Fettgewebe transgener Tiere isoliert wurden, war die Differenzierungsrate mit durchschnittlich 55 % (± 0,11) höchst signifikant erniedrigt (P < 0,001).

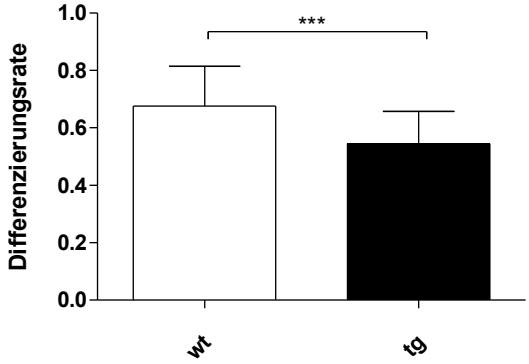


Abbildung 22 Differenzierungsrate der primären Adipozyten an Tag 7 nach Induktion der adipogenen Differenzierung*. Die Vorläuferzellen wurden aus den gonadalen Fettdepots 12 Wochen alter, männlicher Wildtyp- (wt) und R6/2-Q300-Mäuse (tg) isoliert. Der Unterschied ist mit P < 0,001 (***) höchst signifikant.*

Die unterschiedlichen Differenzierungsraten zeigten sich auch in der Oil-Red-Färbung, bei der selektiv die Triglyceride in den differenzierten Adipozyten angefärbt wurden. In der Übersichtsaufnahme (Abb. 23) zeigt sich eine intensivere Rotfärbung im Well mit den Wildtypzellen, was einem höheren Anteil differenzierter, lipidhaltiger Zellen gegenüber dem Well mit den transgenen Zellen entspricht. Bei 10-facher Vergrößerung der gefärbten Zellen stellt sich ebenfalls die geringere Differenzierungsrate der transgenen Zellen dar. Zudem erscheinen die Lipidtröpfchen in den Wildtypzellen etwas größer, was auf einen höheren Triglyceridgehalt der Wildtypzellen hindeutet.

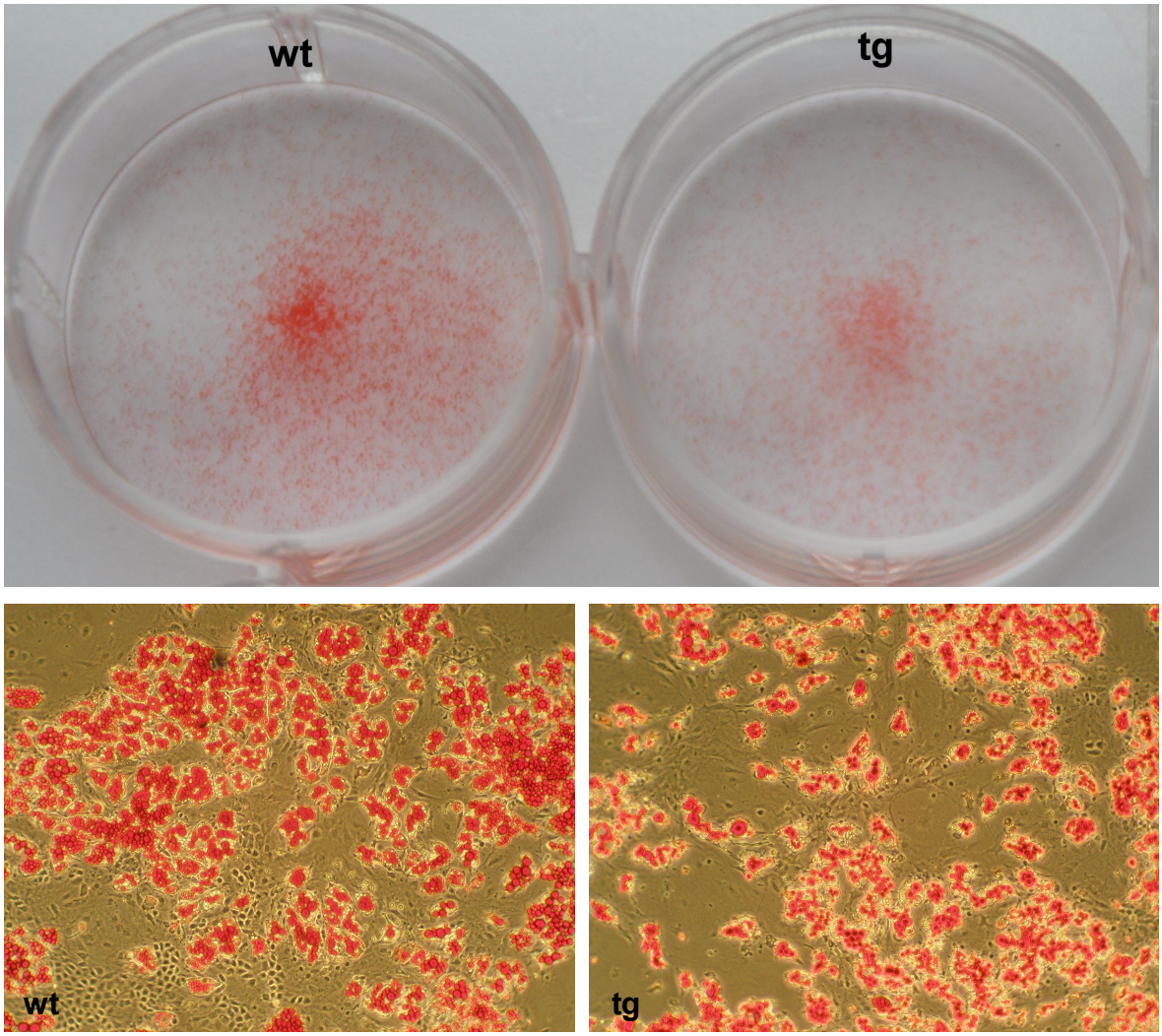


Abbildung 23 Lipidfärbung mit Oil Red *in der Übersicht und bei 10-facher Vergrößerung. Die Adipozyten wurden an Tag 7 der adipogenen Differenzierung gefärbt. Die Vorläuferzellen stammten aus den gonadalen Fettdepots 12 Wochen alter, männlicher R6/2-Q300-Mäuse (tg) und aus dem Gewebe gleichaltriger Wildtypmännchen (wt).*

3.7.1.2. Triglyceridgehalt der differenzierten Adipozyten

Um den mikroskopischen Eindruck, dass die Wildtypzellen mehr Lipide enthalten, zu bestätigen, wurde der Triglyceridgehalt der differenzierten Zellen an Tag 7 der adipogenen Differenzierung bestimmt. Für die Bestimmung wurden 6 Proben von Wildtypzellen und 7 Proben transgener Zellen, die aus zwei unterschiedlichen Zellisolationen stammten, verwendet.

Da die Zellqualität bei den beiden Isolationen unterschiedlich war, schwankte der absolute Triglyceridgehalt pro 10^4 differenzierter Adipozyten. Bei der ersten Isolation betrug der Triglyceridgehalt der Wildtypzellen (n=2) 383,8 µg/10^4 Adipozyten (± 90,9). Der Triglyceridgehalt der transgenen Zellen (n=3) lag bei 212,4 µg/10^4 Adipozyten (± 25,1). Bei der zweiten Isolation lag der Triglyceridgehalt der Wildtypproben (n=4) bei 191,1 µg/10^4 Adipozyten (± 22,45). Der Triglyceridgehalt der transgenen Zellproben (n=4) war geringer und lag bei 145,5 µg/10^4 Adipozyten (± 19,17). Der P-Wert lag mit 0,057 knapp über dem Signifikanzniveau.
Um die Ergebnisse beider Isolationen vergleichen zu können, wurden die Werte für den Triglyceridgehalt in Bezug zum Mittelwert der Wildtypproben aus der jeweiligen Zellisolation gesetzt. Die Auswertung zeigte, dass der Triglyceridgehalt der transgenen Zellen nur das 0,67-Fache (± 0,14) des Triglyceridgehalts der Wildtypzellen betrug, und damit hoch signifikant erniedrigt war (P < 0,01).

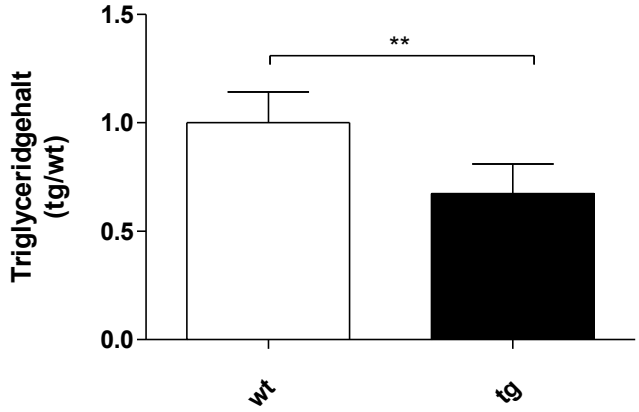


Abbildung 24 Erniedrigter Triglyceridgehalt (TG) in R6/2-Q300-Adipozyten. *Der TG wurde an Tag 7 der adipogenen Differenzierung bestimmt. Die Vorläuferzellen stammen aus den gonadalen Fettdepots 12 Wochen alter, männlicher R6/2-Q300-Mäuse (tg) und aus dem Gewebe gleichaltriger Wildtypmännchen (wt). Der TG-Gehalt der R6/2-Q300-Zellen wurde im Verhältniss zum mittleren TG-Gehalt der wt-Zellen gesetzt und ist hoch signifikant erniedrigt, P < 0,01 (**). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt.*

3.7.2. Insulinstimulierte Glukoseaufnahme

Die basale Glukoseaufnahme und die Glukoseaufnahme 15 min nach Gabe eines Insulinstimulus wurden anhand der Aufnahme radioaktiver ^{14}C-DOG bestimmt. Die gemessene Radioaktivität in den Zellen wird dabei als counts-per-minute (cpm) angegeben.

Für die basale Glukoseaufnahme sowie die insulinstimulierte Aufnahme bei einer Insulinkonzentration von 10^{-10} M und 10^{-7} M konnten je drei Werte aus drei unabhängigen Experimenten ausgewertet werden. Für die Insulinkonzentrationen von 10^{-9} M und 10^{-8} M wurden je drei Werte aus zwei unterschiedlichen Experimenten gemessen. Die cpm-Werte der Proben wurden anhand der Differenzierungsrate auf cpm/ 10^4 Adipozyten normiert. Die Ergebnisse mit Standardabweichung sowie der statistischen Auswertung mit dem Two-Way-ANOVA-Test sind in Abb. 25 dargestellt. Zusätzlich wurden die Daten als Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt (Abb. 26).

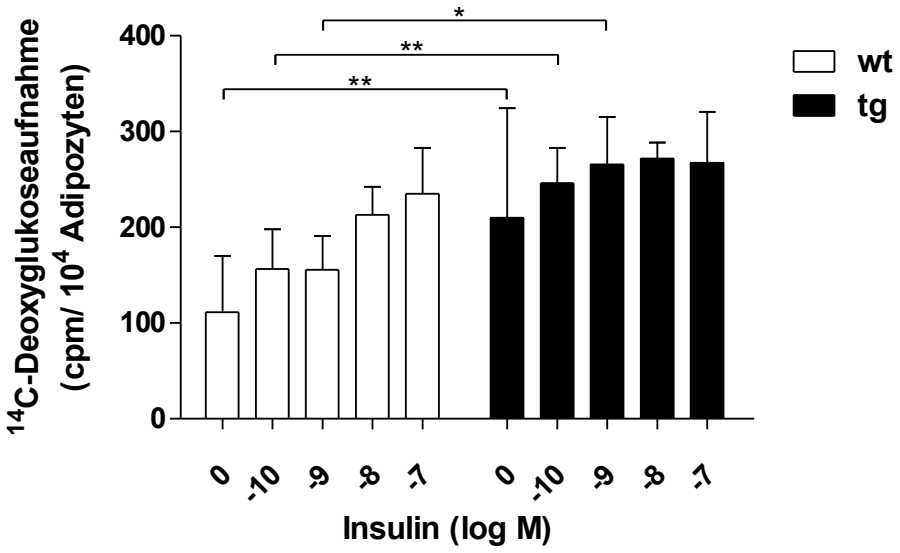


Abbildung 25 Basale und insulinstimulierte Glukoseaufnahme in Adipozyten an Tag 8 der adipogenen Differenzierung. *Die Vorläuferzellen stammen aus den gonadalen Fettdepots 12 Wochen alter, männlicher R6/2-Q300-Mäuse (tg) und aus dem Gewebe gleichaltriger Wildtypmännchen (wt). Als Maß für die Glukoseaufnahme diente die von den Zellen abgegebene β-Strahlung nach Inkubation mit ^{14}C-Deoxyglukose, die als „counts-per-minute" (cpm) wird. Die Werte wurden auf 10^4 Adipozyten normiert, P < 0,05 (*), P < 0,01 (**). Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt und stammen aus drei unabhängigen Experimenten.*

Die basale Glukoseaufnahme der transgenen Zellen war mit 209,9 (± 114,5) cpm/ 10^4 Adipozyten signifikant höher als die basale Glukoseaufnahme der Wildtypzellen mit 111,2 (± 59,1) cpm/ 10^4 Adipozyten ($P < 0,01$). Die insulin-stimulierte Glukoseaufnahme der transgenen Zellen war bei Insulin-konzentrationen von 10^{-10} M und 10^{-9} M ebenfalls signifikant höher als bei den Wildtypzellen. Nach Stimulation mit 10^{-8} M und 10^{-7} M Insulin war der Unterschied zu den Wildtypzellen statistisch nicht signifikant.

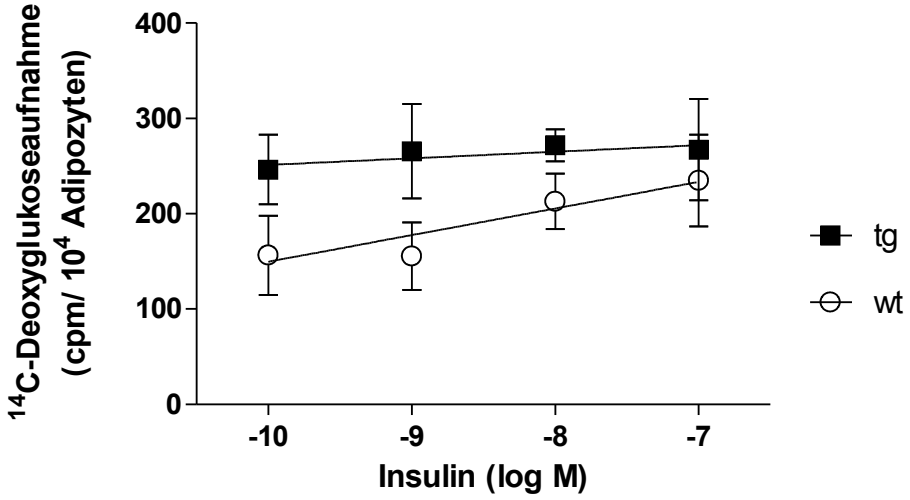


Abbildung 26 Dosis-Wirkungs-Beziehung von Insulinkonzentration und Glukoseaufnahme in Adipozyten an Tag 8 der adipogenen Differenzierung. *Die Vorläuferzellen stammen aus den gonadalen Fettdepots 12 Wochen alter, männlicher R6/2-Q300-Mäuse (tg) und aus dem Gewebe gleichaltriger Wildtypmännchen (wt). Maß für die Glukoseaufnahme ist die β-Strahlung, die nach Inkubation mit ^{14}C-Deoxyglukose von den Zellen abgegeben wird und die als „counts-per-minute" (cpm) angegeben wird. Steigung der wt-Gerade: 27,91; Steigung der tg Gerade: 6,91. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten und sind mit Standardabweichung dargestellt.*

Die Dosis-Wirkungs-Kurve von Insulin zeigt bei den Wildtypzellen über alle getesteten Insulinkonzentrationen hinweg eine Zunahme der Glukoseaufnahme mit ansteigender Insulinkonzentration. Auch bei unphysiologisch hohen Insulinkonzentrationen von 10^{-8} M und 10^{-7} M stieg die Glukoseaufnahme von 213 (± 29,1) cpm/ 10^4 Adipozyten auf 234,9 (± 48) cpm/ 10^4 Adipozyten weiter an. Bei den transgenen Zellen wurde eine vergleichbare Glukoseaufnahme mit 246,3 (± 36,4) cpm/ 10^4 Adipozyten bereits bei der niedrigsten getesteten Insulinkonzentration von 10^{-10} M erreicht. Die Dosis-Wirkungs-Kurve der transgenen Zellen verläuft deutlich flacher und ab einer Insulinkonzentration von 10^{-9} M scheint die maximale Glukoseaufnahme der transgenen Zellen erreicht zu sein.

3.7.3. De-Novo-Lipogenese

Um Unterschiede zwischen transgenen und Wildtypzellen in der weiteren Verstoffwechselung der aufgenommenen Glukose zu untersuchen, wurde neben der Glukoseaufnahme auch die De-Novo-Lipogenese über einen Zeitraum von 24 h bestimmt.

Die basale Lipogenese und die Lipogenese bei Stimulation mit 10^{-7} M Insulin wurden bei jedem Genotyp in je drei Proben aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Da nicht bei allen Isolationen eine ausreichende Menge an Zellen verfügbar war, konnten nach Stimulation mit 10^{-10} M Insulin nur je drei Proben aus zwei unterschiedlichen Isolationen gemessen werden. Für die Stimulation mit 10^{-9} M Insulin standen drei Wildtypproben aus einer Isolation und je drei transgene Proben aus zwei verschiedenen Isolationen zur Verfügung. Die Lipogenese bei einer Insulinkonzentration von 10^{-8} M wurde in drei Proben, die aus einer Isolation stammten, gemessen.

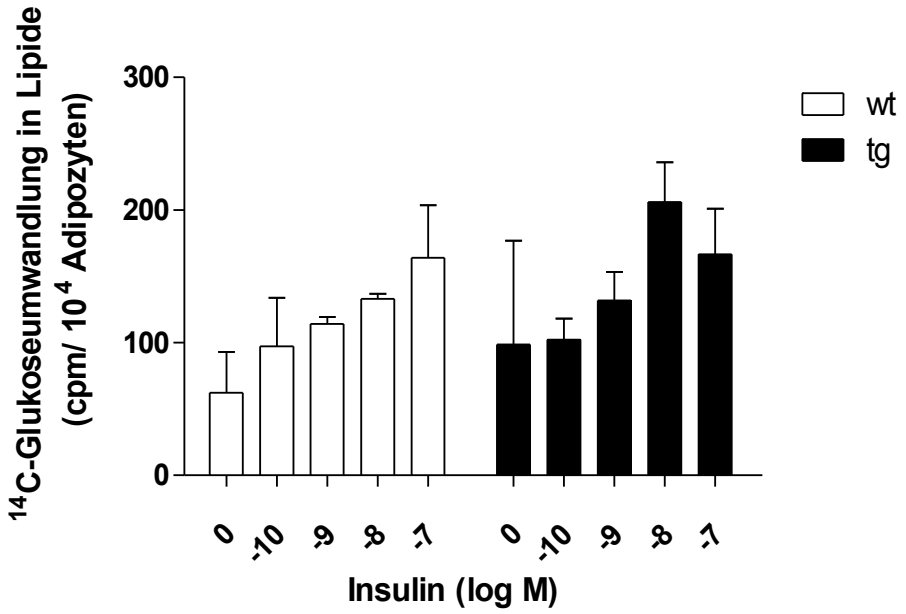


Abbildung 27 Basale und insulinstimulierte De-Novo-Lipogenese der Adipozyten an Tag 8 der adipogenen Differenzierung. *Die Vorläuferzellen wurden aus den gonadalen Fettdepots 12 Wochen alter, männlicher R6/2-Q300- Mäuse (tg) und aus dem Gewebe gleichaltriger Wildtypmännchen (tg) isoliert. Zur Quantifizierung der Lipogenese wurde die β-Strahlung, die die Adipozyten nach 24-stündiger Inkubation mit ^{14}C-Glukose abgaben, genutzt. Maß für die β-Strahlung sind die „counts-per-minute" (cpm). Die cpm-Werte wurden auf 10^4 Adipozyten normiert und sind mit Standardabweichung dargestellt. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Unterschiede sind nicht signifikant.*

Die basale Lipogenese war bei den transgenen Zellen mit 98,6 (± 26,1) cpm/ 10^4 Adipozyten gegenüber 62,3 (± 10,3) cpm/ 10^4 Adipozyten bei den Wildtypzellen zwar erhöht, der Anstieg ist aber deutlich geringer als bei der Glukoseaufnahme. Die insulininduzierte Zunahme der Lipogenese war bei den transgenen Zellen geringer ausgeprägt als bei den Wildtypzellen. Der Unterschied bei der Lipogenese war im Gegensatz zur Glukoseaufnahme nicht signifikant, was durch die höhere Anzahl fehlender Werte und die größere Streuung bedingt sein kann.

Bei intakter zellulärer Triglyceridsynthese geht eine erhöhte Glukoseaufnahme mit einer erhöhten De-Novo-Lipogenese einher. Betrachtet man das Verhältnis der Lipogenese zur Glukoseaufnahme, zeigt sich, dass bei fast allen Insulinkonzentrationen der Anteil der Glukose, die zu Lipiden umgewandelt wird bei den transgenen Zellen geringer ist als bei den Wildtypzellen. Eine Ausnahme bildete die Messung bei einer Insulinkonzentration von 10^{-8} M, bei der die transgenen Zellen eine auffallend hohe Lipogenese zeigten.

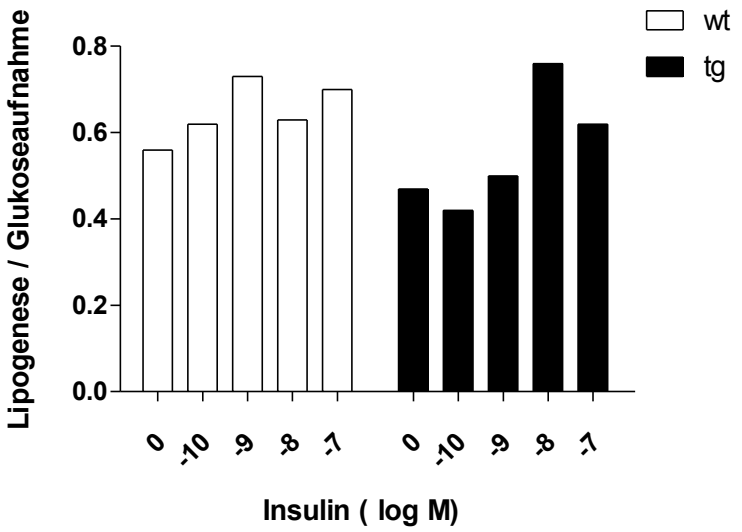


Abbildung 28 Verhältnis von Lipogenese zur Glukoseaufnahme in Adipozyten bei verschiedenen Insulinkonzentrationen an Tag 8 der adipogenen Differenzierung. *Die Vorläuferzellen wurden aus den gonadalen Fettdepots 12 Wochen alter, männlicher R6/2-Q300- Mäuse (tg) und aus dem Gewebe gleichaltriger Wildtypmännchen (wt) isoliert. Für die Darstellung wurden die mittlere De-Novo-Lipogenese im Verhältnis zur mittleren Glukoseaufnahme bei gleicher Insulinkonzentration gesetzt.*

3.7.4. Basale Lipolyse der Zellen

Zur Differenzierung, ob bei den transgenen Zellen eine Veränderung der basalen Lipolyse zu dem erniedrigten relativen Triglyceridgehalt beitragen, wurde die basale lipolytische Aktivität der Zellen untersucht. Dazu wurde der Glyceringehalt an Tag 7 der adipogenen Differenzierung in 12 Mediumproben pro Genotyp, die aus drei unterschiedlichen Experimenten stammten, bestimmt.
Der mittlere Glyceringehalt der Wildtypproben lag bei 30,5 (± 27,8) µM Glycerin/ 10^4 Adipozyten. Bei den transgenen Proben lag der Glyceringehalt durchschnittlich bei 28 (± 19,7) µM Glycerin/ 10^4 Adipozyten.

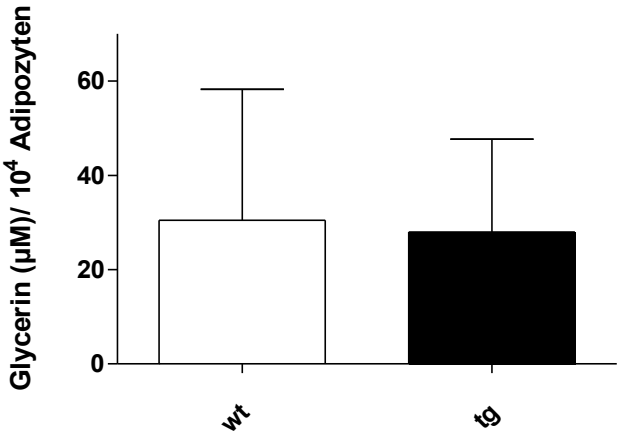


Abbildung 29 Glyceringehalt im Medium an Tag 7 der adipogenen Differenzierung. *Für das Experiment wurden aus den gonadalen Fettdepots 12 Wochen alter, männlicher Mäuse (Wildtyp= wt, R6/2-Q300 =tg) Adipozytenvorläufer isoliert und adipogen differenziert. Nach Abschluss der Differenzierung wurde der Glyceringehalt im Medium bestimmt und auf 10^4 Adipozyten normiert. Die Daten sind mit Standardabweichung dargestellt und stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen den wt- und tg-Proben.*

Bei der Auswertung fiel auf, dass der mittlere Glyceringehalt bei zwei Experimenten im Bereich von ca. 5-10 µM/ 10^4 Adipozyten lag. Die Werte aus dem dritten Experiment waren etwa um den Faktor 10 höher, was zu der großen Streuung der Werte führt. Mögliche Ursache der Abweichung könnte ein Verdünnungsfehler bei der Messung sein. Um diesen Effekt auszuschließen, wurden die Daten aus den einzelnen Experimenten in Bezug zum Mittelwert der Wildtypproben aus dem jeweiligen Experiment gesetzt und erneut verglichen. Die erneute Auswertung ergab bei den transgenen Proben einen 1,45-fach erhöhten Glyceringehalt im Vergleich zu den Wildtypproben. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (P= 0,60).

4. Diskussion

4.1. CAG-Wiederholungen im Exon 1

4.1.1. Zunahme der CAG-Wiederholungen bei den Versuchstieren

Die Abschätzung der CAG-Wiederholungszahl in den untersuchten Mausgenerationen zeigte, dass es in der Laborzucht über die Zuchtgenerationen hinweg zu einer Längenzunahme des CAG-Abschnittes im transgenen Exon 1 gekommen war. Die CAG-Abschnitte der Versuchstiere zeigten mit 255 bis 288 CAG-Wiederholungen deutlich mehr als die 145 CAG-Wiederholungen, die ursprünglich für das R6/2-Modell beschrieben wurden (Mangiarini et al. 1996). Die beiden Tiere aus der ersten Zuchtgeneration zeigten dagegen mit 110 Wiederholungen eine Verkürzung des CAG-Abschnitts im Exon 1.

Die Instabilität der CAG-Abschnitte ist typisch für das R6/2-Mausmodell und wurde erstmals 1997, im Jahr nach der Etablierung des Modells, durch Mangiarini et al. beschrieben. Durch die Instabilität kommt es bei der paternalen Vererbung des transgenen Exon 1 zu einer Zunahme der CAG-Wiederholungen (Mangiarini et al. 1997). Die in dieser Arbeit untersuchten Versuchstiere stammten aus direkt aufeinander folgenden Generationen. Da die mittlere Zunahme bei der paternalen Vererbung etwa 1-3 CAG-Tripletts pro Generation beträgt (Morton et al. 2009), war die Varianz der CAG-Wiederholungen (255 bis 288) innerhalb der untersuchten Generationen gering.

Im Gegensatz zur Längenzunahme der CAG-Abschnitte bei der paternalen Vererbung des Exon 1, nimmt bei der Zucht mit F1BL6/CBA-Weibchen, denen die Ovarien transgener R6/2-Tiere transplantiert wurden, die Anzahl der CAG-Wiederholungen ab (Cummings et al. 2012). Die Verkürzung der CAG-Abschnitte auf 110 Wiederholungen bei den Tieren der ersten Zuchtgeneration kann dadurch erklärt werden, dass es sich bei den gekauften Zuchttieren um Nachkommen ovarialtransplantierter Tiere handelte.

4.1.2. Auswirkungen auf den Phänotyp

Die Auswirkungen der verlängerten CAG-Abschnitte auf den Phänotyp der R6/2-Mäuse wurden inzwischen in mehren Publikationen beschrieben (Dragatsis et al. 2009; Morton et al. 2009; Cummings et al. 2012). Die Zunahme der CAG-Wiederholungen verlängert das Überleben der R6/2-Tiere und hat somit einen protektiven Effekt. Die Verlängerung der Lebensspanne ist dabei umso ausgeprägter, je länger die CAG-Abschnitte im Exon 1 der Tiere sind. Bei Tieren mit weniger als 300 CAG-Wiederholungen verlängert sich die Lebenszeit moderat auf ca. 16 Wochen, bei Tieren mit über 300 CAG-Wiederholungen steigt sie sprunghaft an und kann bei Tieren mit extrem langen CAG-Abschnitten (CAG> 400) bis zu 86 Wochen erreichen (Dragatsis et al. 2009; Morton et al. 2009). Die motorische Manifestation mit Muskelschwäche, Clasping und erhöhter Krampfneigung ist bei den Tieren mit verlängerten CAG-Abschnitten verzögert und die typischen elektrophysiologischen Veränderungen sind umso schwächer ausgeprägt, je länger die CAG-Abschnitte sind (Morton et al. 2009; Cummings et al. 2012). Zudem führen die verlängerten CAG-Abschnitte zu einem veränderten Muster der intrazellulären huntingtin-positiven Aggregate in den Neuronen mit einer Reduktion intranukleärer und einer Zunahme extranukleärer Aggregate (Dragatsis et al. 2009; Morton et al. 2009; Cummings et al. 2012).

Wie sich die verlängerten CAG-Abschnitte auf den Phänotyp peripherer Gewebe auswirken, wurde in den bisher vorliegenden Publikationen nicht explizit untersucht. Der für R6/2-Mäuse typische Gewichtsverlust ist jedoch bei Tieren mit verlängerten CAG-Abschnitten weniger ausgeprägt und beginnt später als bei R6/2-Tieren mit ca.150-160 CAG-Wiederholungen (Morton et al. 2009; Cowin et al. 2011; Cummings et al. 2012).

Cummings et al. untersuchten den Gewichtsverlauf bei Tieren mit vier unterschiedlich langen CAG-Abschnitten (CAG110, CAG160, CAG210, CAG310). Bei den Tieren mit 210 und 310 CAG-Tripletts zeigte sich im Alter von 8 Wochen, wie bei der in dieser Arbeit untersuchten Mauskohorte, kein signifikanter Gewichtsverlust gegenüber den Wildtyptieren. Im Alter von 12 Wochen zeigte sich bei den CAG210- und CAG310-Mäusen ebenfalls ein signifikanter Gewichtsverlust

gegenüber den Wildtyptieren, der bei männlichen Tieren jedoch ausgeprägter war als bei weiblichen (Cummings et al. 2012). Das trifft auch auf die Ergebnisse dieser Arbeit zu, die bei den 12 Wochen alten, weiblichen Tieren kein signifikant reduziertes Gewicht zeigten.
Den deutlichsten Gewichtsverlust zeigten in der Untersuchung von Cummings die R6/2-Mäuse mit 160 CAG-Tripletts, am geringsten war der Gewichtsverlust bei den Tieren mit 310 CAG-Tripletts (Cummings et al. 2012). Dies deutet darauf hin, dass der protektive Effekt der verlängerten CAG-Abschnitte auch in Geweben, die an der Gewichtsregulation beteiligt sind, eine Rolle spielt.

Um den Effekt der verlängerten CAG-Abschnitte im Exon 1 auf die GLUT4-Expression im Fettgewebe beurteilen zu können, wurde in einem zusätzlichen Experiment der GLUT4-Gehalt in weißem und braunem Fettgewebe männlicher R6/2-Tiere mit 160 CAG-Tripletts bestimmt. In beiden Geweben zeigte sich bei den CAG160-Mäusen eine stärkere Erhöhung der GLUT4-Expression als bei den Tieren mit den verlängerten CAG-Abschnitten, was dafür spricht, dass die Zunahme der CAG-Wiederholungen auch in peripheren Geweben den R6/2-Phänotyp abmildert.

4.1.3. Auswirkung der verlängerten CAG-Abschnitte auf die intrazelluläre Huntingtin-Verteilung

Verlängerte CAG-Abschnitte verändern die Verteilung der transgenen Huntingtin-Fragmente in der Zelle und erschweren ihre Aufnahme in den Zellkern (Dragatsis et al. 2009). Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere lagen mit 255-288 CAG-Wiederholungen jedoch in einem Bereich, in dem noch eine Aufnahme der Huntingtin-Fragmente in die Nuklei zu erwarten ist (Dragatsis et al. 2009). In der immunhistochemischen Huntingtin-Färbung waren die Zellkerne im weißen Fettgewebe der transgenen Tiere stark Huntingtin-positiv, was für eine intranukleäre Aufnahme spricht. Intranukleäre Aggregate waren jedoch, wie bereits in den Publikationen von Sathasivam und Moffit gezeigt wurde, im weißen Fettgewebe nicht nachweisbar (Sathasivam et al. 1999 ; Moffitt et al. 2009). Die von Moffitt et al. untersuchten Tiere zeigten dabei mit 272 CAG-Wiederholungen gleich lange Polyglutaminabschnitte wie unsere Versuchstiere.

4.1.4. Bedeutung der Anzahl der CAG-Wiederholungen für die Interpretation der Ergebnisse

Die ursprünglichen R6/2-Mäuse mit 145 CAG-Wiederholungen und Mauslinien mit moderat verlängerten CAG-Abschnitten entwickeln den gleichen Phänotyp bezüglich der motorischen Manifestation und des Körpergewichts. Bei den Tieren mit den verlängerten CAG-Abschnitten zeigen sich die Veränderungen jedoch später und sind weniger ausgeprägt (Menalled et al. 2009). Der schwächere Phänotyp kann bei Experimenten, die Unterschiede zwischen Wildtypmäusen und transgenen Tieren identifizieren sollen, ein Nachteil sein, da die Unterschiede zu den Wildtyptieren schwächer und so schwerer nachweisbar sein können.
Tatsächlich zeigen R6/2-Tiere mit 160 CAG-Wiederholungen eine stärker erhöhte GLUT4-Expression im Fettgewebe im Vergleich zu Wildtyptieren als die Tiere mit den verlängerten CAG-Abschnitten (R6/2-Q300). Daher ist anzunehmen, dass die Unterschiede, die sich in den weiteren Experimenten zeigten, beim „original“ R6/2-Mausmodell ebenfalls ausgeprägter wären.

Der Effekt der Anzahl der CAG-Wiederholungen im Exon 1 auf die Ausprägung von Merkmalen muss zudem beim Vergleich der Daten mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten beachtet werden, da Publikationen zu R6/2-Mäusen mit unterschiedlichen CAG-Wiederholungszahlen existieren. So wurden z.B. in einer Publikation von van der Burg Stoffwechselveränderungen bei R6/2-Mäusen mit 247-277 CAG-Tripletts (van der Burg et al. 2008) und in einer Publikation von Goodman bei Mäusen mit 250-280 CAG-Tripletts (Goodman et al. 2008) untersucht.

Die ursprünglichen R6/2-Mäuse haben eine Lebenserwartung von etwa 14 Wochen (Stack et al. 2005) und befinden sich im Alter von 12 Wochen bereits im Endstadium der Erkrankung. Die Differenzierung zwischen direkten Effekten des Genotyps und sekundären, präfinalen Veränderungen in diesem Stadium ist schwierig. Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere mit den verlängerten CAG-Abschnitten haben eine höhere Lebenserwartung und hatten damit zum Zeitpunkt der Experimente im Alter von 8 und 12 Wochen das finale Krankheitsstadium noch nicht erreicht. Die Veränderungen, die sich bei den Experimenten zeigten, stellen

somit Eigenschaften des R6/2-Phänotyps dar und sind nicht ausschließlich als präfinal zu bewerten.

4.2. Veränderte GLUT4-Expression im Fettgewebe

4.2.1. Einfluss des Geschlechts auf die GLUT4-Expression

Sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen transgenen Tieren zeigte sich eine veränderte GLUT4-Expression im weißen Fettgewebe. Die Veränderung war jedoch geschlechtsspezifisch: Während der GLUT4-Gehalt im WAT der männlichen transgenen Tiere erhöht war, zeigte das WAT der weiblichen transgenen Tiere einen deutlich niedrigeren GLUT4-Gehalt. Um Erklärungen für den unerwarteten, gegensätzlichen Effekt bei männlichen und weiblichen Tieren zu finden, wurde eine Literaturrecherche zur geschlechtsspezifischen GLUT4-Expression in weißem Fettgewebe bei Mäusen durchgeführt, die jedoch ergebnislos blieb. Darum wurde in einem zusätzlichen Experiment die GLUT4-Expression im Fettgewebe von Wildtyptieren im Geschlechtsvergleich untersucht. Dabei zeigte sich eine höhere GLUT4-Expression im Fettgewebe der weiblichen Wildtyptiere und eine Umkehr des Verhältnisses bei den transgenen Tieren. Das deutet darauf hin, dass geschlechtsspezifische hormonelle Faktoren an der Regulation von GLUT4 beteiligt sind, die bei den R6/2-Tieren gestört sein könnten.

Eine mögliche Hypothese könnte auf einem veränderten Östrogenspiegel bei den weiblichen R6/2-Mäusen beruhen. Östrogen erhöht über den Östrogenrezeptor α (ERα) die GLUT4-Expression in weißem Fettgewebe (Barros et al. 2009). Aktuell liegt keine Publikation zum Östrogenspiegel weiblicher R6/2-Mäuse vor. Die Infertilität der weiblichen R6/2-Mäuse (Mangiarini et al. 1996) und erniedrigte GnRH-Spiegel (Papalexi et al. 2005) deuten jedoch auf eine gestörte Ovarialfunktion mit reduzierten Östrogenspiegeln hin. Ein verminderter Östrogenspiegel bietet somit eine mögliche Erklärung für die verminderte GLUT4-Expression weiblicher transgener Tiere.
Es ist wahrscheinlich, dass die verminderte GLUT4-Expression im Gewebe der weiblichen Tiere zu einer reduzierten Glukoseaufnahme in die Adipozyten führt, unabhängig von der Insulinsensitivität des Gewebes. Da jedoch die Beurteilung

der Insulinsensitivität des Fettgewebes mit zur Fragestellung der Arbeit gehörte, wurden die *In-vitro*-Versuche zur Glukoseaufnahme und zur GLUT4-Translokation mit dem Gewebe männlicher Tiere durchgeführt.

4.2.2. Mögliche Ursachen der veränderten GLUT4-Expression

Die Regulation der GLUT4-Expression ist komplex und im Moment noch nicht vollständig erforscht. Als Ursache für die veränderte GLUT4-Expression im Fettgewebe der R6/2-Mäuse sind Mechanismen auf unterschiedlichen Ebenen denkbar: Primäre Effekte von mutantem Huntingtin auf Regulatoren der GLUT4-Expression, eine veränderte GLUT4-Expression als sekundäre Antwort auf eine Huntingtin-induzierte Zellschädigung sowie der Einfluss systemischer, hormoneller Faktoren.

Auf der regulatorischen Ebene kommt eine Interaktion von mutantem Huntingtin mit PPARγ-vermittelten Regulationsmechanismen als Erklärung für die erhöhte GLUT4-Expression im Gewebe der männlichen Tiere in Frage. PPARγ aktiviert in Verbindung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) als Heterodimer ein PPRE in der Promoterregion des GLUT4-Gens und vermittelt so eine Repression von GLUT4 (Armoni et al. 2003). Die Aufhebung der PPARγ-induzierten Repression führt zu einer vermehrten Expression von GLUT4 in Adipozyten (Armoni et al. 2006). Die Expression von mutantem Huntingtin in Adipozyten stört die PGC-1α-vermittelte Co-Aktivierung des PPRE (Phan et al. 2009). Zudem ist die Expression von PPARγ2 im Fettgewebe der R6/2-Mäuse reduziert (Phan et al. 2009). Beide Faktoren könnten zu einer Abschwächung der PPARγ-vermittelten GLUT4-Repression und damit zu einer vermehrten GLUT4-Expression führen.

Die vermehrte GLUT4-Expression bei den männlichen, transgenen Tieren lässt sich im braunen Fettgewebe bereits bei 8 Wochen alten Tieren nachweisen. Im weißen Fettgewebe zeigt sich die erhöhte GLUT4-Expression nur bei den 12 Wochen alten Tieren. Bei den männlichen R6/2-Tieren mit 160 CAG-Wiederholungen war die GLUT4-Expression sowohl im braunen als auch im weißen Fettgewebe erhöht, die Veränderung im braunen Fettgewebe war jedoch ausgeprägter.

Auch bei den weiblichen Tieren bestand ein Unterschied zwischen weißem und braunem Fettgewebe: Im braunen Fettgewebe war die GLUT4-Expression unverändert, im weißen Fettgewebe jedoch vermindert. Der morphologische und funktionelle Hauptunterschied zwischen weißem und braunem Fettgewebe besteht unter anderem in dem deutlich höheren Mitochondriengehalt des braunen Fettgewebes. Das frühere Auftreten der erhöhten GLUT4-Expression im mitochondrienreichen braunen Fettgewebe der transgenen Tiere und die stärkere Ausprägung im braunen Fettgewebe der Tiere mit 160 CAG-Wiederholungen sprechen für die Hypothese, dass die erhöhte GLUT4-Expression eine kompensatorische Reaktion auf eine mitochondriale Dysfunktion sein könnte.

Die momentan publizierten Studien zur gestörten Mitochondrienfunktion bei M. Huntington zeigen Veränderungen in Neuronen, Lymphozyten, Hepatozyten und Muskelzellen (Gu et al. 1996; Choo et al. 2004; Panov et al. 2005; Gizatullina et al. 2006). Eine mitochondriale Dysfunktion ist aber durch die Beeinträchtigung von PGC-1α, das eine entscheidende Rolle bei der mitochondrialen Biosynthese spielt, auch im Fettgewebe sehr wahrscheinlich (Uldry et al. 2006; Weydt et al. 2006). Die durch mutantes Huntingtin induzierte, mitochondriale Dysfunktion führt zu einer Störung der Atmungskettenkomplexe (Gu et al. 1996) und einer verminderten mitochondrialen Ca^{2+}-Pufferkapazität (Panov et al. 2002). Erhöhte Ca^{2+}-Spiegel im Zytosol induzieren die GLUT4-Expression (Wright 2007) und könnten bei den transgenen Tieren eine erhöhte GLUT4-Expression als sekundäre, kompensatorische Antwort auf die mitochondriale Dysfunktion auslösen.

Die unter Punkt 4.2.1 diskutierte Veränderung des Östrogenspiegels stellt eine Erklärungshypothese auf systemischer, hormoneller Ebene dar. Im Fettgewebe *in vivo* liegt wahrscheinlich ein komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Regulationsmechanismen vor. Eine Erklärungshypothese für die geschlechts-spezifische Veränderung der GLUT4-Regulation wäre das Überwiegen zellulärer Regulationsmechanismen im Fettgewebe der männlichen Tiere und im Gegensatz dazu ein größerer Einfluss hormoneller Faktoren im Fettgewebe der weiblichen Tiere.

4.2.3. Glukoseaufnahme, insulininduzierte GLUT4-Translokation und Insulinsensitivität *in vitro*

Für die Glukoseaufnahme in das Fettgewebe ist neben dem Gehalt an GLUT4 im Gewebe in erster Linie die Lokalisation der Glukosetransporter in der Zelle entscheidend, denn nur an der Plasmamembran liegende GLUT4-Transporter tragen zur Glukoseaufnahme bei (Bryant et al. 2002). Da die Darstellung der GLUT4-Lokalisation im Gewebe durch eine Färbung im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang, wurde der GLUT4-Gehalt in der Plasmamembranfraktion subfraktionierter Gewebeproben bestimmt. Dabei zeigte sich ein tendenziell erhöhter GLUT4-Gehalt in der Plasmamembranfraktion der transgenen Tiere, die Daten waren jedoch statistisch nicht signifikant. Die im Basalzustand signifikant erhöhte Glukoseaufnahme der transgenen Adipozyten, die sich bei den Glukose-Uptake-Assays *in vitro* zeigte, spricht jedoch dafür, dass die vermehrt exprimierten GLUT4-Transporter im Gewebe der transgenen Mäuse im Basalzustand in der Zellmembran lokalisiert sind und zu der erhöhten basalen Glukoseaufnahme führen.

Die Glukoseaufnahme der transgenen Adipozyten wurde durch die Stimulation mit 10^{-10} M Insulin auf das 1,17-Fache des Ausgangswerts gesteigert, bei den Wildtypzellen stieg die Glukoseaufnahme auf das 1,4-Fache des Basalwertes. Die Glukoseaufnahme bei Insulinkonzentrationen von 10^{-10} und 10^{-9} M ist bei den transgenen Zellen dennoch signifikant höher als bei den Wildtypzellen. Dieser Unterschied resultiert jedoch aus der erhöhten basalen Glukoseaufnahme. Die Dosis-Wirkungs-Kurve von Insulin für Konzentrationen zwischen 10^{-10} und 10^{-7} M verdeutlicht, dass die insulininduzierte Steigerung der Glukoseaufnahme bei den transgenen Zellen deutlich geringer ausfällt als bei den Wildtypzellen. *In vitro*, unter standardisierten hormonellen Bedingungen, zeigte sich damit bei den isolierten Adipozyten der transgenen Tiere eine verminderte Antwort auf die Insulinstimulation und somit eine niedrigere Insulinsensitivität.

Björkqvist et al. beschrieben 2006 eine erniedrigte systemische Insulinsensitivität von R6/2-Mäusen mit einer verminderten Reaktion auf eine intraperitoneale Insulininjektion und erklärten diese als sekundären Effekt des Hypercortisolismus,

der bei den R6/2-Mäusen vorliegt (Björkqvist et al. 2006). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die periphere Insulinsensitivität auch unabhängig von der systemischen hormonellen Situation vermindert ist.

Die Untersuchung der Glukoseumwandlung zu Laktat in Organkulturen aus isolierten gonodalen Fettdepots von Fain zeigte eine höhere basale Umwandlung im Gewebe der transgenen Tiere und eine weitere Zunahme bei Stimulation mit 10 nM Insulin (Fain et al. 2001). Fain berichtete daher von einer erhaltenen peripheren Insulinsensitivität. Die isolierte Betrachtung der Glukoseaufnahme bei 0 und 10 nM Insulin in den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt dasselbe Bild. In der Darstellung der Daten als Dosis-Wirkungs-Kurve über vier unterschiedliche Insulinkonzentrationen zeigt sich jedoch das verminderte Ansprechen der transgenen Zellen auf Insulin.

Als Ursache für die verminderte Insulinwirkung kommen zahlreiche Ursachen in Frage: Zum einen könnte die Insulinsignalkaskade über den Insulinrezeptor durch mutantes Huntingtin gestört sein. Eine weitere Erklärung könnte in einer Störung des intrazellulären Transports von GLUT4 in den Adipozyten liegen. Die Arbeitsgruppe von Marian DiFiglia wies 2012 eine Störung des Transportproteins Rab11 durch mutantes Huntingtin als Ursache für den gestörten Glukosetransport in primären Neuronen nach (Li et al. 2012). Da Rab11, wie bereits in der Einleitung beschrieben, auch am Transport von GLUT4 beteiligt ist (Ishikura et al. 2008), kommt ein ähnlicher Mechanismus auch in den Adipozyten in Betracht. Wir untersuchten daher in dieser Arbeit die Expression von Rab11 im Fettgewebe, fanden aber im weißen Fettgewebe keine veränderte Expression. Mit dem verwendeten Antikörper wurde dabei nicht zwischen der GDP-beladenen, inaktiven Form und der GTP-beladenen, aktiven Form des Proteins (Li et al. 2008) unterschieden. Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit des Proteins anhand der Expression im Gewebe sind daher nicht möglich.
Die Darstellung der Kolokalisation von GLUT4 und Rab11 in den isolierten Adipozyten sollte eine genauere Aussage zur Rolle von Rab11 ermöglichen, gelang aber mit dem verwendeten Antikörper nicht. Der erhöhte GLUT4-Gehalt in der PM-Fraktion im Basalzustand kann allein durch die insgesamt erhöhte GLUT4-Expression bedingt sein. Er könnte aber auch ein Hinweis auf ein gestörtes

Recycling des Moleküls mit einer reduzierten Wiederaufnahme in intrazelluläre Kompartimente und damit für eine Transportstörung sein. Eine genaue Differenzierung ist anhand der vorliegenden Daten nicht möglich.

4.2.4. Veränderte GLUT4-Expression im Kontext der metabolischen und hormonellen Situation *in vivo*

In den pankreatischen Inselzellen der R6/2-Mäuse finden sich Huntingtin-Aggregate, die im Krankheitsverlauf zunehmen. Die Anzahl insulinhaltiger Vesikel in den β-Zellen ist reduziert und die Insulinsekretion aus isolierten β-Zellen *in vitro* vermindert (Andreassen et al. 2002; Björkqvist et al. 2005). Andreassen et al. fanden erniedrigte Insulin-mRNA-Spiegel und eine verminderte Expression von Transkriptionsfaktoren, die die Insulinexpression aktivieren, wie z.B. PDX-1, CBP und p300 (Andreassen et al. 2002) als Ursache für die erniedrigte Insulinsekretion. Daneben beruht die reduzierte Insulinsekretion auch auf einer gestörten Exozytose der insulinhaltigen Transportvesikel, die auf die Interaktion von mutantem Huntingtin mit β-Tubulin zurückgeführt werden kann (Smith et al. 2009).

In allen der drei oben genannten Publikationen wurde gezeigt, dass die beeinträchtigte Pankreasfunktion zu erniedrigten Plasmainsulinspiegeln bei den R6/2-Mäusen führt. Dies führt bei den R6/2-Tieren zu einem latenten Diabetes mellitus mit gestörter Glukosetoleranz nach einer intraperitonealen Glukose-injektion. Die Ausprägung und der Beginn der Glukosestoffwechselstörung ist jedoch variabel und nur eine Subpopulation von etwa 25 % der R6/2-Tiere entwickeln einen manifesten Diabetes mellitus mit dauerhaft erhöhten Blutzuckerspiegeln bei normaler Nahrungsaufnahme (Lüesse et al. 2001). Ein Faktor, der die Ausprägung der Blutzuckerveränderungen beeinflusst, sind wiederholte Verhaltenstests, die bei den Tieren eine Stressreaktion verursachen und so über eine vermehrte Cortisolausschüttung den Blutzuckerspiegel erhöhen (Hunt u. Morton 2005). Ob daneben auch andere Faktoren, wie z.B. das Geschlecht, Einfluss auf Beginn und Ausprägung der Glukosetoleranzstörung haben, geht aus der vorliegenden Literatur nicht hervor. In den Publikationen fehlen entweder die Angaben zum Geschlecht der Versuchstiere (Hurlbert et al. 1999; Andreassen et al. 2002; Hunt u Morton 2005; Smith et al. 2009) oder es

fand keine geschlechtsspezifische Stratifizierung statt (Björkqvist et al. 2005, Björkqvist et al. 2006).

Die vermehrte GLUT4-Expression im Fettgewebe der männlichen Tiere und die höhere basale Glukoseaufnahme in die transgenen Adipozyten *in vitro* scheinen zunächst im Widerspruch zu den erhöhten Plasmaglukosespiegeln bei R6/2-Mäusen zu stehen. Betrachtet man jedoch die hormonellen Veränderungen, die bei männlichen R6/2-Mäusen beschrieben sind, so finden sich mit dem Hypercortisolismus und den reduzierten Testosteronspiegeln zwei Faktoren, die die Insulinsensitivität des Fettgewebes reduzieren (Papalexi et al. 2005; Björkqvist et al. 2006). Bei Testosteronmangel ist zudem die pankreatische Insulinsekretion erniedrigt (Muthusamy et al. 2007). *In vivo* wird der Effekt des erhöhten GLUT4-Gehalts im Fettgewebe, der bei der erhöhten Glukoseaufnahme *in vitro* zum Tragen kommt, so wahrscheinlich durch die hormonellen Faktoren maskiert.

4.3. Veränderungen des Fettstoffwechsels

4.3.1. Veränderte Fettverteilung und histologische Unterschiede

Makroskopisch zeigten sowohl die männlichen als auch die weiblichen transgenen Tiere eine veränderte Fettverteilung. Die Masse der gonadalen Fettdepots im Verhältnis zum Körpergewicht war bei den Tieren im Alter von 12 Wochen signifikant erhöht. Der Effekt war bei den weiblichen Tieren ausgeprägter als bei den männlichen. Die veränderte Fettverteilung mit einer Vergrößerung der intraabdominellen Fettdepots ist typisch für den R6/2-Phänotyp (Fain et al. 2001; Björkqvist et al. 2006; Phan et al. 2009). Das in dieser Arbeit erhobene Gewicht der epididymalen Fettdepots der männlichen, 12 Wochen alten Tiere liegt mit durchschnittlich 0,44 g im Bereich der Daten von Fain et al., die für diese Tiere eine Fettdepotmasse von 0,42 g angeben (Fain et al. 2001).
Die oben genannten Publikationen liefern jedoch keinen Hinweis, ob der Geschlechtsunterschied mit einer Betonung des Effekts bei den weiblichen Tieren, ebenfalls typisch ist. Entweder wurden nur männliche (Fain et al. 2001) oder weibliche Tiere (Phan et al. 2009) untersucht oder die Daten wurden nicht geschlechtsspezifisch ausgewertet (Björkqvist et al. 2006). Als Erklärung für die

abdominal betonte Fettverteilung wird der erhöhte Cortisolspiegel der R6/2-Mäuse diskutiert (Björkqvist et al. 2006). Bei den männlichen transgenen Tieren könnte die vermehrte GLUT4-Expression im weißen Fettgewebe ebenfalls eine Rolle spielen, da eine Überexpression von GLUT4 im weißen Fettgewebe zu einer Gewebehyperplasie führt (Shepherd et al. 1993).

Die histologische Untersuchung des Fettgewebes zeigte bei den 12 Wochen alten, männlichen Tieren tatsächlich eine erhöhte Zellzahl im Fettgewebe, die mit einer verminderten Adipozytengröße einhergeht. Die Vergrößerung der gonodalen Fettspeicher ist somit nicht Ausdruck einer vermehrten Lipidakkumulation in bestehenden Adipozyten, sondern scheint durch eine Zunahme der Adipozytenzahl bedingt. Die verminderte Zellgröße steht im Widerspruch zu den Beobachtungen von Fain et al., die in ihrer Publikation die Adipozytengröße 12 Wochen alter Tiere in Kryoschnitten untersucht haben und die Größe der Wildtypadipozyten mit durchschnittlich 1070 µm² angeben, die der transgenen Adipozyten mit 3218 µm² (Fain et al. 2001). Dem gegenüber stehe eine durchschnittliche Fläche von 1489 µm² bei den Wildtypadipozyten und 1120 µm² bei den transgenen Adipozyten, die in dieser Arbeit aus der Anzahl der Zellanschnitte pro Fläche in Paraffinschnitten errechnet wurde. Beim Vergleich der Daten fällt auf, dass die von Fain et al anhand von Kryoschnitten ermittelte Adipozytengröße der Wildtyptiere geringer ist als die Größe, die anhand der Paraffinschnitte in dieser Arbeit ermittelt wurde. Da es bei der Paraffinfixierung zu einer Schrumpfung des Gewebes kommt, wäre eigentlich das Gegenteil zu erwarten. Um die tatsächliche Adipozytengröße zu ermitteln, sind Paraffinschnitte aufgrund der Gewebeschrumpfung nicht geeignet. Ein Vergleich der Zellzahl und der daraus errechneten Zellgröße ist aber möglich, wenn die zu vergleichenden Gewebe wie in dieser Arbeit nach dem gleichen Protokoll fixiert werden. Da Adipozyten im Fettgewebe dreidimensional angeordnet sind und dadurch die Größe der einzelnen Zellen immer von der Anschnittebene abhängt, ist das Vermessen der Zellen in zweidimensionalen Schnittbildern schwierig. Die Messmethode wird in der Publikation von Fain et al. nicht genau beschrieben, so dass nicht eindeutig geklärt werden kann, ob die abweichenden Ergebnisse allein auf methodische Unterschiede zurückzuführen sind.

Eine weitere Erklärung für die Diskrepanz wären unterschiedlich lange CAG-Abschnitte in den untersuchten Mauspopulationen; Angaben zur Anzahl der CAG-Wiederholungen fehlen jedoch in der Publikation von Fain et al.

4.3.2. Störung der adipogenen Differenzierung und der Lipidsynthese

Neben den makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen des weißen Fettgewebes *in vivo* fanden sich auch *in vitro* Zeichen einer veränderten Fettgewebsfunktion. Die adipogene Differenzierung der isolierten Präadipozyten von transgenen Mäusen und Wildtyptieren erfolgte unter standardisierten hormonellen Bedingungen. Dadurch können die Adipozyteneigenschaften *in vitro* unabhängig von systemischen hormonellen Veränderungen, wie z.B. dem erhöhten Cortisolspiegel der R6/2-Mäuse, beurteilt werden.
Die Zellen, die von transgenen Tieren stammten, zeigten dabei am 7. Tag der Differenzierung eine signifikant erniedrigte Differenzierungsrate und einen verminderten Triglyceridgehalt. Der gleiche Effekt findet sich auch bei Adipozyten der 3T3-L1-Linie, die mit mutantem Huntingtin transfiziert wurden (Phan et al. 2009). Das bestätigt, dass die veränderte Differenzierung und der erniedrigte Triglyceridgehalt auf direkte Effekte von mutantem Huntingtin in den Adipozyten zurückzuführen sind und unabhängig von systemischen Stoffwechsel-veränderungen auftreten. Phan et al. zeigten zudem, dass mutantes Huntingtin in den 3T3-L1-Zellen die Co-Aktivierung des PPRE durch PGC-1α stört und vermuten, dass dies auch im Fettgewebe des R6/2-Mausmodells der Fall sein könnte (Phan et al. 2009). Die Daten dieser Arbeit zu Triglyceridgehalt und Differenzierung der transgenen Adipozyten bekräftigen diese Hypothese.

Ein verminderter Triglyceridgehalt kann entweder durch eine reduzierte Triglyceridsynthese oder durch einen vermehrten Abbau von Triglyceriden im Sinne einer verstärkten Lipolyse verursacht werden. Wie der Vergleich von Glukoseaufnahme und De-Novo-Lipogenese zeigt, werden bei den transgenen Zellen im Verhältnis zur Glukoseaufnahme weniger Triglyceride gespeichert als bei den Wildtypzellen, was für eine Lipidsynthesestörung spricht.

Die Regulation der Lipidsynthese erfolgt unter anderem über sterol regulatory element binding proteins (SREBs) (Shimano 2001). In Adipozyten wird in erster Linie SREB-1c exprimiert (Shimomura et al. 1997), das für die Expression der Acetyl-CoA-Carboxylase (Magaña et al. 1997), der Fettsäuresynthase (Magaña u. Osborne 1996) und der Glycerol-3-Phosphat-Acetyltransferase (Ericsson et al. 1997) notwendig ist. Für die Expression von SREB-1c ist wiederum PGC-1α erforderlich (Oberkofler et al. 2004). Die verminderte PGC-1α-Expression im Fettgewebe der R6/2-Mäuse (Phan et al. 2009) könnte somit über SREPB-1c die Lipidsynthese stören. Phan et al. zeigten zudem, dass mutantes Huntingtin die Expression der Diacylglycerin-O-Acyltransferase (DGAT) in Adipozyten reduziert. Das Enzym DGAT katalysiert den letzten Schritt der Triglyceridsynthese und eine verminderte DGAT-Expression geht mit einer reduzierten Triglyceridsynthese einher (Shi u. Cheng 2009).

Ob die lipolytische Aktivität der Adipozyten ebenfalls verändert ist, sollte durch die Untersuchung des Glycerolgehalts im Medium untersucht werden. Die Daten aus dem Experiment zeigten jedoch große Schwankungen, so dass keine Aussage zur basalen Lipolyse der untersuchten Adipozyten getroffen werden kann. Die Daten von Fain et al. zur lipolytischen Aktivität isolierter epididymaler Fettdepots zeigen eine unveränderte basale Lipolyse im Gewebe der R6/2-Mäuse mit einem vorübergehend schwächeren Ansprechen der Lipolyse auf einen adrenergen Stimulus (Fain et al. 2001) und sprechen so gegen eine erhöhte Lipolyse als Ursache für den verminderten Triglyzeridgehalt.

Dem verminderten Triglyzeridgehalt der Zellen *in vitro*, der zu den verkleinerten Adipozyten *in vivo* passt, stehen die vergrößerten gonadalen Fettdepots der R6/2-Tiere *in vivo* gegenüber. Die scheinbar widersprüchlichen Veränderungen können Ausdruck unterschiedlicher pathogenetischer Mechanismen sein, mit lokalen Effekten des mutanten Huntingtins auf der einen und systemischen hormonellen Veränderungen auf der anderen Seite.

4.4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, zu klären, ob neben der verminderten pankreatischen Insulinsekretion und den erhöhten Cortisolspiegeln auch Veränderungen direkt im Fettgewebe der R6/2-Mäuse einen Einfluss auf die Störung des Glukosemetabolismus haben und ob mutantes Huntingtin direkten Einfluss auf die Glukoseaufnahme und -verwertung in Adipozyten hat. Die dafür untersuchte Mauspopulation wies eine erhöhte Anzahl an CAG-Wiederholungen auf. Durch die Gegenüberstellung der GLUT4-Expression bei Tieren mit 160 CAG-Wiederholungen mit der Expression bei Tieren mit verlängerten CAG-Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der CAG-Wiederholungen im Exon 1 des Huntingtingens zu einer milderen Ausprägung des R6/2-Phänotyps bezüglich der GLUT4-Expression im Fettgewebe führt. Der protektive Effekt der verlängerten CAG-Abschnitte, der für Veränderungen des Nervensystems, des Körpergewichts und die Überlebenszeit der R6/2-Tiere beschrieben ist, konnte somit auch im Fettgewebe nachvollzogen werden. Die Betrachtung der erhobenen Daten im Kontext bereits publizierter Arbeiten zeigte, dass in den aktuell vorliegenden Publikationen Mauskohorten mit unterschiedlich langen CAG-Abschnitten untersucht wurden oder zum Teil die Angaben der CAG-Wiederholungen fehlen. Dies erschwert den Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Publikationen und verdeutlicht die Notwendigkeit zur obligatorischen Kontrolle und Angabe der CAG-Repeatanzahl bei Arbeiten mit dem R6/2-Mausmodell.

Die transgenen Tiere zeigten eine veränderte Expression des insulinsensitiven Glukosetransporters GLUT4 im Fettgewebe: Bei den männlichen Tieren war die Expression in weißem und braunem Fettgewebe vermindert, bei den weiblichen Tieren zeigte sich eine reduzierte Expression lediglich im weißen Fettgewebe. Neben dem erhöhten Insulin- und Cortisolspiegel weisen die transgenen Tiere mit der veränderten GLUT4-Expression also auch peripher im Fettgewebe ein Merkmal auf, das den Glukosemetabolismus beeinflusst. Ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die GLUT4-Expression im Fettgewebe fand sich in dieser Arbeit auch bei den Wildtyptieren. Dies bestätigt, dass hormonelle Faktoren, wie z.B. Östrogen, an der Regulation der metabolischen Vorgänge beteiligt sind und verdeutlicht die Notwendigkeit, bei Untersuchungen metabolischer Zusammen-

hänge die Daten streng nach Geschlecht getrennt zu erheben. Die Literaturrecherche zeigte, dass dies in den Arbeiten, die bisher zum Glukosestoffwechsel der R6/2-Tiere publiziert wurden, nicht erfolgt ist. So geht aus den Arbeiten nicht hervor, ob das Geschlecht die Entwicklung eines Diabetes mellitus bei R6/2-Mäusen beeinflusst. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre eine Untersuchung der geschlechtsspezifischen Entwicklung der Blutzucker-spiegel der R6/2-Mäuse im Krankheitsverlauf notwendig.

Hinweise auf die Lokalisation der vermehrt exprimierten GLUT4-Transporter in den Zellen ergaben sich in dieser Arbeit aus dem GLUT4-Gehalt der PM-Fraktion aus subfraktioniertem weißen Fettgewebe: Im Basalzustand war der GLUT4-Gehalt der Plasmamembranfraktion bei männlichen, transgenen Tieren tendenziell, jedoch nicht signifikant, erhöht. Die gesteigerte basale Glukoseaufnahme der transgenen Adipozyten *in vitro* spiegelt diese Beobachtung wider und legt nahe, dass die Adipozyten *in vitro* einen erhöhten GLUT4-Gehalt in der Plasmamembran aufweisen, der zu der vermehrten Glukoseaufnahme führt. Die Subfraktionierung von *in vitro* differenzierten Adipozyten könnte diese Vermutung bestätigen.

Bei den Versuchen mit isolierten Adipozyten *in vitro* zeigten sich, trotz standardisierter hormoneller Bedingungen bei der adipogenen Differenzierung, eine verminderte Differenzierungsrate und eine eingeschränkte Triglycerid-synthese bei den transgenen Zellen. Diese Veränderungen sind somit unabhängig von systemischen hormonellen Veränderungen und lassen sich auf direkte Effekte von mutantem Huntingtin in den Adipozyten zurückführen.

Am Beispiel des Fettgewebes verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass mutantes Huntingtin beim R6/2-Mausmodell zu Veränderungen direkt im peripheren Gewebe führt und bestätigen den Wandel der Betrachtung von Morbus Huntington in Richtung einer Systemerkrankung. Anhand bereits in der Literatur beschriebener Interaktionen von mutantem Huntingtin mit zellulären Regulationsmechanismen in Adipozyten ergaben sich Erklärungsansätze für mögliche Mechanismen, die die Veränderungen im Fettgewebe und den Adipozyten der transgenen Tiere verursachen könnten.

5. Zusammenfassung

Morbus Huntington ist eine autosomal-dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung, die durch eine verlängerte Polyglutaminkette im Huntingtin-Protein verursacht wird. Die zugrundeliegende Mutation besteht in einer Zunahme von Basentripletts mit der Sequenz Cytosin-Adenin-Guanin (CAG) im Exon 1 des Huntingtin-Gens auf Chromosom 4. Neben den neuropsychiatrischen Symptomen zeigen Huntington-Patienten metabolische Veränderungen mit progredientem Gewichtsverlust und einer gestörten Glukosehomöostase. Diese metabolischen Veränderungen finden sich auch beim R6/2-Mausmodell. Die R6/2-Tiere exprimieren ein transgenes Exon 1 mit 145 CAG-Wiederholungen ubiquitär in allen Geweben und weisen erhöhte Cortisol- sowie verminderte Insulinspiegel auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob neben den hormonellen Störungen auch Veränderungen im Fettgewebe, die sich auf das mutante Huntingtin zurückführen lassen, zu der gestörten Glukosehomöostase beitragen. Dazu wurde die Expression des insulinsensitiven Glukosetransporters 4 (GLUT4) im Fettgewebe 12 Wochen alter R6/2- und Wildtyptiere mittels Western Blot verglichen. Um Aufschluss über die Lokalisation von GLUT4 zu erlangen, wurde der GLUT4-Gehalt in der Plasmamembranfraktion (PM) subfraktionierter Organkulturproben bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression von Rab11, einem Protein, das am Transport von GLUT4 beteiligt ist, untersucht. An primären Adipozyten, die aus dem weißen Fettgewebe (WAT) der R6/2-Mäuse gewonnen wurden, wurden *in vitro* unter standardisierten hormonellen Bedingungen die adipogene Differenzierung, der Triglyceridgehalt der Zellen, die Glukoseaufnahme und die De-Novo-Lipogenese untersucht. Ergänzend dazu wurden an Paraffinschnitten die Adipozytengröße und das Vorliegen von Huntingtin-Aggregaten im WAT untersucht. Die Anzahl der CAG-Wiederholungen im Exon 1 wurde mittels Polymerasekettenreaktion überprüft. Dabei zeigten die transgenen Versuchstiere verlängerte CAG-Abschnitte mit 255 bis 288 CAG-Wiederholungen.

Die Bestimmung von Körpergewicht und Masse der gonadalen Fettdepots zeigte bei den 12 Wochen alten Tieren eine signifikant erhöhte Fettdepotmasse bei den weiblichen, transgenen Tieren und ein signifikant niedrigeres Körpergewicht bei den männlichen, transgenen Tieren. Der prozentuale Anteil der Fettdepotmasse am Körpergewicht war bei beiden Geschlechtern bei den transgenen Tieren

signifikant höher als bei den Wildtyptieren. Histologisch war die Adipozytengröße im WAT der transgenen Tiere vermindert und die Expression von Huntingtin erhöht. Huntingtin-Aggregate waren im WAT nicht nachweisbar.

Die GLUT4-Expression im Fettgewebe der 12 Wochen alten Tiere war geschlechtsspezifisch verändert. Bei den weibliche Tieren war die Expression im WAT der transgenen Tiere auf das 0,58-Fache der Expression bei den Wildtypweibchen vermindert. Bei den männlichen transgenen Tieren war die Expression auf das 1,46-Fache erhöht. Die GLUT4-Expression im braunen Fettgewebe (BAT) sowie die Expression von Rab11 in WAT und BAT waren nicht signifikant verändert. Die Subfraktionierung von Organkulturproben aus WAT ergab einen tendenziell höheren GLUT4-Gehalt der PM-Fraktion bei den transgenen Tieren im Basalzustand, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Die primären Adipozyten der transgenen Tiere zeigten *in vitro* eine Differenzierungsrate von 55 %. Bei den Wildtypzellen lag die Differenzierungsrate bei 68 %. Die Glukoseaufnahme *in vitro* war im Basalstadium und nach Stimulation mit 10^{-10} M und 10^{-9} M Insulin bei den transgenen Zellen signifikant höher. Die erhöhte Glukoseaufnahme ging jedoch nicht mit einer signifikant gesteigerten Triglyceridsynthese einher und der Triglyceridgehalt der transgenen Zellen war auf das 0,67-Fache vermindert.

Mit der veränderten GLUT4-Expression fand sich in dieser Arbeit eine Merkmal im Fettgewebe der R6/2-Tiere, das die Glukoseaufnahme unabhängig von der hormonellen Situation beeinflusst. Der erhöhte GLUT4-Gehalt im WAT der transgenen Tieren geht mit einer vermehrten basalen Glukoseaufnahme der transgenen Adipozyten *in vitro* einher. Die geringere Adipozytengröße im WAT *in vivo*, die verminderte Differenzierung der transgenen Adipozyten *in vitro* und der reduzierte Triglyceridgehalt der transgenen Zellen sind Hinweise auf eine gestörte Adipozytenfunktion. Da die Differenzierungs- und Synthesestörung unter standardisierten hormonellen Bedingungen *in vitro* auftrat, liegt ihre Ursache in direkten Effekten von mutantem Huntingtin im Fettgewebe. Diese Arbeit zeigt so, dass die metabolischen Veränderungen bei den R6/2-Tieren nicht allein Symptome des gestörten Homonhaushaltes sind, sondern auf die direkte Einwirkung von mutantem Huntingtin im Fettgewebe zurückgeführt werden können.

6. Literaturverzeichnis

1. Andreassen O, Dedeoglu A, Stanojevic V, Hughes DB, Browne SE, Leec CA, Ferrante RJ, Habener JF, Beal MF, Thomas MK: Huntington's Disease of the Endocrine Pancreas: Insulin Deficiency and Diabetes Mellitus due to Impaired Insulin Gene Expression. Neurobiol Dis 11: 410-424 (2002)

2. Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA, Graham RK, Hayden MR: The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. Nat Genet 4: 398-403 (1993)

3. Antharavally B., Carter B, Bell PA, Mallia AK: A high-affinity reversible Protein stain for Western blots. Anal Biochem 329: 276-280. (2004)

4. Armoni M, Harel C, Karni S, Chen H, Bar-Yoseph F, Ver MR, Quon MJ, Karnieli E: FOXO1 Represses Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma1 and -gamma2 Gene Promoters in Primary adipocytes. J Biol Chem 281: 19881-19891 (2006)

5. Armoni M, Kritz N, Harel C, Bar-Yoseph F, Chen H, Quon MJ, Karnieli E: Peroxisome Proliferator-activated Receptor-gamma Represses GLUT4 Promoter Activity in Primary Adipocytes, and Rosiglitazone Alleviates This Effect. J Biol Chem 278: 30614-30623 (2003)

6. Aziz NA, van der Burg JMM, Landwehrmeyer GB, Brundin P, Stijnen T, Group ES, Roos RAC: Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number. Neurology 71: 1506-1513 (2008)

7. Aziz NA, Pijl H, Frölich M, van der Graaf AWM, Roelfsema F, Roos RAC: Increased Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity in Huntington's Disease. J Clin Endocrinol Metab 94: 1223-1228 (2009).

8. Aziz NA, Pijl H, Frölich M, Snel M, Streefland TCM, Roelfsema F, Roos RAC: Systemic energy homeostasis in Huntington's disease patients. J Neurol Neurosurg Psychiatry 81: 1233-1237 (2010a)

9. Aziz NA, Pijl H, Frölich M, van der Graaf AWM, Roelfsema F, Roos RAC: Leptin secretion rate increases with higher CAG repeat number in Huntington's disease patients. Clin Endocrinol 73: 206-211 (2010b)

10. Bacos K, Björkqvist M, Petersén Å, Luts L, Maat-Schieman MLC, Roos RAC, Sundler F, Brundin P. Mulder H, Wierup N: Islet β-cell area and hormone expression are unaltered in Huntington's disease. Histochem Cell Biol 129: 623-629 (2008)

11. Barros RPA, Gabbi C, Morani A, Warner M, Gustafsson JA: Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. Am J Physiol Endocrinol Metab 297: E124–E133 (2009).

12. Björkqvist M, Fex M, Renström E, Wierup N, Petersén Å, Gil J, Bacos K, Popovic N, Li JY, Sundler F, Brundin P, Mulder H: The R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease develops diabetes due to deficient beta-cell mass and exocytosis. Hum Mol Genet 14: 565-574 (2005)

13. Björkqvist M, Petersén Å, Bacos K, Isaacs J, Norlén P, Gil J, Popovic N, Sundler F, Bates GP, Tabrizi SJ, Brundin P, Mulder H: Progressive alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. Hum Mol Genet 15: 1713-1721 (2006)

14. Bossy-Wetzel E, Petrilli A, Knott AB: Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. Trends Neurosci 31: 609-616 (2008)

15. Browne SE und Beal MF: The Energetics of Huntington's Disease. Neurochem Res 29: 531-546 (2004)

16. Bryant NJ, Govers R, James DE: Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. Nat Rev Mol Cell Biol 3: 267-277 (2002)

17. Carvalho E, Kotani K, Peroni OD, Kahn BB: Adipose-specific overexpression of GLUT4 reverses insulin resistance and diabetes in mice lacking GLUT4 selectively in muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 289: 515-561 (2005)

18. Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M: Normal huntingtin function: An alternative approach to Huntington's disease. Nat Rev Neurosci 6: 919-930 (2005)

19. Choo YS, Johnson GV, MacDonald M, Detloff PJ, Lesort M: Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium induced permeability transition and cytochrome c release. Hum Mol Genet 13: 1407-1420 (2004)

20. Cooke DW und Lane MD: The Transcription Factor Nuclear Factor I Mediates Repression of th GLUT4 Promoter by Insulin. J Biol Chem 274: 1291-12924 (1999)

21. Cowin RM, Bui N, Graham D, Green JR, Grueninger S, Yuva-Paylor LA, Syed AU, Weiss A, Paylor R: Onset and Progression of Behavioral and Molecular Phenotypes in a Novel Congenic R6/2 Line Exhibiting Intergenerational CAG Repeat Stability. PloS one 6: e28409 (2011)

22. Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D: Transcriptional Repression of PGC-1alpha by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. Cell 127: 59-69 (2006)

23. Cummings DM, Alaghband Y, Hickey MA, Joshi PR, Hong SC, Zhu C, Ando TK, André VM, Cepeda C, Watson JB, Levine MS: A critical window of CAG repeat-length correlates with phenotype severity in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. J Neurophysiol 107: 677-691 (2012)

24. Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP: Formation of Neuronal Intranuclear Inclusions Underlies the Neurological Dysfunction in Mice Transgenic for the HD Mutation. Cell 90: 537-548 (1997)

25. Dechert U: Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese. In: Jansohn M (Hrsg) Genetische Methoden, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, S. 42-45 (2006)

26. DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N: Aggregation of Huntingtin in Neuronal Intranuclear Inclusions and Dystrophic Neurites in Brain. Science 277: 1990-1993 (1997)

27. Djoussé L , Knowlton B, Cupples LA, Marder K, Shoulson I, Myers RH: Weight loss in early stage of Huntington's disease. Neurology 59: 1325 1329 (2002)

28. Dragatsis I, Goldowitz D, Del Mar N, Deng YP, Meade CA, Liu L, Sun Z, Dietrich P, Yue J, Reiner A: CAG repeat lengths > or =335 attenuate the phenotype in the R6/2 Huntington's disease transgenic mouse. Neurobiol Dis 33: 315-330 (2009)

29. Dreja TS: Microarray-basierte Expressionsanalyse des weißen Fettgewebes der NZO-Maus sowie der Langerhansschen Inseln der NZL Maus: Zwei Modelle für das metabolische Syndrom. Dissertation, Universität Potsdam (2009)

30. Ericsson J, Jackson SM, Bum JK, Spiegelman BM, Edwards PA: Identification of Glycerol-3-phosphate Acyltransferase as an Adipocyte Determination and Differentiation Factor 1- and Sterol Regulatory Element binding Protein-responsive Gene. J Biol Chem 272: 7298-7305 (1997)

31. Fahn S: Huntington disease. In: Fahn S, Jankovic J, Hallett M (Hrsg.) Principles and Practice of Movement Disorders, 2.Auflage, Elsevier, S. 311-334 (2011)

32. Fain JN, Del Mar NA, Meade CA, Reiner A, Goldowitz D: Abnormalities in the functioning of adipocytes from R6/2 mice that are transgenic for the Huntington's disease mutation. Hum Mol Genet 10: 145-152 (2001)

33. Falush D, Almqvist E., Brinkmann RR, Iwasa Y, Hayden MR: Measurement of Mutational Flow Implies Both a High New-Mutation Rate for Huntington Disease and Substantial Underascertainment of Late-Onset Cases. Am J Hum Genet 68: 373-385 (2001)

34. Fan J, Cowan CM, Zhang LYJ, Hayden MR, Raymond LA: Interaction of Postsynaptic Density Protein-95 with NMDA Receptors Influences Excitotoxicity in the Yeast Artificial Chromosome Mouse Model of Huntington's Disease. J Neurosci 29. 10928-1038 (2009)

35. Farrer LA: Diabetes mellitus in Huntington disease. Clin Genet 27: 62-67 (1985)

36. Farrer LA: Suicide and Attempted Suicide in Huntington Disease: Implications for Preclinical Testing of Persons at Risk. Am J Med Genet 24: 305-311 (1986)

37. Ferrante RJ, Gutekunst CA, Persichetti F, McNeil SM, Kowall NW, Gusella JF, MacDonald ME, Beal MF, Hersch SM: Heterogeneous Topographic and Cellular Distribution of Huntingtin Expression in the Normal Human Neostriatum. J Neurosci 17: 3052-3063 (1997)

38. Fischer-Posovszky P, Newell F, Wabitsch M, Tornqvist HE: Human SGBS Cells - a Unique Tool for Studies of Human Fat Cell Biology. Obes Facts 1: 184-189 (2008)

39. Fischer-Posovszky P, Kukulus V, Tews D, Unterkircher T, Debatin KM, Fulda S, Wabitsch M: Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. Am J Clin Nutr 1: 5–15 (2010)

40. Fossati PP und Prencipe L: Serum Triglycerides Determined Colorimetrically with an Enzyme that Produces Hydrogen Peroxide. Clin Chem 28: 2077-2080 (1982)

41. Frey A, Bade S, Salm T, Meyer-Puttlitz B, Schulte A: Nachweisreaktion: Bindung der Erst- und Zweitantikörper. In: Jansohn M (Hrsg) Genetische Methoden, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, S. 396-422 (2006)

42. Fried SK und Moustaid-Moussa N: Culture of Adipose Tissue and Isolated Adipocytes. In: Ailhaud G (Hrsg) Methods Mol Biol- Adipose Tissue Protocols, 155. Auflage, Human Press, S. 197-212 (2001)

43. Gizatullina ZZ, Lindenberg KS, Harjes P, Chen Y, Kosinski C.M, Landwehrmeyer, BG, Ludolph AC, Striggow F, Zierz S, Gellerich FN: Low stability of Huntington muscle mitochondria against Ca2+ in R6/2 mice. Ann Neurol 59: 407-411 (2006)

44. Goldberg YP, Kremer B, Andrew SE, Theilmann J, Graham RK, Squitieri F, Telenius H, Adam S, Sajoo A, Starr E, Heiberg A, Wolff G, Hayden MR: Molecular analysis of new mutations for Huntington's disease: intermediate alleles and sex of origin effects. Nat Genet 5: 174-179 (1993)

45. Goldberg YP, McMurray CT, Zeisle, J, Almqvist E, Sillence D, Richards F, Gacy AM, Buchanan J, Telenius H, Hayden MR: Increased instability of intermediate alleles in families with sporadic Huntington disease compared to similar sized intermediate alleles in the general population. Hum Mol Genet 4: 1911-1918 (1995)

46. Goodman AOG, Murgatroyd PR, Medina-Gomez G, Wood NI, Finer N, Vidal-Puig AJ, Morton AJ, Barker RA: The metabolic profile of early Huntington's disease- a combined human and transgenic mouse study. Exp Neurol 210: 691-698 (2008)

47. Grigem S, Fischer-Posovszky P, Debatin KM, Loizon E, Vidal H. Wabitsch M: The Effect of the HIV Protease Inhibitor Ritonavir on Proliferation, Differentiation, Lipogenesis, Gene Expression and Apoptosis of Human Preadipocytes and Adipocytes. Horm Metab Res 37: 602-609 (2005)

48. Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AHV: Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. Ann Neurol 39: 385–389 (1996)

49. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Skakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E, Martin JB: A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. Nature 306: 234-238 (1983)

50. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF: Promoting Effect of Glucocorticoids on the Differentiation of Human Adipocyte Precursor Cells Cultured in a Chemically Defined Medium. J Clin Invest 84: 1663-1670 (1989)

51. Hauner H, Skurk T, Wabitsch M: Cultures of human adipose precursor cells. In: Ailhaud G (Hrsg) Methods Mol Biol- Adipose Tissue Protocols, 155. Auflage, Human Press, S. 239-247 (2001)

52. Hayden MR: Vortrag „Frequency of HD" im Rahmen des EHDN-Meetings am 14.9.2012 in Stockholm, Zusammenfassung im Meetingreport unter http://www.euro-hd.net/html/ehdn2012/docs/ehdn2012-plenary-meeting-report.pdf (Download am 3.9.2013)

53. Hoffner G, Kahlem P, Djian P: Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta tubulin: relevance to Huntington's disease. J Cell Sci 115: 941-948 (2002)

54. Hsu SM und Raine L: Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 29: 1349-1353 (1981)

55. Hunt MJ und Morton AJ: Atypical diabetes associated with inclusion formation in the R6/2 mouse model of Huntington's disease is not improved by treatment with hypoglycaemic agents. Exp Brain Res 166: 220-229 (2005)

56. Huntington G: On chorea. The Medical and Surgical Reporter: A Weekly Journal 26: 317–332 (1872).

57. Hurlbert MS, Zhou W, Wasmeier C, Kaddis FG, Hutton JC, Freed CR: Mice Transgenic for an Expanded CAG Repeat in the Huntington's Disease Gene Develop Diabetes. Diabetes 48: 649-651 (1999)

58. Im SS, Kwon SK, Kim TH, Kim HI, Ahn YH: Regulation of Glucose Transporter Type 4 Isoform Gene Expression in Muscle and Adipocytes. IUBMB Life 59: 134-145 (2007)

59. Ishikura S, Koshkina A, Klip A: Small G proteins in insulin action: Rab and Rho families at the crossroads of signal transduction and GLUT4 vesicle traffic. Acta Physiol 192: 61-74 (2008)

60. Joost HG und Schürmann A: Subcellular Fractionation of Adipoytes and 3T3-L1 Cells. In: Ailhaud G (Hrsg) Methods Mol Biol- Adipose Tissue Protocols, 155. Auflage, Human Press, S. 77-82 (2001)

61. Josefsen K, Nielsen MD, Jørgensen KH, Bock T, Nørremølle A, Sørensen SA, Naverand B, Hasholt L: Impaired Glucose Tolerance in the R6/1 Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. J Neuroendocrinol 20: 165-172 (2008)

62. Kegel KB, Meloni AR, Yi Y, Kim YJ, Doyle E, Cuiffo BG, Sapp E, Wang Y, Qin ZH, Chen JD, Nevins JR, Aronin N, DiFiglia M: Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. J Biol Chem 277: 7466-7476 (2002)

63. Kremer B, Golddberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri F, Biaoyang L, Bassett A, Almqvist E, Bird TD, Hayden MR: A worldwide study of the Huntington's disease mutation: the sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. N Engl J Med 330: 1401-1406 (1994)

64. Laemmli UK: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)

65. Lalić NM, Marić J, Svetel M, Jotić A, Stefanova E, Lalić K, Dragasević N, Milicić T, Lukić L, Kostić VS: Glucose Homeostasis in Huntington Disease: Abnormalities in Insulin Sensitivity and Early-Phase Insulin Secretion. Arch Neurol 65: 476-480 (2008)

66. Leavitt BR, van Raamsdonk JM, Shehadeh J, Fernandes H, Murphy Z, Graham RK, Wellington CL, Raymond LA, Hayden MR: Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. J Neurochem 96: 1121–1129 (2006)

67. Li X, Sapp E, Valencia A, Kegel KB, Qin Z, Alexander J, Masso N, Reeves P, Ritch JJ, Zeitlin S, Aronin N, DiFiglia M: A function of huntingtin in guanine nucleotide exchange on Rab11. Neuroreport 19: 1643-1647 (2008)

68. Li X, Valencia A, McClory H, Sapp E, Kegel KB, DiFiglia M: Deficient Rab11 activity underlies glucose hypometabolism in primary neurons of Huntington's disease mice. Biochem Biophys Res Commun 421: 727-730 (2012)

69. Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M: 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. Can J Neurol Sci 18: 492-498 (1991)

70. Lüesse H, Schiefer J, Spruenken A, Puls C, Block F, Kosinski CM: Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease: behavioral testing and impact of diabetes mellitus. Behav Brain Res 126: 185-195 (2001)

71. Magaña MM und Osborne TF: Two Tandem Binding Sites for Sterol Regulatory Element Binding Proteins Are Required for Sterol Regulation of Fatty-acid Synthase Promoter. J Biol Chem 271: 32689–32694 (1996)

72. Magaña MM, Lin SS, Dooley KA, Osborne TF: Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins. J Lipid Res 38: 1630 1638 (1997)

73. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP: Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice. Cell 87: 493-506 (1996)

74. Mangiarini L, Sathasivam K, Mahal A, Mott R, Seller M, Bates GP: Instability of highly expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. Nat Genet 15: 197-200 (1997)

75. Marder K, Zhao H, Eberly S, Tanner CM, Oakes D, Shoulson I: Dietary intake in adults at risk for Huntington disease: analysis of PHAROS research participants. Neurology 73: 385-392 (2009)

76. Menalled LB und Chesselet MF: Mouse models of Huntington disease. TRENDS in Pharmacol Sci 2: 32-39 (2002)

77. Menalled L, El-Khodor BF, Patry M, Suares-Farinas M, Orenstein S, Zahasky B, Leahy C, Wheeler V, Yang XW, MacDonald M, Morton AJ, Bates GP, Leeds J, Park L, Howland D, Signer E, Tobin A, Brunner D: Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. Neurobiol Dis 35: 319-336 (2009)

78. Mochel F, Charles P, Seguin F, Barritault J, Coussieu C, Perin L, Le Bouc Y, Gervais C, Carcelain G, Vassault A, Feingold J, Rabier D, Durr A: Early Energy Deficit in Huntington Disease: Identification of a Plasma Biomarker Traceable during Disease Progression. PloS one 2: e647 (2007)

79. Moffitt H, McPhail GD, Woodman B, Hobbs C, Bates GP: Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease. PloS one 4:e8025 (2009)

80. Morton AJ, Glynn D, Leavens W, Zheng Z, Faull RLM, Skepper JN, Wight JM: Paradoxical delay in the onset of disease caused by super-long CAG repeat expansions in R6/2 mice. Neurobiol Dis 33: 331-341 (2009)

81. Moscovich M, Munhoz RP, Becker N, Barbosa ER, Espay AJ, Weiser R, Teive HA: Américo Negrette and Huntington's disease. Arq Neuropsiquiatr 69: 711-713 (2011)

82. Muthusamy T, Dhevika S, Murugesan P, Balasubramanian K: Testosterone deficiency impairs glucose oxidation through defective insulin and its receptor gene expression in target tissues of adult male rats. Life Sci 81: 534-542 (2007)

83. Myers RH: Huntington's disease genetics. NeuroRx 1: 255-262 (2004)

84. Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR: Targeted Disruption of the Huntington's Disease Gene Results in Embryonic Lethality and Behavioral and Morphological Changes in Heterozygotes. Cell 81: 811-823 (1995)

85. Oberkofler H, Schraml E, Krempler F, Patsch W: Restoration of sterol-regulatory-element-binding protein-1c gene expression in HepG2 cells by peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1alpha. Biochem J 381: 357-363 (2004)

86. Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT: Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. Nat Neurosci 5: 731-736 (2002)

87. Panov AV, Lund S, Greenamyre JT: Ca2+-induced permeability transition in human lymphoblastoid cell mitochondria from normal and Huntington's disease individuals. Mol Cell Biochem 269: 143-152 (2005)

88. Papalexi E, Persson A, Björkqvist M, Petersén A, Woodman B, Bates GP, Sundler F, Mulder H, Brundin P, Popovic N: Reduction of GnRH and infertility in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. Eur J Neurosci 22: 1541-1546 (2005)

89. Phan J, Hickey MA, Zhang P, Chesselet MF, Reue K: Adipose tissue dysfunction tracks disease progression in two Huntington's disease mouse models. Hum Mol Genet 18: 1006-1016 (2009).

90. Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N: The Incidence and Prevalence of Huntington's Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. Mov Disord 27: 1083-1091 (2012)

91. Rehm H: Anreicherung von Membranen und Membranmarker. In: Rehm H (Hrsg) Der Experimentator – Proteinbiochemie/ Proteomics, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, S. 50-52 (2006)

92. Riess O, Noerremoelle A, Soerensen SA, Epplen JT: Improved PCR conditions for the stretch of (CAG)n repeats causing Huntington's disease. Hum Mol Genet 2: 637-637 (1993)

93. Rigamonti D, Bauer JH, De-Fraja C, Conti L, Sipione S, Sciorati C, Clementi E, Hackam A, Hayden MR, Li Y, Cooper JK, Ross CA, Govoni S, Vincenz C, Cattaneo E : Wild-type Huntingtin Protects from Apoptosis Upstream of Caspase-3. J Neurosci 20: 3705- 3713 (2000)

94. Rigamonti D, Sipione S, Goffredo D, Zuccato C, Fossale E, Cattaneo E: Huntingtin's Neuroprotective Activity Occurs via Inhibition of Procaspase-9 Processing. J Biol Chem 276: 14545-14548 (2001)

95. Rosas HD, Tuch DS, Hevelone ND, Zaleta AK, Vangel M, Hersch SM, Salat DH: Diffusion Tensor Imaging in Presymptomatic and Early Huntington's Disease: Selective White Matter Pathology and Its Relationship to Clinical Measures. Mov Disord 21: 1317-1325 (2006)

96. Rosenblatt A: Neuropsychiatry of Huntingtons's disease. Dialogues Clin Neurosci 9: 191–197 (2007)

97. Sathasivam K, Hobbs C, Turmaine M, Mangiarini L, Mahal A, Bertaux F, Wanker EE, Doherty P, Davies SW, Bates GP: Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. Hum Mol Genet 8: 813-822 (1999)

98. Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB: Adipose Cell Hyperplasia and Enhanced Glucose Disposal in Transgenic Mice Overexpressing GLUT4 Selectively in Adipose Tissue. J Biol Chem 268: 22243-22246 (1993)

99. Shi Y und Cheng D: Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab 297: E10–E18 (2009)

100. Shimano H: Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. Prog Lipid Res 40: 439-452 (2001)

101. Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS: Differential Expression of Exons 1a and 1c in mRNAs for Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 in Human and Mouse Organs and Cultured Cells. J Clin Invest 99: 838-845 (1997)

102. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. Anal Biochem 150: 76-85 (1985)

103. Smith R, Bacos K, Fedele V, Soulet D, Walz HA, Obermüller S, Lindqvist A, Björkqvist M, Klein P, Önnerfjord P, Brundin P, Mulder H, Li JY: Mutant huntingtin interacts with {beta}-tubulin and disrupts vesicular transport and insulin secretion. Hum Mol Genet 18. 3942-3954 (2009)

104. Squitieri F, Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Spence N, Zeisler J, Nichol K; Theilmann J, Greenberg J, Goto J, Kanazawa I, Vesa J, Peltonen L, Almqvist E, Anvret M, Telenius H, Napolitano G, Morgan K, Hayden MR: DNA haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence. Hum Mol Genet 3: 2103-2114 (1994)

105. Stack EC, Kubilus JK, Smith K, Cormier K, Del Signore SJ, Guelin E, Ryu H, Hersch SM, Ferrante RJ: Chronology of Behavioral Symptoms and Neuropathological Sequela in R6/2 Huntington's Disease Transgenic Mice. J Comp Neurol 490: 354–370 (2005)

106. Tabrizi SJ, Scahill RI, Durr A, Roos RAC, Leavitt BR, Jones R, Landwehrmeyer GB, Fox NC, Johnson H, Hicks, Stephen L, Kennard C, Craufurd D, Frost C, Langbehn DR, Reilmann R, Stout JC: Biological and clinical changes in premanifest and early stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: the 12-month longitudinal analysis. Lancet Neurol 10: 31-42 (2011)

107. Tang J, LeGros RP, Louneva N, Yeh L, Cohen JW, Hahn CG, Blake DJ, Arnold SE, Talbot K: Dysbindin-1 in dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia cases is reduced in an isoform-specific manner unrelated to dysbindin-1 mRNA expression. Hum Mol Genet 18: 3851-3863 (2009)

108. Thamotharan M, McKnight RA, Thamotharan S, Kao DJ, Devaskar SU: Aberrant insulin-induced GLUT4 translocation predicts glucose intolerance in the offspring of a diabetic mother. Am J Physiol Endocrinol Metab 284: E901-E914 (2003)

109. The Huntington's Disease Collaborative Research Group: A Novel Gene Containing a Trinucleotide Repeat That Is Expanded and unstable on Huntington's Disease Chromosomes. Cell 72: 971-983 (1993)

110. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Biotechnology 24: 4350-4354 (1979)

111. Trottier Y, Devys D, Imbert G, Saudou F. An I, Lutz Y, Weber C, Agid Y, Hirsch EC, Mandel JL: Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. Nat Genet 10: 104-110 (1995)

112. Trushina E, Dyer RB, Badger II JD, Ure D, Eide L, Tran DD, Vrieze BT, Legendre-Guillemin V, McPherson PS, Mandavilli BS, Van Houten B, Zeitlin S, McNiven M, Aebersold R, Hayden MR, Parisi JE, Seeberg E, Dragatsis I, Doyle K, Bender A, Chacko C, McMurray CT: Mutant Huntingtin Impairs Axonal Trafficking in Mammalian Neurons In Vivo and In Vitro. Mol Cell Biol 24: 8195-8209 (2004)

113. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM: Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. Cell Metab 3 333-341 (2006)

114. Underwood BR, Broadhurst D, Dunn WB, Ellis DI, Michell AW, Vacher C, Mosedale DE, Kell DB, Barker RA, Grainger DJ, Rubinsztein DC: Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profiles. Brain 129: 877-886 (2006)

115. van der Burg JMM, Bacos K, Wood NI, Lindqvist A, Wierup N, Woodman B, Wamsteeker JI, Smith R, Deierborg T, Kuhar MJ, Bates GP, Mulder H, Erlanson-Albertsson C, Morton AJ, Brundin P, Petersén A, Björkqvist M: Increased metabolism in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. Neurobiol Dis 29: 41-51 (2008)

116. Van der Burg JMM, Björkqvist M, Brundin P: Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. Lancet Neurol 8: 765-774 (2009)

117. Velier J, Kim M, Schwarz C, Kim TW, Sapp E, Chase K, Aronin N, DiFiglia M: Wild-Type and Mutant Huntingtins Function in Vesicle Trafficking in the Secretory and Endocytic Pathways. Exp Neurol 152: 34-40 (1998)

118. Vonsattel JP, DiFiglia M: Huntington disease. J Neuropathol Exp Neurol 57: 369-384 (1998)

119. Walker FO: Huntington's disease. Lancet 369: 218-228 (2007)

120. Warby SC, Montpetit A, Hayden AR, Carroll JB, Butland, SL, Visscher H, Collins JA, Semaka A, Hudson TJ, Hayden MR: CAG Expansion in the Huntington Disease Gene Is Associated with a Specific and Targetable Predisposing Haplogroup. Am J Hum Genet 84: 351-366 (2009)

121. Wexler NS, Young AB, Tanzi RE, Travers H, Starosta-Rubenstein S, Penney JB, Snodgrass SR, Shoulson I, Gomez F, Ramos Arroyo M, Penchaszadeh GK, Moreno H, Gibbons K, Faryniarz A, Hobbs W, Anderson MA, Bonilla E, Conneally P, Gusella JF: Homozygotes for Huntington's disease. Nature 326: 194-197 (1987)

122. Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, Libby RT, Satterfield TF, Lazarowski ER, Gilbert ML, Morton GJ, Bammler TK, Strand AD, Cui L, Beyer RP, Easley CN, Smith AC, Krainc D, Luquet S, Sweet IR, Schwartz MW, La Spada AR: Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. Cell Metab 4: 349-362 (2006)

123. Zhang Y, Li M, Drozda M, Chen M, Ren S, Mejia Sanchez RO, Leavitt BR, Cattaneo E, Ferrante RJ, Hayden MR, Friedlander RM: Depletion of wild type huntingtin in mouse models of neurologic diseases. J Neurochem 87: 101-106 (2003)

124. Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E: Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. Physiol Rev 90: 905-981 (2010)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Allen danken, die mich auf dem Weg von den ersten Schritten im Labor bis zur Dissertation unterstützt haben. Die Idee zur Fragestellung stammt von Dr. Katrin Lindenberg, Prof. Dr. Michael Orth und Prof. Dr. Bernhard Landwehrmeyer. Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Katrin Lindenberg, die mich bei der Planung der Experimente, der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse unterstützt und meine Arbeit Korrektur gelesen hat.
Vielen Dank an Prof. Dr. Albert C. Ludolph für die Annahme als Doktorandin.

Bei Conny Fleischer, Tanja Hering, Markus Kelm, Thomas Lenk und Stephen Meier möchte ich mich für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor sowie die Hilfe bei der Tierpräparation bedanken. Die Genotypisierung der Versuchstiere wurde von Markus Kelm durchgeführt.

Mein Dank gilt insbesondere auch PD Dr. Pamela Fischer-Posovszky, die mir die Adipozytenisolation und die *In-vitro*-Untersuchungen des Stoffwechsels im Labor der Sektion Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie ermöglichte, Dr. Daniel Tews für Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Experimente sowie Alexandra Kilian, die mir die entscheidenden Tricks für die Arbeit mit den primären Adipozyten zeigte.
Die Bilder der immunzytochemisch gefärbten Adipozyten entstanden am konfokalen Mikroskop des Instituts für molekulare Virologie. Vielen Dank an Dr. Dré van der Merwe für die Geräteeinweisung.

Vielen Dank an die Medizinische Fakultät der Universität Ulm für die Förderung im Rahmen des Promotionsprogramms „Experimentelle Medizin“ und an das European Huntington's Diesease Network, das mir die Reise nach Stockholm zum EHDN-Kongress 2012 ermöglicht hat.

Vielen Dank an Silvia Fischer und Anja Schneider, die meine Arbeit Korrektur gelesen haben.
Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meiner Ausbildung und dem Studium unterstützt haben.

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen ist der Lebenslauf in der Online-Version nicht enthalten.

Poster

1. Schneider N, Tews D, Landwehrmeyer GB, Orth M, Fischer-Posovszky P, Lindenberg KS: Expression und Lokalisation von GLUT4 im Fettgewebe des R6/2-Huntington-Mausmodells. 84. Kongress der Deutschen Gesellsellschaft für Neurologie in Wiesbaden, 28. September – 1. Oktober 2011

2. Schneider N, Tews D, Landwehrmeyer GB, Orth M, Fischer-Posovszky P, Lindenberg KS: Increased Glucose Uptake in White Adipose Tissue of R6/2 Mice due to Changes in Expression and Localisation of Glucose Transporter 4 (GLUT4). 7. EHDN Plenary Meeting in Stockholm, 14 – 16 September 2012. Abstract publiziert in J Neurol Neurosurg Psychiatry 83 Suppl 1: A11 (2012)