

Der Einfluss von FTO auf die Entstehung des metabolischen Syndroms

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kathrin Ikels

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Oktober 2013

aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ulrich Rüther

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2013

... meinem Vater in Liebe und Dankbarkeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
1.1	Metabolismus bei Säugetieren	9
1.1.1	Nahrungsaufnahme	9
1.1.2	Nahrungsverdauung und Resorption	9
1.1.3	Nahrungsverwertung und Energiespeicherung	10
1.1.3.1	Das Fettgewebe	11
1.1.3.2	Der Muskel	12
1.1.3.3	Die Leber.....	12
1.2	Die Regulation des Blutzuckerspiegels	12
1.2.1	Insulin	13
1.2.2	Insulinrezeptoren	14
1.2.3	Insulinsignalwege.....	15
1.3	Das metabolische Syndrom.....	16
1.3.1	Adipositas	17
1.3.1.1	Adipositas - eine moderne Epidemie	18
1.3.1.2	Ursachen für Adipositas	19
1.3.2	Ektopische Fettakkumulation	20
1.3.3	Insulinresistenz	21
1.4	Die Regulation der Nahrungsaufnahme durch Leptin.....	22
1.4.1	Das <i>Lep^{ob/ob}</i> -Mausmodell	24
1.5	Das „ <i>Fat mass and obesity associated</i> “-Gen (<i>Fto</i>)	26
1.5.1	Identifikation von <i>FTO</i> als „Fettleibigkeits-Gen“	28
1.5.2	Analysen von Funktionsverlust und Funktionssteigerung des <i>Fto</i> -Gens in Mäusen	29
1.6	Ziel dieser Arbeit.....	32
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	Chemikalien und Standardlösungen.....	33

2.2 Tierarbeiten	33
2.2.1 Mauslinien.....	33
2.2.2 Mauszucht und -haltung.....	34
2.2.3 Gewichts- und Längenmessungen.....	34
2.2.4 Blutglukose-Messungen.....	35
2.2.4.1 Glukose-Toleranz-Test.....	35
2.2.4.2 Insulin-Toleranz-Test.....	36
2.2.5 Messung von Insulin im Blutplasma mittels ELISA	37
2.2.5.1 Gewinnung von Plasma aus Vollblut	37
2.2.5.2 Bestimmung der Konzentration von Insulin	37
2.2.6 Semiquantitative Messung von Glukose im Urin.....	38
2.2.7 Erhebung metabolischer Daten.....	39
2.2.7.1 Messung der körperlichen Aktivität.....	39
2.2.7.2 Messung der Nahrungsaufnahme	40
2.2.7.3 Indirekte Kalorimetrie	40
2.2.8 Analyse der Körpermassenanteile	40
2.3 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
2.3.1 Isolation und Aufreinigung von DNA	41
2.3.2 PCR-Amplifikation.....	42
2.3.3 DNA-Restriktionsverdau	46
2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese	46
2.4 Histologische Techniken.....	48
2.4.1 Anfertigung von Paraffinschnitten	48
2.4.2 Anfertigung von Gefrierdünnchnitten.....	49
2.4.3 Hämalaun/Eosin-Färbung auf Paraffindünnchnitten.....	49
2.4.4 <i>Oil red O</i> -Färbung auf Gefrierdünnchnitten der Leber.....	51
2.5 Antikörperfärbung auf Gefrierdünnchnitten.....	52
2.6 Bestimmung der Fettmenge in der Leber	54
2.7 Fotodokumentation und Statistik	55

2.7.1	Fotodokumentation	55
2.7.2	Ausmessungen der Langerhans'schen Inseln auf Pankreasschnitten ...	55
2.7.3	Auswertung der Wiegedaten.....	55
2.7.4	Statistik	56
3	ERGEBNISSE.....	57
3.1	FTO-Defizienz reduziert genetisch bedingte Fettleibigkeit bei Mäusen	57
3.2	FTO-Defizienz führt zu reduzierter Fettmasse in Leptin-defizienten Mäusen.....	60
3.3	FTO-Defizienz führt zu reduzierter Fetteinlagerung in der Leber von Leptin-defizienten Mäusen	64
3.4	Analysen des Glukosestoffwechsels	66
3.4.1	<i>Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}</i> -Mäuse entwickeln keine Hyperglykämie und haben eine verbesserte Glukosetoleranz.....	66
3.4.2	FTO-Defizienz verhindert Hyperplasie der Langerhans'schen Inseln in Leptin-defizienten Mäusen	71
3.4.3	<i>Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}</i> -Mäuse haben stark erhöhte Seruminsulinwerte	74
3.5	Analysen metabolischer Parameter von Leptin-defizienten Mäusen	75
3.5.1	<i>Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}</i> Mäuse zeigen eine reduzierte Nahrungsaufnahme	75
3.5.2	FTO-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Aktivität Leptin-defizienter Mäuse.....	77
3.5.3	FTO-Defizienz hat in jungen Tieren Einfluss auf den Energieumsatz	78
3.6	<i>Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}</i> -Mäuse sind unter den Nachkommen unterrepräsentiert	80
3.7	Analysen an Mäusen mit einem genetischen Mischhintergrund (C57BL/6J/NMRI)	83
3.7.1	<i>Fto^{-/-}</i> -Mäuse mit einem C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund weisen keine erhöhte Sterberate auf.....	83
3.7.2	FTO-Defizienz hat auch in Leptin-defizienten Mäusen mit NMRI- Hintergrund einen positiven Einfluss auf die Gewichtsentwicklung	85

3.7.3	FTO hat auch in <i>Lep^{ob/ob}</i> -Mäusen mit Mischhintergrund Einfluss auf die Blutglukose.....	88
3.7.4	Das Einkreuzen des NMRI-Hintergrundes führt zu Glukosurie in Leptin-defizienten Mäusen	92
3.8	Effekt von Leptin-Defizienz auf <i>Fto^{-/-}</i> -Tiere	93
4	DISKUSSION	95
4.1	FTO ist entscheidend an der Gewichtsentwicklung Leptin-defizienter Mäuse beteiligt	95
4.2	FTO-Defizienz verringert die Nahrungsaufnahme von <i>Lep^{ob/ob}</i> -Mäusen.....	97
4.3	FTO und Leptin.....	99
4.4	FTO und das metabolische Syndrom	99
4.5	Glukosetoleranz und Insulinsensitivität.....	101
4.6	<i>Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}</i> -Mäuse weisen eine erhöhte Sterberate auf.....	102
4.7	Der Einfluss verschiedener genetischer Hintergründe.....	103
4.8	Geschlechtsspezifische Unterschiede	104
4.9	Molekulare Grundlagen	105
4.10	Resümee	107
4.11	Ausblick	108
4.11.1	Glukosemetabolismus.....	108
4.11.2	Analyse des Stoffwechsels	108
4.11.3	Gewebespezifische Funktionsanalysen von FTO	109
4.11.4	Klinische Aspekte.....	109
5	ZUSAMMENFASSUNG	111
6	ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN.....	113
6.1	Abkürzungen	113
6.2	Einheiten	117
7	LITERATUR	118
8	ANHANG.....	137
8.1	Gewichts- und Größenanalysen der Männchen	137

8.2	Körpermassezusammensetzung weiblicher Mäuse im Alter von 16 und 30 Wochen.....	138
8.3	Körpermassezusammensetzung männlicher Mäuse im Alter von 8 und 30 Wochen.....	140
8.4	Leberanalysen männlicher Mäuse.....	141
8.5	Blutglukose-Analysen männlicher Mäuse.....	142
8.6	Gewichts- und Längenmessungen männlicher Mäuse mit C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund.....	144
8.7	Blutglukosewerte männlicher Mäuse mit C57BL/6J/NMRI- Mischhintergrund.....	145
8.8	GTTs und ITTs männlicher Mäuse mit C57BL/6J/NMRI- Mischhintergrund.....	146
9	DANKSAGUNG.....	147
10	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	148

1 EINLEITUNG

1.1 Metabolismus bei Säugetieren

Als Metabolismus wird die Summe der chemischen Reaktionen in einem Organismus bezeichnet. Hierbei wird zwischen katabolen und anabolen Stoffwechselwegen unterschieden. Katabolismus beschreibt den Abbau von komplexen Molekülen zu einfacheren Verbindungen, wobei dem Körper Energie zur Verfügung gestellt wird. Für anabole Stoffwechselwege hingegen wird Energie benötigt. Aus einfachen Molekülen werden komplexere aufgebaut. Tiere, wie auch der Mensch, ernähren sich heterotroph, d.h. sie können nur organische Substanzen nutzen, um sie in körpereigene Stoffe umzuwandeln.

1.1.1 Nahrungsaufnahme

Tiere benötigen Nahrung zur Gewinnung von Energie, als Material für Zellaufbau und -erhalt sowie für Wachstum und Fortpflanzung. Die Regulation der Nahrungsaufnahme ist ein komplexer Mechanismus. In Säugetieren spielt der Hypothalamus im Gehirn eine wichtige Rolle bei der Regulation von Appetit und Sättigung. Aber auch diverse andere Faktoren, wie zum Beispiel der Glukosespiegel, haben Einfluss auf die Nahrungsaufnahme. Die Nahrungsquellen sind abhängig von Spezies und Lebensraum sehr unterschiedlich, doch die Hauptbestandteile der Nahrung unterscheiden sich grundsätzlich nicht. Sie besteht aus drei Hauptgruppen organischer Moleküle: Proteine, Fette und Kohlenhydrate. Um die einzelnen Nährstoffe allerdings nutzen, d.h. resorbieren und verwerten, zu können, ist es nötig, diese zu spalten. Die Spaltungsvorgänge werden unter dem Begriff Verdauung zusammengefasst (Schmidt-Nielsen, 1999, Campbell und Reece, 2003).

1.1.2 Nahrungsverdauung und Resorption

Die Verdauung der Nahrung findet bei Säugetieren in der Mundhöhle, im Magen und im Lumen und Epithelgewebe des Dünndarms statt und erfolgt über enzymatische Spaltung der großen Moleküle zu kleineren. Proteine werden zunächst im Magen

durch das Enzym Pepsin in kurze Polypeptidketten zerlegt. Im Lumen des Dünndarms werden diese von Trypsin, Chymotrypsin, Aminopeptidase und Carboxypeptidase weiter gespalten und letztendlich im Epithelgewebe des Dünndarms durch Dipeptidasen zu einzelnen Aminosäuren verdaut. Fette werden hauptsächlich durch Gallensäure und Lipasen im Darm zu Fettsäuren, Glycerin und Glyceriden verdaut. Der Begriff Kohlenhydrate umfasst Mono-, Di- und Polysaccharide. Monosaccharide, wie Glukose und Fruktose, können unverändert vom Körper resorbiert und direkt genutzt werden. Disaccharide werden im Dünndarmepithel von Disaccharidasen zu Monosacchariden gespalten. Die Verdauung von Polysacchariden beginnt bereits in der Mundhöhle und der Speiseröhre durch das im Speichel enthaltene Enzym Amylase. Es entstehen kürzere Polysaccharide. Im Anschluss werden diese im Lumen des Dünndarms durch Amylasen aus dem Pankreas zu Disacchariden und durch Disaccharidasen im Dünndarmepithelgewebe zu Monosacchariden gespalten. Nach der Verdauung werden die aufgenommenen Nährstoffe größtenteils über das Dünndarmepithel resorbiert und gelangen ins Blut (Schmidt-Nielsen, 1999).

1.1.3 Nahrungsverwertung und Energiespeicherung

Verwertung und Speicherung von Nährstoffen werden innerhalb des Organismus genau reguliert. Das Blut transportiert die aufgenommenen Nährstoffe in alle Organe, welche diese entsprechend ihrer jeweiligen physiologischen Aufgabe verwerten. Einerseits werden z.B. Fettsäuren oder Aminosäuren direkt zum Aufbau zelleigener Strukturen genutzt. Andererseits wird durch verschiedene metabolische Prozesse die in den resorbierten Nährstoffen gespeicherte Energie für sämtliche Lebensprozesse bereitgestellt. Der wichtigste Energieträger ist hierbei das Adenosintriphosphat (ATP).

In gesunden Tieren besteht unter normalen Umständen ein gutes Gleichgewicht zwischen Nahrungsaufnahme und Energiebedarf. Wird allerdings mehr Nahrung aufgenommen, als zur Energiebereitstellung notwendig ist, so kann der Überschuss gespeichert werden. Auf diese Weise können Zeiten verringerten Nahrungsangebotes oder erhöhter Aktivität überstanden werden. Ist der Energieverbrauch höher als die Aufnahme, so wird das Defizit durch den Abbau von

diesen gespeicherten Ressourcen abgedeckt (Schmidt-Nielsen, 1999, Campbell und Reece, 2003).

Im Folgenden werden die Aufgaben metabolisch relevanter Gewebe beispielhaft dargelegt.

1.1.3.1 Das Fettgewebe

Bei adipösem Gewebe wird zwischen zwei unterschiedlichen Typen unterschieden, dem braunen und dem weißen Fettgewebe. Braune Fettzellen sind plurivakuolär und sehr mitochondrienreich. Das braune Fettgewebe dient hauptsächlich der Thermoregulation und ist längst nicht in so großer Menge vorhanden wie weißes Fettgewebe, sein Anteil nimmt beim Menschen sogar im Alter ab (Welsch, 2006). Weißes Fettgewebe befindet sich an zahlreichen Stellen im Körper. Den Großteil des Zellvolumens von Adipozyten nimmt eine lipidgefüllte Vakuole ein. Adipozyten dienen damit primär der Speicherung von energiereichen Triglyzeriden aus Fett und Glukose. Zudem erfüllen sie auch eine mechanische und thermische Schutz- sowie Stützfunktion. Zusätzlich ist das weiße Fettgewebe ein wichtiges endokrines Organ. Einige für metabolische Prozesse relevante Hormone werden von Adipozyten sekretiert. Dazu gehören unter anderem Leptin, Adiponektin und Resistin.

Die Anzahl an Adipozyten ist in adulten Tieren konstant, ihre Größe dagegen ist je nach Grad der Fetteinlagerung variabel. Bei übermäßiger Nahrungsaufnahme wird verstärkt Fett eingelagert und damit das Zellvolumen der Adipozyten vergrößert. Die Regulation der Energiespeicherung und der Energiebereitstellung unterliegt verschiedenen Hormonen, wobei Insulin eine zentrale Rolle spielt. Es stimuliert die Lipidsynthese (Lipogenese) über die Induktion der Lipoproteinlipase. Im gefasteten Zustand, z.B. nach der Nachtruhe, können die Fettvorräte mittels Lipolyse abgebaut und ins Blut freigesetzt werden, um andere Zelltypen damit zu versorgen. Fett ist die bedeutendste Speicherform in höheren Organismen, da es weniger Wasser bindet als Glykogen und dadurch auch weniger Speicherplatz benötigt. Allerdings ist der Abbau von Glykogen für die Zellen schneller realisierbar als der von Fett (Schmidt-Nielsen, 1999, Alberts, *et al.*, 2001).

1.1.3.2 Der Muskel

Die Muskulatur hat im Körper hauptsächlich motorische Funktionen. Es gibt drei verschiedene Muskeltypen mit unterschiedlichen Aufgaben. Die Skelettmuskulatur besteht aus langen vielkernigen Muskelfasern und ist für den Bewegungsapparat zuständig. Die glatte Muskulatur besteht aus kurzen einkernigen Muskelfasern. Sie sind unter anderem für die Darmperistaltik notwendig. Die Herzmuskulatur realisiert durch Kontraktion den Herzschlag. Muskelzellen kontrahieren über Interaktion von Aktinfilamenten und Myosinmotorproteinen. Die dafür notwendige Energie wird durch Hydrolyse von ATP gewonnen. Somit ist der Muskel hauptsächlich ein Energie umsetzendes und kein Speicherorgan. Allerdings wird in Muskelzellen auch Glukose in Form von Glykogen zum Eigenverbrauch gespeichert (Alberts, *et al.*, 2001).

1.1.3.3 Die Leber

Die Leber besteht zu einem Großteil aus Leberzellen, den sog. Hepatozyten, und ist durch ein fein verzweigtes Netzwerk von Gefäßen sehr stark durchblutet. Sie spielt eine zentrale Rolle bei metabolischen Prozessen und hat viele unterschiedliche Aufgaben. Hepatozyten produzieren Gallenflüssigkeit, die für die Verdauung von Fetten aus der Nahrung notwendig ist. Zudem ist die Leber ein wichtiges Organ zur Entgiftung des Körpers. Bei der Verdauung entstandene schädliche Stoffe, wie z.B. Ammoniak, werden in der Leber zu für den Körper harmlosen Stoffen, wie Harnstoff, umgewandelt. Darüber hinaus dient die Leber als Speicherorgan. Gespeicherte Aminosäuren werden z.B. für die Produktion von Gerinnungsfaktoren genutzt, gespeichertes Glykogen wird unter Nahrungsmangel in Form von Glukose ins Blut abgegeben und in geringen Mengen wird auch Fett in Hepatozyten gelagert (Holt und Hanley, 2012).

1.2 Die Regulation des Blutzuckerspiegels

Die Regulation des Energiehaushaltes eines Organismus ist enorm wichtig, um die Energieversorgung der Zellen und Gewebe zu gewährleisten. Ein Grundstein des

Energiehaushaltes ist die Regulation des Glukosespiegels im Blut. Diese wird maßgeblich durch das Hormon Insulin gesteuert (Abb. 1.1).

1.2.1 Insulin

Insulin ist ein Peptidhormon, das von den β -Zellen im endokrinen Teil des Pankreas, den Langerhans'schen Inseln, gebildet und sekretiert wird. Es wird an Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) in den β -Zellen als Präproinsulin synthetisiert. Durch Abspaltung eines Signalpeptids wird das sog. Proinsulin gebildet und vom RER zum Golgi-Apparat transportiert. Anschließend wird dieses über Zinkionen zu Komplexen gebunden. Durch Abspaltung des C (*Connecting*)-Peptids entsteht letztendlich das fertige Insulin-Molekül, das zusammen mit dem C-Peptid in Vesikeln in den β -Zellen gespeichert wird (Holt und Hanley, 2012).

Die Hauptaufgabe von Insulin ist die Aufrechterhaltung eines gleichmäßigen Blutzuckerspiegels, um die Versorgung der Zellen mit Glukose zu gewährleisten. Bei einem Anstieg des Glukosespiegels im Blut, z.B. in Folge einer kohlenhydratreichen Mahlzeit, wird dieser mittels Insulin-unabhängiger Glukosetransporter (GLUT2) von den β -Zellen aufgenommen und in der Glykolyse metabolisiert. Dabei wird ATP produziert, wodurch Kaliumkanäle geschlossen werden und es zu einer Depolarisation der Zellmembran kommt. Dies führt wiederum zum Öffnen von Kalziumkanälen, was einen Anstieg der Kalziumkonzentration in der Zelle zur Folge hat. Die Insulin-Vesikel werden zur Zellmembran transportiert, wo das Insulin mittels Exozytose sekretiert wird (Scheepers, *et al.*, 2004). Es gelangt in den Blutkreislauf und stimuliert die Aufnahme und Speicherung der Glukose in Muskelzellen und Adipozyten. Die Glukoseaufnahme in der Leber wird über Insulin-unabhängige Glukosetransporter (GLUT2) vermittelt, allerdings ist die Speicherung von Glukose und die Glykogensynthese Insulin-abhängig (Scheepers, *et al.*, 2004). Des Weiteren wird durch Insulinstimulation die Lipogenese in Fett- und Leberzellen und die Aufnahme von Aminosäuren induziert sowie die Proteinsynthese in verschiedenen Zellen reguliert (Abbildung 1.1) (Kirwan und del Aguila, 2003).

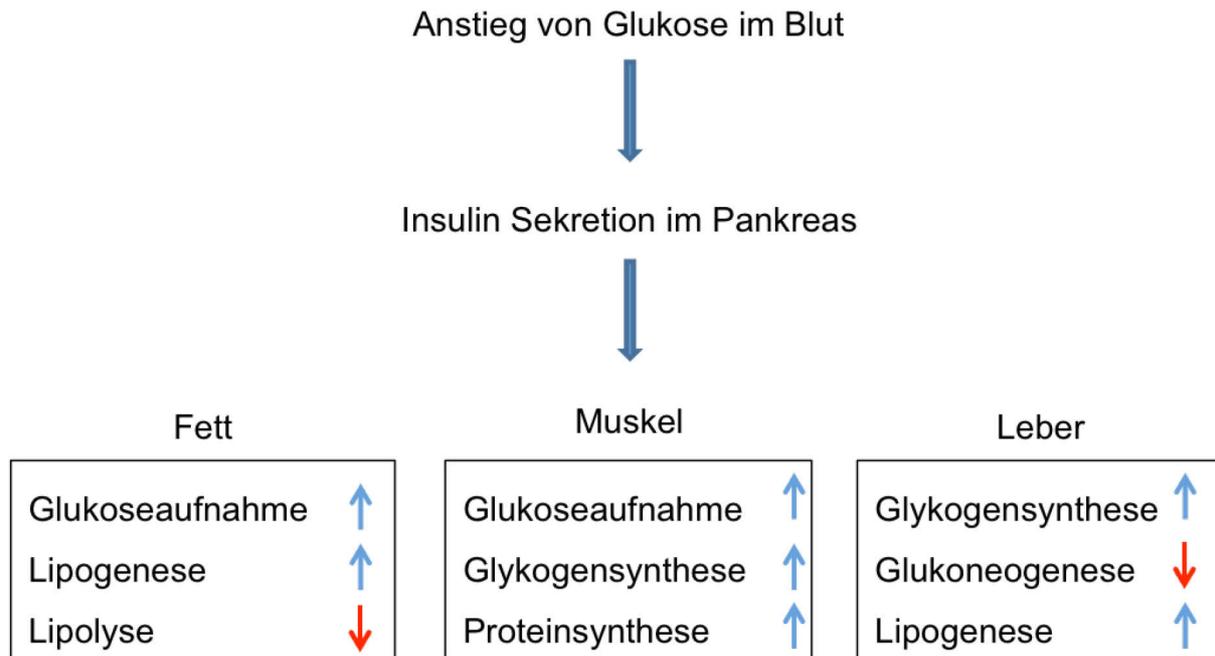


Abb. 1.1: Wirkung von Insulin in vereinfachter Darstellung. Insulin wird als Folge von Glukoseanstieg im Blut von β -Zellen des Pankreas sekretiert. Dargestellt sind seine Wirkung in weißem Fettgewebe, Muskel und Leber. Modifiziert nach Kumar (Kumar, *et al.*, 2007).

Eine Senkung des Blutzuckerspiegels hingegen führt zur Sekretion von Glukagon aus den α -Zellen des Pankreas ins Blut. Glukagon ist ein Antagonist von Insulin und hemmt die Glukoseaufnahme aus dem Blut. Gleichzeitig wird der Abbau von Glykogen und die Glukoneogenese in der Leber stimuliert, um den Glukosespiegel im Blut aufrecht zu erhalten und sämtliche Organe mit Glukose zu versorgen (Holt und Hanley, 2012).

1.2.2 Insulinrezeptoren

Die Funktion von Insulin wird über membranständige Rezeptoren auf Insulin-sensitiven Zellen, wie z.B. Fett-, Leber- und Muskelzellen, vermittelt. Insulinrezeptoren sind Heterotetramere mit jeweils zwei extrazellulären α - und transmembranen β -Untereinheiten. Die β -Untereinheiten besitzen eine Tyrosinkinase-Aktivität. Die Bindung eines Insulinmoleküls an die α -Untereinheiten des Rezeptors führt zu einer Konformationsänderung, der Bindung von ATP und zur Autophosphorylierung am intrazellulären Teil der β -Untereinheiten. Diese Aktivierung hat wiederum eine Reihe von Signalkaskaden zur Folge (Taylor, 1991, Taha und Klip, 1999, Belfiore, *et al.*, 2009) (Abbildung 1.2).

1.2.3 Insulinsignalwege

Die Funktion von Insulin wird über eine Reihe sehr komplexer Signalkaskaden vermittelt. Einige dieser sind in Abbildung 1.2 vereinfacht schematisch dargestellt.

Die Bindung von Insulin an die α -Untereinheit seines Rezeptors führt zur Tyrosin-Autophosphorylierung und Aktivierung der β -Untereinheiten, welche wiederum das Protein *Insulin Receptor Substrat* (IRS) phosphoryliert. Infolge dessen wird eine Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) rekrutiert und aktiviert. Dies wiederum führt zu Synthese von Phosphatidylinositol-3,4-Diphosphat (PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP₃). PIP₃ interagiert mit der Proteinkinase B (PKB, auch AKT genannt) und rekrutiert diese zur Plasmamembran. PKB wiederum induziert verschiedene Signalkaskaden (White, 2002, Kirwan und del Aguila, 2003, Manning, 2010). Zum einen wird die Translokation von Glut4 an die Plasmamembran, vor allem in Fett- und Muskelzellen, und somit die Glukoseaufnahme in die Zelle induziert (Bell, *et al.*, 1990, Saltiel und Kahn, 2001, Lanner, *et al.*, 2008). Zum anderen wird durch PKB die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) inhibiert und dadurch die Glykogensynthese induziert (White, 2002, Kirwan und del Aguila, 2003). Gleichzeitig inhibiert PKB die Glukoneogenese durch die Inhibierung von *Forkhead box class O* (FOXO) (Cheng und White, 2011). Eine weitere wichtige Signalkaskade, die durch PKB induziert wird, ist der *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC 1)-Signalweg. Der Kontrolle dieses Signalweges unterliegen viele grundlegende zelluläre Mechanismen, wie z.B. die Lipidsynthese, die Proteinsynthese, aber auch Zellproliferation und Autophagie (Dibble und Manning, 2013, Ricoult und Manning, 2013).

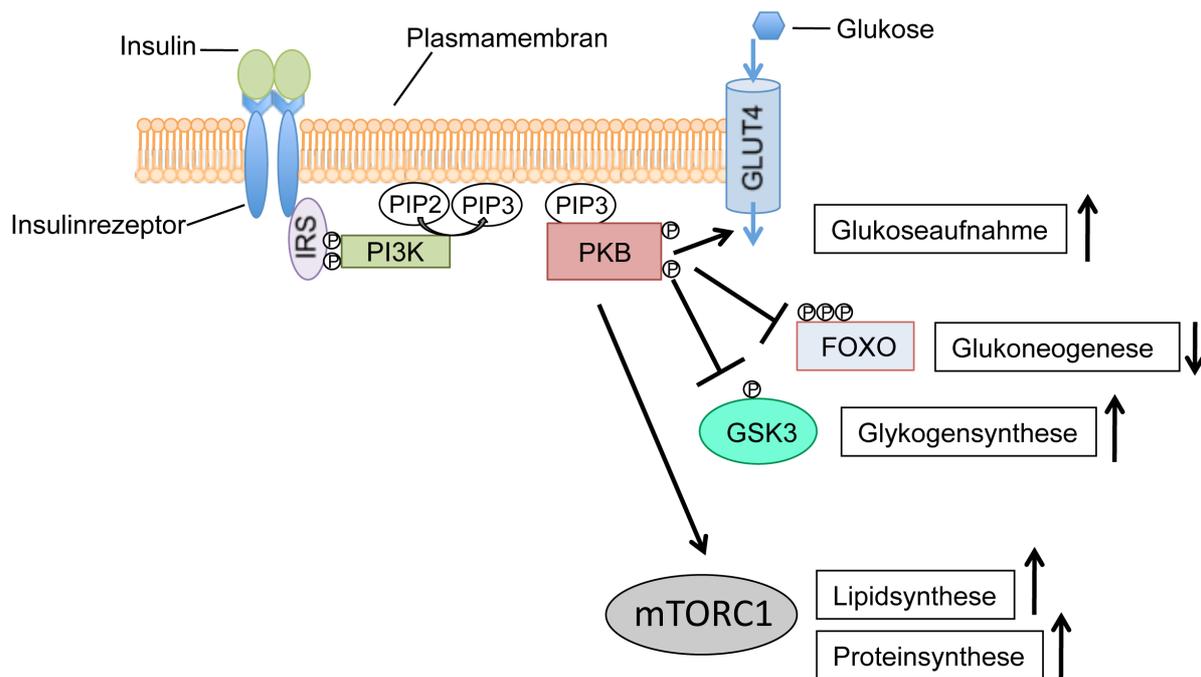


Abb. 1.2: Insulin-induzierte Signalkaskaden. In der Abbildung sind ausgewählte Insulin-induzierte Signalkaskaden schematisch dargestellt. Durch die Aktivierung des Rezeptors durch seinen Liganden Insulin wird IRS (Insulin-Rezeptor-Substrat) phosphoryliert und dadurch aktiviert. PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) wird rekrutiert und ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert. PIP₂ (Phosphatidylinositol-3,4-Diphosphat) und PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat) werden synthetisiert und PIP₃ rekrutiert PKB (Proteinkinase B) an die Plasmamembran. Phosphoryliertes PKB initiiert die Translokation des GLUT4 (Glukosetransporter 4) an die Plasmamembran und so die Glukoseaufnahme in die Zelle. Gleichzeitig wird GSK3 (Glykogensynthase-Kinase 3) inhibiert, wodurch die Glykogensynthese aktiviert wird. FOXO (*Forkhead box class O*) wird ebenfalls inhibiert und damit die Glukoneogenese gehemmt. Zusätzlich aktiviert PKB den mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*)-Signalweg, was zu einer gesteigerten Lipid- und Proteinsynthese führt. Modifiziert nach Manning (www.hsph.harvard.edu).

1.3 Das metabolische Syndrom

Das metabolische Syndrom ist eine Kombination verschiedener stoffwechselassoziierter Symptome, wie Fettleibigkeit, Insulinresistenz, erhöhter Blutzucker oder erhöhter Blutdruck (Alberti, *et al.*, 2005). Eine weltweit anerkannte einheitliche Definition für diese Erkrankung gibt es nicht. Die Weltgesundheitsorganisation (engl.: *World Health Organisation*, WHO) und die *International Diabetes Federation* (IDF) definieren unterschiedliche Kriterien zur Identifizierung von Patienten mit dem metabolischen Syndrom. Die IDF definiert,

dass das metabolische Syndrom vorliegt, wenn abdominale Fettleibigkeit in Kombination mit zwei weiteren Risikofaktoren (erhöhte Triglyzeride im Blut, reduzierte HDL-Werte, erhöhter Blutdruck oder erhöhte Plasmaglukose) gleichzeitig vorliegen (IDF, www.idf.org). Nach Definition der WHO wird das metabolische Syndrom diagnostiziert, wenn Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus Typ 2 und zwei weitere Symptome (erhöhter Taille-Hüft-Verhältnis, erhöhter BMI, erhöhte Blut-Triglyzeride, Bluthochdruck, erhöhte Blutglukose oder Mikroalbuminurie) gleichzeitig vorliegen (Alberti und Zimmet, 1998). Eckel und seine Kollegen erklären, dass Insulinresistenz die am weitesten akzeptierte Beschreibung der Pathophysiologie des metabolischen Syndroms ist (Eckel, *et al.*, 2005).

In den letzten Jahren kam die Erkrankung als ein entscheidender Risikofaktor für *Diabetes mellitus* Typ 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen immer mehr in den Fokus klinischer Studien (Eckel, *et al.*, 2005). Die gängigsten therapeutischen Maßnahmen zielen meist auf die Fettleibigkeit als größten und meist ursächlichen Risikofaktor ab (Grundy, *et al.*, 2004).

1.3.1 Adipositas

Adipositas (Fettleibigkeit) wird durch ein Übermaß an gespeicherten Triglyzeriden im weißen Fettgewebe definiert und entsteht aufgrund eines Ungleichgewichtes zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch eines Organismus (O'Rahilly, 2009). Die zunehmende Häufigkeit dieser Erkrankung ist ein wachsendes Problem der heutigen Zeit. Der Grad der Fettleibigkeit wird über den „*Body Mass Index*“ (BMI) bestimmt. Dieser wird berechnet, indem das Gewicht in Kilogramm durch die Körpergröße in Metern zum Quadrat geteilt wird (kg/m^2). Er gilt als Maßeinheit, um die Körpermasse von erwachsenen Menschen zu definieren und zu bewerten. Laut der WHO wird ein BMI zwischen 18 und 25 als Normalgewicht, ein BMI über 25 mit Übergewicht und ein BMI ≥ 30 als Fettleibigkeit (Adipositas) definiert. Fettleibigkeit gilt als Risikofaktor für diverse teils lebensgefährliche Erkrankungen, wie z. B. Arteriosklerose, Diabetes, Krebs, Schlaganfälle und Depression (WHO, www.who.int (3)).

1.3.1.1 Adipositas - eine moderne Epidemie

Laut Angaben der WHO wurden 2008 weltweit über 1,4 Milliarden Menschen übergewichtig und mehr als eine halbe Milliarde Menschen als stark adipös eingestuft. 2011 wurde festgestellt, dass bereits 40 Millionen Kinder unter fünf Jahren übergewichtig waren. Zwischen 1998 und 2008 hat sich die Zahl der übergewichtigen Menschen weltweit fast verdoppelt und nach Hochrechnungen der WHO werden 2015 bereits 2,3 Milliarde Erwachsene übergewichtig und mehr als 700 Millionen adipös sein (WHO, www.who.int (4)). Bereits 2004 zählte Übergewicht zu den 10 Haupt-Todesursachen weltweit und ist verbreiteter als Untergewicht (WHO, *Global Health Risk Report 2004*, www.who.int (4)).

In Deutschland wurde 2008 die zweite Nationale Verzehrstudie (NVZ II, www.mri.bund.de), die im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz erhoben wurde, veröffentlicht. Aus dieser ging hervor, dass 58,2% der erwachsenen Studienteilnehmer (66% der Männer und 51% der Frauen) übergewichtig bzw. adipös sind (Abbildung 1.3) (NVZ II, www.mri.bund.de).

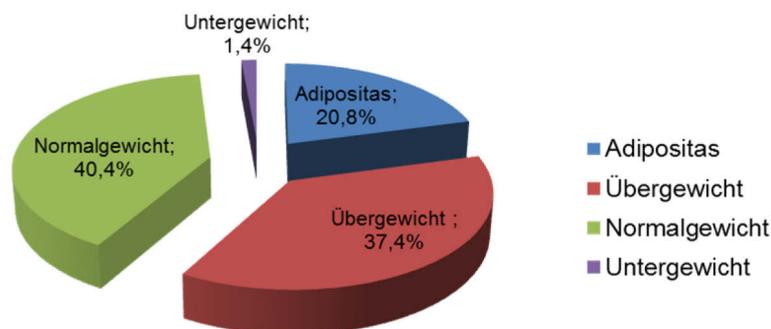


Abb. 1.3: Anteile der Menschen mit Unter-, Normal-, Übergewicht und Adipositas an der Gesamtbevölkerung in Deutschland. Die Daten wurden von November 2005 bis Dezember 2006 im Rahmen der Nationalen Verzehrstudie 2008 im Auftrag des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz erhoben (modifiziert nach: DAG, www.adipositas-gesellschaft.de).

Diese Daten und die Tatsache, dass die Zahl der übergewichtigen Menschen weltweit stetig zunimmt, zeigt die steigende Relevanz, Ursachen und Prävalenzen für Fettleibigkeit zu untersuchen und Therapien für fettleibige Menschen zu entwickeln.

1.3.1.2 Ursachen für Adipositas

In der heutigen Gesellschaft liegen die Gründe für Adipositas hauptsächlich im gesteigerten Verzehr von hochkalorischen Nahrungsmitteln, während die durchschnittliche körperliche Aktivität eher sinkt. Somit kommt es zu einer Disbalance zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch (WHO, www.who.int (7)). Viele verschiedene Faktoren spielen hierbei entscheidende Rollen: das Nahrungsangebot, aber auch das soziale Umfeld, das großen Einfluss auf Essgewohnheiten, körperliche Aktivität und psychische Gesundheit hat (WHO, DAG, NVZ II). Allerdings sind körperliche Aktivität und Ernährungsgewohnheiten nicht die einzigen Faktoren, die das Körpergewicht beeinflussen. Dazu gehören auch genetische Faktoren, die ein Individuum selbst nicht regulieren kann (Abbildung 1.4).

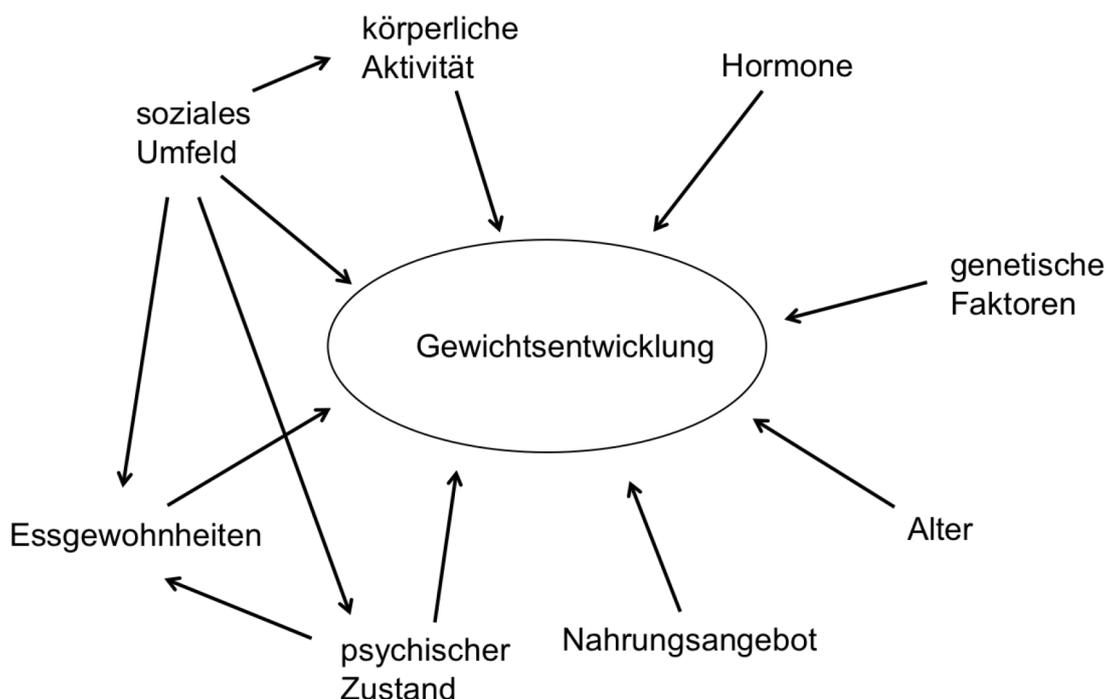


Abb. 1.4: Einwirkung verschiedener Faktoren auf die Gewichtsentwicklung beim Menschen. Unterschiedliche Faktoren haben in unterschiedlichem Grad Anteil an der Gewichtsentwicklung und regulieren sich dabei teilweise gegenseitig (modifiziert nach www.drugline.info).

In den letzten Jahren wurden immer mehr Gene identifiziert, die eine Rolle bei der Gewichtsentwicklung spielen (Hofker und Wijmenga, 2009, Speliotes, *et al.*, 2010). Besonders hormonelle Defekte haben einen großen Einfluss auf Nahrungsaufnahme und -verwertung. Hierbei kann die Ursache monogenetischen Ursprungs sein, wobei

die Mutation eines einzelnen Gens einen dramatischen Effekt hat. Ein Beispiel dafür ist das zirkulierende Hormon Leptin, auf das in dieser Arbeit noch genauer eingegangen wird (siehe Kapitel 1.4). Weitaus häufiger sind allerdings sog. polygenetische Ursachen, bei denen mehrere Gene zur Ausprägung des Phänotyps beitragen. Durch Vergleichsstudien in der Bevölkerung, sog. genomweiten Assoziationsstudien (GWAS), werden die Risikofaktoren der einzelnen Allele eines Gens identifiziert und bewertet. Bei Vergleichsstudien zwischen adipösen Patienten und schlanken Kontrollpersonen konnten seit 2007 über 50 Kandidatengene gefunden werden, die mit Fettleibigkeit und deren Folgen in Zusammenhang stehen (Loos, 2012).

1.3.2 Ektopische Fettakkumulation

Ein Faktor, der als Folge von Fettleibigkeit zum metabolischen Syndrom gezählt wird, ist eine extreme ektopische Fettakkumulation.

Aus der Nahrung aufgenommene überschüssige Kalorien werden primär als Fett in Adipozyten in dafür vorgesehenen sog. Fettdepots eingelagert. Allerdings können Triglyzeride auch in anderen Geweben, wie z.B. Herz, Pankreas, Muskel und Leber, gespeichert werden. Bei der Entstehung von Adipositas kommt es zu sog. ektopischen Fetteinlagerung (Steatose), einer, aufgrund einer erhöhten Lipogeneserate verstärkten Auslagerung von Fetten in andere Organe. Diese beruht auf erhöhten Mengen an freien Fettsäuren und einer erhöhten Fettsäuresynthese in den Zellen (Lee, *et al.*, 1997, Unger und Orci, 2001). Obwohl Triglyzeride selbst nicht toxisch sind, kann eine verstärkte Einlagerung Einfluss auf die jeweilige Funktion des betroffenen Organs haben (Unger und Orci, 2001). So führt die erhöhte Fetteinlagerung in Langerhans'schen Inseln des Pankreas zu Fibrose (Higa, *et al.*, 1999) und im Myokard zu reduzierter Kontraktion sowie morphologischen Veränderungen des Herzens (Zhou, *et al.*, 2000). Die nicht-alkoholische hepatische Steatose (Fettleber) wurde ebenfalls mit Symptomen des metabolischen Syndroms in Zusammenhang gebracht. Sie hat eine Vielzahl von Folgen, wie Fibrosen, Steatohepatitis und Leberzirrhose, bis hin zu Karzinomen und damit zu Funktionsstörungen des Organs (Zhou, *et al.*, 2000, van Herpen und Schrauwen-Hinderling, 2008). Durch die Wirkung der übermäßigen Verfettung bestimmter

Organe bis hin zum Funktionsverlust wird auch von Lipotoxizität gesprochen (Schaffer, 2003).

1.3.3 Insulinresistenz

Die Entwicklung einer Insulinresistenz ist ein weiteres schwerwiegendes Symptom, das eng in Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom steht. Insulinresistenz bezeichnet einen Zustand, in dem die insulinabhängige Regulation der Glukoseaufnahme und Glukosefreisetzung der Zellen von Insulin-sensitivem Gewebe nicht ausreichend funktioniert (Holt und Hanley, 2012). Häufig steht dieser Zustand in direkter Verbindung zu Übergewicht und ist eine Vorstufe zum Typ 2 Diabetes.

Fettleibigkeit ist hauptsächlich eine Folge von übermäßiger Nahrungsaufnahme (Hyperphagie). Eine ständige und exzessive Nahrungsaufnahme führt zu einem permanent erhöhten Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie) sowie erhöhter Mengen an freien Fettsäuren im Blut. Um die Hyperglykämie durch Glukoseaufnahme zu kompensieren, wird die Insulinproduktion in den β -Zellen stetig erhöht (Polonsky, *et al.*, 1988). Dies geschieht hauptsächlich durch Vergrößerung der β -Zellmasse (Pick, *et al.*, 1998). In adulten, gesunden Tieren wird die β -Zellmasse durch Apoptose und Zellneubildung strikt reguliert (Bonner-Weir, 2000). Die Vergrößerung der β -Zellmasse während der Entstehung einer Insulinresistenz ist hauptsächlich auf Zellvermehrung (Hyperplasie) zurückzuführen. Vergrößerung der einzelnen Zellen (Hypertrophie) kann aber auch eine Rolle spielen (Weir und Bonner-Weir, 2004).

Die genaue Ursache dafür, dass ab einem bestimmten Zeitpunkt der Insulinsignalweg in einem oder mehreren Geweben nicht mehr geregelt abläuft, ist nicht eindeutig geklärt. Die Störung des Mechanismus kann an verschiedenen Stellen des Signalwegs auftreten und unterschiedliche Gründe haben (Johnson und Olefsky, 2013). Eine Möglichkeit ist, dass die Insulinämie selbst die Ursache ist (Rask-Madsen und Kahn, 2012). So konnte bereits 1974 *in vitro* gezeigt werden, dass chronisch erhöhte Insulinwerte in humanen Lymphozyten zur Reduktion der Insulinrezeptoren führten (Gavin, *et al.*, 1974). Die verstärkte Fettakkumulation gilt auch als direkte Ursache für die Entstehung einer Insulinresistenz. Sie führt zur Fettsäurefreisetzung sowie zur Akkumulation von Makrophagen und proinflammatorischen Signalmolekülen (Weisberg, *et al.*, 2003). Die Menge an freien Fettsäuren ist erhöht und gesättigte Fettsäuren aktivieren proinflammatorische

Signalkaskaden, die wiederum Insulinsignale durch Serin-Phosphorylierung von IRS-1 blockieren können (Glass und Olefsky, 2012). Ähnliche Erklärungen existieren auch für die Entwicklung einer hepatischen Insulinresistenz aufgrund einer nicht-alkoholbedingten Fettleber (Takamura, *et al.*, 2012).

Im Muskel kann eine Insulinresistenz durch eine verminderte Translokation des Glukosetransporters GLUT4 an die Zelloberfläche und somit durch eine reduzierte Glukoseaufnahme induziert werden (Rask-Madsen und Kahn, 2012).

1.4 Die Regulation der Nahrungsaufnahme durch Leptin

Die Regulation der Nahrungsaufnahme ist eine enorm wichtige Funktion des Körpers, um stets genügend Nährstoffe zur Verfügung zu haben. Dabei ist es nötig, dass sie an die physiologischen Umstände, wie zum Beispiel Aktivität, Ernährungsstatus und Gesundheit des Individuums, angepasst ist. Die Nahrungsaufnahme wird durch verschiedene Hormone gesteuert. Eines dieser Schlüsselhormone ist Leptin. Es reguliert sowohl die Nahrungsaufnahme als auch den Energieumsatz. Die Aminosäuresequenz dieses Proteins ist im *Leptin*-Gen kodiert. Im Genom der Maus ist es auf dem Chromosom 6 lokalisiert, beim Menschen auf dem Chromosom 7. Leptin ist ein hochkonserviertes Protein, bestehend aus 167 Aminosäuren (Zhang, *et al.*, 1994), das hauptsächlich von ausgereiften Adipozyten sekretiert wird. Die Leptin-Konzentration im Blut ist demnach abhängig von der Fettakkumulation. In gefastetem Zustand ist der Leptinspiegel niedrig, nach der Nahrungsaufnahme steigt er an (Maffei, *et al.*, 1995, Saladin, *et al.*, 1995, Spanswick, *et al.*, 1997). Seine Wirkung vermittelt Leptin über Leptin-Rezeptoren (Lep-R). Es existieren verschiedene Isoformen des Rezeptors, die alle dieselbe extrazelluläre Leptin-Bindedomäne besitzen. Allerdings besitzt nur die lange Form eine intrazelluläre c-terminale Domäne, die eine Signalübertragung über den JAK/STAT-Signalweg vermittelt (Bates, *et al.*, 2003, Bates, *et al.*, 2005). Diese wird hauptsächlich in verschiedenen Populationen von Neuronen im Hypothalamus, dem *Nucleus arcuatus* (ARC) und dem *Nucleus paraventricularis* (PVN), exprimiert (Schwartz, *et al.*, 1996, Fei, *et al.*, 1997, Friedman, 1998). In der Leptin-Signalvermittlung spielen zwei Neuronenpopulationen des ARC eine bedeutende

Rolle. In einer Population werden die Appetit-stimulierenden Neuropeptide *Agouti-Related Protein* (AgRP) und Neuropeptid Y (NPY) exprimiert, die durch Leptin inhibiert werden. In einer zweiten Neuronenpopulation werden die Appetit-zügelnden Transmitter Proopiomelanocortin (POMC) und *Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript* (CART) exprimiert, die durch Leptin aktiviert werden. Auf diese Weise wird die Nahrungsaufnahme durch Leptin über das Hungergefühl gesteuert. Abbildung 1.5 gibt einen stark vereinfachten Überblick über den Leptin-Signalweg: Im gefasteten Zustand führt die Reduktion der gespeicherten Fettmenge zu einer reduzierten Leptinsekretion. Dies wiederum führt zur Stimulierung der AgRP/NPY-Expression und einer Unterdrückung der Expression von POMC/CART. Die Folge ist eine Steigerung des Hungergefühls und damit der Drang zur Nahrungsaufnahme, gleichzeitig wird der Energieverbrauch reduziert. Andererseits führt eine Zunahme der Fettmenge zu einer gesteigerten Leptin-Konzentration im Blut. AgRP/NPY Neuronen werden unterdrückt, POMC/CART Neuronen werden stimuliert und ein Sättigungsgefühl tritt ein. Zugleich wird der Energieumsatz erhöht (Ahima, *et al.*, 1996, Schwartz, *et al.*, 2000, Balthasar, *et al.*, 2004) (s. Abbildung 1.5).

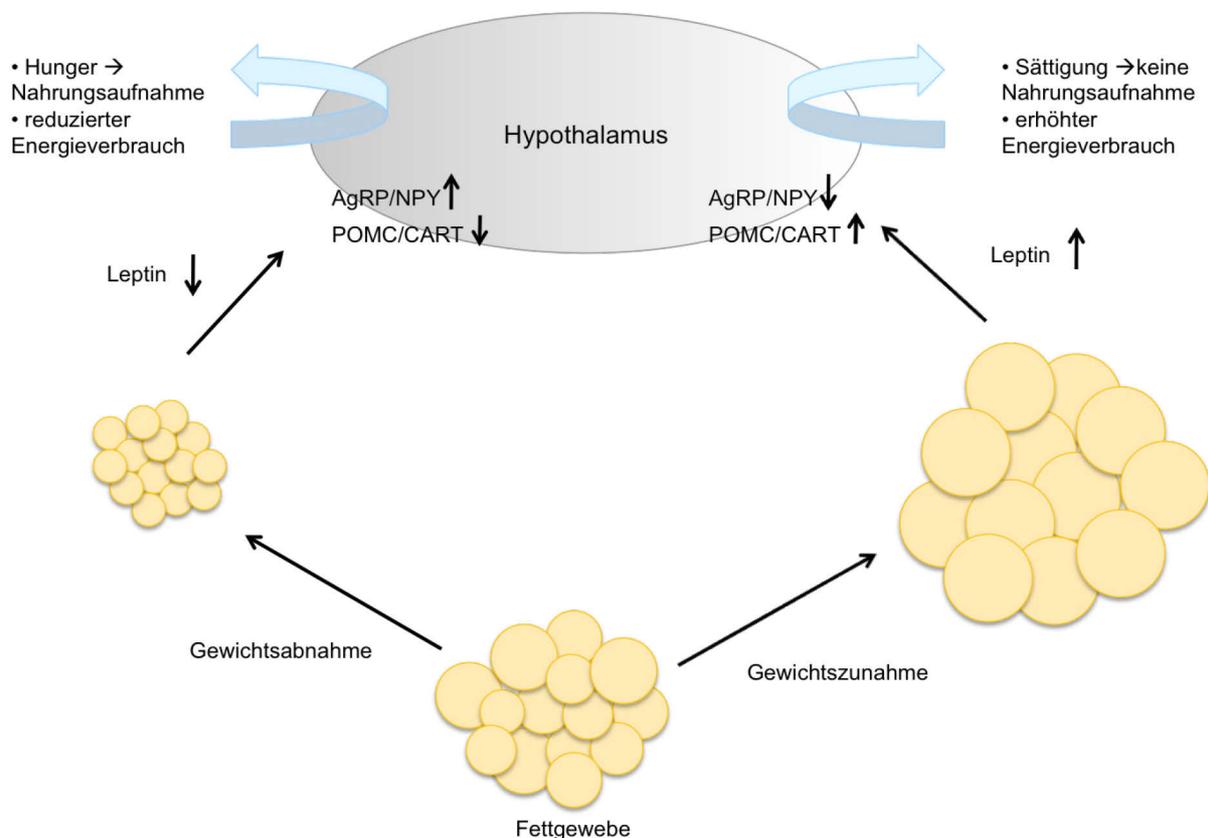


Abb. 1.5: Darstellung der Gewichtsregulation durch Leptin. Leptin wird von Adipozyten sekretiert und wirkt auf unterschiedliche Neuronenpopulationen im Gehirn. Bei

Gewichtszunahme nimmt auch die Masse an weißem Fettgewebe zu. Leptin wird verstärkt ins Blut abgegeben, hemmt die Expression der Appetit-stimulierenden Neuropeptide AgRP und NPY und induziert die Expression der Appetit-zügelnden Transmitter POMC und CART. Ein Sättigungsgefühl setzt ein, der Drang zur Nahrungsaufnahme wird gestoppt und gleichzeitig wird der Energieverbrauch erhöht. Bei einer Gewichtsabnahme wird die Masse an weißem Fettgewebe reduziert. Die Expression der Appetit-stimulierenden Proteine wird nicht mehr gehemmt und die der Appetit-zügelnden Proteine nicht mehr induziert. Der Organismus bekommt ein Hungergefühl und wird zur Nahrungsaufnahme gedrängt. Gleichzeitig wird der Energieverbrauch heruntergefahren. Modifiziert nach Friedman (Friedman, 1998).

Erblich bedingte Defizite im Leptin-Signalweg führen im Menschen bereits im Kindesalter zu starkem Übergewicht. 1996 wurde eine Mutation nahe des *Leptin*-Gens gefunden, das mit quantitativen Unterschieden in verschiedenen Merkmalen von Fettleibigkeit in Verbindung gebracht werden konnte (Duggirala, *et al.*, 1996). In einer pakistanischen Familie konnte 1997 eine Mutation im *Leptin*-Gen identifiziert werden, die homozygot vorhanden zu enormer Adipositas zweier Kinder führte (Montague, *et al.*, 1997). Strobel und Kollegen konnten außerdem in einer türkischen Familie eine Mutation nachweisen, die den intrazellulären Transport von Leptin beeinträchtigt und homozygot zu extremer Adipositas führte (Strobel, *et al.*). In den letzten Jahren wurden Leptin-defiziente Menschen verschiedenster Herkunft untersucht. Alle Individuen kamen mit normalem Geburtsgewicht zur Welt und entwickelten binnen kürzester Zeit ein starkes Übergewicht. In einigen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass die Behandlung von Leptin-defizienten Menschen mit Leptin einen positiven Effekt auf die Nahrungsaufnahme und auf die Gewichtsentwicklung hat (Ozata, *et al.*, 1999, Farooqi, *et al.*, 2002, Licinio, *et al.*, 2004, Fatima, *et al.*, 2011, von Schnurbein, *et al.*, 2013).

1.4.1 Das *Lep^{ob/ob}*-Mausmodell

Besonders in den letzten Jahren ist die Identifizierung und Untersuchung von Genen, die an der Entstehung von Adipositas und Typ 2 Diabetes beteiligt sind, in den Fokus der medizinischen Forschung gerückt. Tiermodelle sind in der medizinischen Forschung ein wichtiger Bestandteil, um Grundlagen menschlicher Erkrankungen zu untersuchen. Hierbei ist besonders die Maus ein oftmals verwendeter Modellorganismus. Ihre hohe Reproduktionsrate und eine relativ einfachen Haltung sind von Vorteil für Forschung an genetischen Erkrankungen. Das Genom der Maus

ist vollständig sequenziert und zeigt in vielerlei Hinsicht große Übereinstimmungen mit dem menschlichen (Batzoglou, *et al.*, 2000), was von großem Nutzen für die Untersuchung genetischer Faktoren ist.

Sogenannte *Lep^{ob/ob}*-Mäuse wurden das erste Mal 1949 im Roscoe B. Jackson Memorial Laboratory, Bar Harbor, Maine beschrieben. In einer Mauskolonie traten plötzlich Nachkommen auf, die ab dem Alter von 4 Wochen deutlich dicker wurden als ihre Geschwister (Ingalls, *et al.*, 1950). 1994 konnte die genetische Grundlage für den fettleibigen Phänotyp der Tiere aufgedeckt werden, eine Spontanmutation im *Leptin (Lep)*-Gen, das für das Hormon Leptin kodiert. *Lep^{ob/ob}*-Mäuse leiden, aufgrund einer Mutation, durch die eine für Arginin kodierende Sequenz von einem frühzeitigen Stop-Codon ersetzt wird, unter einer Leptin-Defizienz (Zhang, *et al.*, 1994). Aufgrund der fehlenden Leptin-Signalübertragung setzt nach der Nahrungsaufnahme kein Sättigungsgefühl bei diesen Tieren ein. Sie leiden unter permanentem Hungergefühl und dementsprechend auch unter einer Hyperphagie. Aus der verstärkten Fetteinlagerung entwickelt sich im Laufe der folgenden Wochen eine extreme Adipositas (Abbildung 1.6).

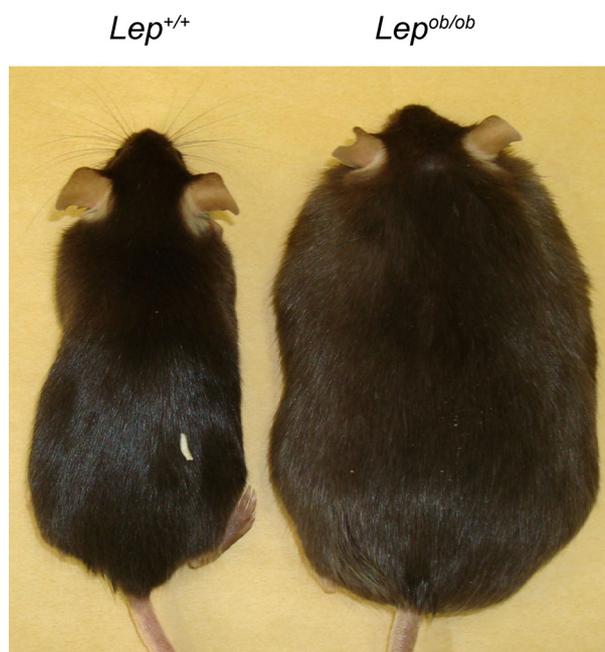


Abb. 1.6: Phänotyp der Leptin-defizienten Maus. Die Abbildung zeigt weibliche Geschwister im Alter von 30 Wochen. Die Tiere sind aus einer *Lep^{ob/+}* x *Lep^{ob/+}*-Verpaarung in der TVA der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf entstanden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Leptin-defiziente (*Lep^{ob/ob}*) Maus (rechts) im Vergleich zur wildtypischen (*Lep^{+/+}*) (links) länger und stark adipös ist (Foto: Kathrin Ikels).

Von der übermäßigen Fetteinlagerung sind neben den natürlichen Fettdepots auch verschiedene andere Organe betroffen, z.B. weisen die Leber, das Herz und das braune Fettgewebe verstärkte Lipideinlagerungen auf. Diese ektopischen oder übermäßigen Fetteinlagerungen können wiederum zu verminderter Funktionsfähigkeit der betroffenen Organe führen (Lipotoxizität) (Unger, 2003). Aufgrund der gesteigerten Nahrungsaufnahme sind *Lep^{ob/ob}*-Mäuse hyperglykämisch und weisen eine hohe Konzentration an Insulin im Blut auf (Hyperinsulinämie) (Ingalls, *et al.*, 1950, Mayer und Barnett, 1953, Westman, 1968). Die Langerhans'schen Inseln im Pankreas der Tiere sind extrem groß, mit einer gesteigerten Menge an Insulin produzierenden β -Zellen (Bleisch, *et al.*, 1952). Daher stellen sie ein beliebtes Modell für die Forschung an Insulinresistenz, Adipositas und dem metabolischen Syndrom dar (Lindström, 2007, Fellmann, *et al.*, 2013). Neben den metabolischen Störungen zeigen *Lep^{ob/ob}*-Mäuse noch einige weitere Merkmale, wie Veränderungen im Immunsystem und Unfruchtbarkeit (Rosenbaum und Leibel, 1998, Lindström, 2007).

In verschiedensten Studien wurde bereits untersucht, inwieweit dem fettleibigen Phänotypen vorgebeugt oder er behandelt werden kann. Beispielsweise haben die Behandlungen mit Leptin, BMP7 (*bone morphogenic protein 7*) oder Irf9 (*interferon regulatory factor 9*) einen reduzierenden Effekt auf die Entwicklung einer Adipositas bzw. deren Folgen (Lalonde, *et al.*, 2004, Townsend, *et al.*, 2012, Wang, *et al.*, 2013). Auch genetische Manipulationen, z. B. an Genen des Stoffwechsels, kann der Entwicklung von Adipositas und auch einer Insulinresistenz in Leptin-defizienten Tieren entgegenwirken (Erickson, *et al.*, 1996, Schäfer, *et al.*, 2001, Newhall, *et al.*, 2005, Medina-Gomez, *et al.*, 2007).

1.5 Das „Fat mass and obesity associated“-Gen (Fto)

Das „*Fat mass and obesity associated*“ (*Fto*)-Gen wurde erstmals 1999 beschrieben (Peters, *et al.*, 1999). Es konnte als eines von sechs Genen identifiziert werden, die in der *Fused toes (Ft)*-Maus-Mutante betroffen sind. Mäuse, die diese Mutation, eine 1,6 Mb großen Deletion auf dem Chromosom 8, homozygot tragen, sterben zwischen Embryonaltag (E)10,5 und E12,5 aufgrund einer Vielzahl schwerwiegender

Entwicklungsstörungen, wie Störungen im programmierten Zelltod, Defekten in der Rechts-Links-Asymmetrie und kraniofazialen Missbildungen. Heterozygot vorhanden führt diese Mutation in Mäusen aufgrund eines gestörten programmierten Zelltodes zu Syndaktylie der Vordergliedmaßen, sowie Hyperplasie des Thymus (van der Hoeven, *et al.*, 1994).

Das *Fto*-Gen besteht aus neun Exons und ist das größte der in der *Ft*-Mutante betroffenen Gene. Daher entstand der mittlerweile veraltete Gen-Name *Fatso* (*Fto*). Es kodiert für ein 502 Aminosäuren großes Protein (FTO), das in allen Vertebraten und Algen hochkonserviert ist (Robbens, *et al.*, 2008). Das Gen wird ubiquitär exprimiert und das Protein ist hauptsächlich im Kern lokalisiert (Peters, *et al.*, 1999, Gerken, *et al.*, 2007, Fischer, *et al.*, 2009). N-terminal besitzt das Protein ein Kernlokalisierungssignal und *in silico*-Analysen ordnen es der Fe(II) 2-Oxoglutarat (2-OG)-abhängigen Dioxygenase-Superfamilie zu (Gerken, *et al.*, 2007, Sanchez-Pulido und Andrade-Navarro, 2007). Mitglieder dieser Familie sind unter anderem an essentiellen Mechanismen der Genregulation, wie DNA-Reparatur und epigenetischen und posttranslationalen Modifikationen, beteiligt (Ozer und Bruick, 2007). Genauere Analysen zeigten, dass die Sequenz des FTO-Proteins starke Ähnlichkeiten mit der Sequenz des DNA-Reparatur-Enzyms Alpha-Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase AlkB aus *E.coli* und deren Homologen AlkBH2 und AlkBH3 in Säugetieren aufweist (Gerken, *et al.*, 2007, Sanchez-Pulido und Andrade-Navarro, 2007). *In vitro* wurde bestätigt, dass FTO in der Lage ist Fe(II)- und 2-OG-abhängige Demethylierung von 3-Methyl-Thymin (3meT) und 3-Methyl-Uracil (3meU) einzelsträngiger DNA und RNA zu katalysieren (Gerken, *et al.*, 2007, Jia, *et al.*, 2008). Spätere Analysen identifizierten N⁶-Methyl-Adenosin (6meA) in DNA und RNA als weiteres Substrat von FTO (Jia, *et al.*, 2012). Bisher ist nicht endgültig geklärt, welche der Basen endogen ein Substrat für das FTO-Protein darstellen. Weitere *in vitro* Studien lieferten Hinweise darauf, dass FTO im Signalweg der Aminosäure-Messung involviert ist und damit eine Rolle bei der Protein-Biosynthese spielt (Cheung, *et al.*, 2012, Gulati, *et al.*, 2013). Untersuchungen des Zellwachstums und der Translationsrate in wildtypischen (*Fto*^{+/+}) und FTO-defizienten (*Fto*^{-/-}) Fibroblasten aus Mausembryonen (engl.: *mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) weisen darauf hin, dass FTO im *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1)-Signalweg eine Rolle spielt (Gulati, *et al.*, 2013). Dieser Signalweg ist unter anderem an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligt (Cota, *et al.*, 2006). Detaillierte Kenntnisse über

Signalwege bzw. die Wirkungsweise und Wirkungsorte von FTO gibt es bisher allerdings nicht.

1.5.1 Identifikation von *FTO* als „Fettleibigkeits-Gen“

In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) wurden in den letzten Jahren über 50 genetische Loci identifiziert, die als Kandidaten für einen Zusammenhang mit Fettleibigkeit bzw. dazugehörigen Merkmalen gelten (Speliotes, *et al.*, 2010, Loos, 2012). 2007 wurde *FTO* in diversen GWAS identifiziert und zeigte die stärkste Korrelation mit dem Vorhandensein von Übergewicht (Speliotes, *et al.*, 2010). Dabei konnten Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl.: *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) im ersten Intron des *FTO*-Gens in direkten Zusammenhang mit dem *Body Mass Index* (BMI) gebracht werden (Dina, *et al.*, 2007, Frayling, *et al.*, 2007, Scuteri, *et al.*, 2007). So wurde gezeigt, dass Menschen, die homozygot ein sog. Risikoallel tragen, im Durchschnitt etwa 3 Kilogramm mehr wiegen und ein 1,67-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Adipositas haben, als Menschen, die dieses Risikoallel nicht tragen (Frayling, *et al.*, 2007). Diese Zusammenhänge konnten in verschiedenen Studien unterschiedlicher Bevölkerungsgruppen bestätigt werden (Hotta, *et al.*, 2008, Peeters, *et al.*, 2008, Tan, *et al.*, 2008, Villalobos-Comparan, *et al.*, 2008, Cornes, *et al.*, 2009). In weiteren Studien wurden Assoziationen von SNPs des *FTO*-Gens mit dem Körperfettanteil, dem Taille-Hüft-Verhältnis (Waist- Hip-Ratio, WHR), dem Leptinspiegel im Blut und Diabetes mellitus Typ 2 beobachtet (Scott, *et al.*, 2007, Andreasen, *et al.*, 2008, Vasan, *et al.*, 2013). Zusätzlich konnte eine Verbindung von *FTO*-Risikoallelen und der Entstehung von Adipositas in der Kindheit festgestellt werden (Dina, *et al.*, 2007, Frayling, *et al.*, 2007, Hinney, *et al.*, 2007, Lopez-Bermejo, *et al.*, 2008). Lopez-Bermejo und seine Kollegen konnten zeigen, dass Kinder, die das Risikoallel homozygot tragen, zwar zum Zeitpunkt der Geburt keinen Gewichtsunterschied zu Kindern mit dem nicht-Risikoallel zeigten, aber im Alter von 2 Wochen bereits signifikant schwerer waren und mehr abdominales Fettgewebe aufwiesen (Lopez-Bermejo, *et al.*, 2008). Einige GWAS fanden auch Korrelationen der *FTO*-Risikoallele mit dem Auftreten des metabolischen Syndroms (Al-Attar, *et al.*, 2008, Sjögren, *et al.*, 2008, Wang, *et al.*, 2010, Wang, *et al.*, 2012). Allerdings gibt es auch Studien mit kontroversen Ergebnissen. So konnte eine andere Studie an kaukasischen Frauen keinen direkten

Zusammenhang eines Risikoallels mit dem metabolischen Syndrom finden (de Luis, *et al.*, 2013).

1.5.2 Analysen von Funktionsverlust und Funktionssteigerung des *Fto*-Gens in Mäusen

Bei der Erforschung von Proteinen liefern sogenannte „Funktionsverlust- und Funktionssteigerungsexperimente“ gute Hinweise auf die Proteinfunktionen *in vivo*. Hierbei werden im Versuchs-Organismus Gene herunterreguliert bzw. inaktiviert oder überexprimiert und die Auswirkungen untersucht.

Im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere wurden genetisch veränderte Mäuse, die einen vollständigen Verlust von FTO aufwiesen (*Fto*^{-/-}-Mäuse), generiert und phänotypisch analysiert. Dazu wurden die Exons 2 und 3 durch eine Neomycin (Neo)-Kassette ersetzt und dadurch ein vollständiger Verlust des Proteins herbeigeführt (Fischer, *et al.*, 2009). *Fto*^{-/-}-Mäuse zeigen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern eine deutliche Wachstumsretardation und unter normalen Futterbedingungen (engl.: *Normal Chow*, NC) eine signifikant verringerte Gewichtszunahme (Abb. 1.7 a+b). Fetteinlagerungen und Adipozytengröße sind reduziert und dadurch auch die Leptinspiegel im Blut der Tiere. Männliche *Fto*^{-/-}-Mäuse weisen sogar unter den extremen Ernährungsbedingungen einer fettreichen Diät (engl.: *High Fat Diet*, HFD) eine geringere Gewichtszunahme auf, als *Fto*^{+/+}-Geschwister (Abbildung 1.7 c). Untersuchungen in sogenannten Stoffwechsellkäfigen konnten zeigen, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse bezogen auf die fettfreie Körpermasse (FFM) eine relative Hyperphagie und einen erhöhten Energieumsatz aufweisen, ihre physikalische Aktivität aber reduziert ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese metabolischen Veränderungen mit einer erhöhten sympathischen Aktivität aufgrund von erhöhten Adrenalin- und Noradrenalinwerten einhergeht. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Tieren eine gesteigerte Insulinsensitivität aufweisen. Die Untersuchungen an *Fto*^{-/-}- und *Fto*^{+/+}-Tieren ließen also erkennen, dass die Inaktivierung von *Fto* in Mäusen vor Fettleibigkeit schützt (Fischer, *et al.*, 2009).

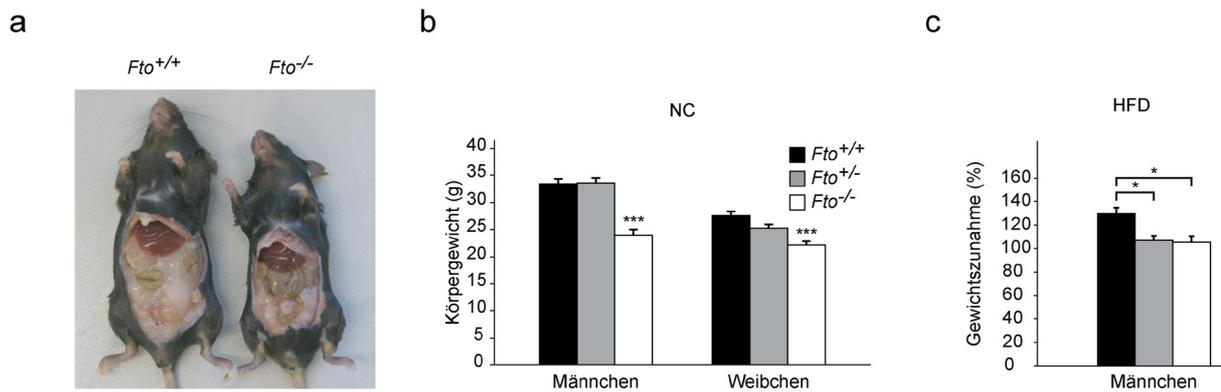


Abb. 1.7: Vergleich von wildtypischen und FTO-defizienten Mäusen. a) Aufnahme männlicher Mäuse im Alter von 20 Wochen. Es ist ein deutlicher Größenunterschied zu erkennen sowie eine Reduktion der Fettmasse in der FTO-defizienten Maus. b) Körpergewicht männlicher und weiblicher *Fto*^{+/+}, *Fto*^{+/-} und *Fto*^{-/-}-Mäuse im Alter von 20 Wochen. Sie wurden mit normalem Futter (NC) gefüttert. Bei beiden Geschlechtern ist eine Gewichtsreduktion durch den Verlust von FTO zu beobachten. c) Gewichtszunahme von männlichen Mäusen, nachdem sie ab dem Alter von 8 Wochen über eine Zeit von 12 Wochen mit einer kalorienreichen Nahrung (HFD) gefüttert wurden. Sowohl *Fto*^{+/-} als auch *Fto*^{-/-}-Mäuse weisen eine geringere Gewichtszunahme auf als wildtypische Geschwister. Abbildung modifiziert nach Fischer (Fischer, *et al.*, 2009).

In den letzten Jahren wurden verschiedene *Fto*-Mausmutanten generiert (Church, *et al.*, 2009, Gao, *et al.*, 2010, McMurray, *et al.*, 2013). Eine weitere konstitutive *Fto*-Mutante wurde 2010 beschrieben (Gao, *et al.*, 2010). Es konnten dieselben Beobachtungen gemacht werden, wie in der ersten Linie bereits beschrieben (Fischer, *et al.*, 2009), mit Ausnahme der Tatsache, dass die Fettmasse nicht reduziert und bei den Weibchen sogar erhöht war. Allerdings konnte kein vollständiger FTO-Verlust gezeigt werden (Gao, *et al.*, 2010). 2013 wurde noch eine Mauslinie beschrieben, in der das *Fto*-Gen inaktiviert wurde. Auch hier konnten vergleichbare Beobachtungen gemacht werden, wie Fischer und ihre Kollegen sie beschrieben haben. Allerdings konnten keine Unterschiede im Energieumsatz und in der Futteraufnahme zwischen wildtypischen und *Fto*^{-/-}-Tieren gefunden werden (McMurray, *et al.*, 2013). Auffällig war in allen drei analysierten Mauslinien eine erhöhte Sterberate der FTO-defizienten Tiere nach der Geburt (Fischer, *et al.*, 2009, Gao, *et al.*, 2010, McMurray, *et al.*, 2013).

Parallel zu den konstitutiv *Fto*-inaktivierten Tieren wurden auch solche mit unvollständiger Inaktivierung des Proteins untersucht (Church, *et al.*, 2009, Gao, *et al.*, 2010, McMurray, *et al.*, 2013). Eine *Missense*-Mutation des *Fto*-Gens führt in Mäusen zu einer reduzierten FTO-Proteinmenge und hat ebenfalls einen schlanken Phänotyp zur Folge. Allerdings sind Tiere mit dieser partiellen Inaktivierung nicht

kleiner als Wildtypen, zeigen keine erhöhte postnatale Sterberate und fressen nicht mehr (Church, *et al.*, 2009). Eine spezifische Inaktivierung des *Fto*-Gens im Nervensystem führte dazu, dass Mäuse ein geringeres Körpergewicht aufwiesen. Nähere Analysen zeigten aber, dass das geringere Gewicht auf eine reduzierte fettfreie Körpermasse zurückzuführen ist und die Fettmasse der Tiere sogar erhöht ist. Allerdings zeigten die Mäuse eine Größenretardation sowie einen erhöhten Energieumsatz und vermehrte Futteraufnahme (Gao, *et al.*, 2010). McMurray und ihre Kollegen untersuchten 2013 zusätzlich zu einer kompletten Inaktivierung von FTO zwei weitere Mauslinien mit konditionellen *Fto*-Inaktivierungen; eine, in der das Gen in adulten Tieren vollständig inaktiviert wurde, und eine zweite, in der das Protein in adulten Tieren im Hypothalamus inaktiviert wurde. Die vollständige Inaktivierung in adulten Tieren führte zu reduziertem Körpergewicht aufgrund reduzierter fettfreier Körpermasse. Die Fettmasse war in diesen Tieren im Alter erhöht. Wachstumsretardation und postnatale Sterberate waren unauffällig und auch der Energieumsatz und die Futtermenge waren mit denen von Wildtypen vergleichbar (McMurray, *et al.*, 2013). Das Hypothalamus-spezifische Ausschalten von *Fto* in adulten Mäusen hatte lediglich einen Effekt auf die Futteraufnahme. Tiere, in denen das *Fto*-Gen inaktiviert wurde, fraßen weniger und zeigten über die Zeit der Messungen eine geringere Gewichtszunahme. Das Gewicht selbst war zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert (McMurray, *et al.*, 2013).

2010 wurde eine Mauslinie untersucht, in der das *Fto*-Gen überexprimiert wurde (Church, *et al.*, 2010). Mäuse, die zusätzliche Kopien des *Fto*-Gens tragen, wiesen ein erhöhtes Körpergewicht und einen erhöhten Körperfettanteil aufgrund von vermehrter Futteraufnahme auf. Diese Gewichtszunahme ist dosisabhängig, d. h. je mehr Kopien des Gens die Tiere trugen desto mehr nahmen sie an Gewicht zu. Der Leptinspiegel im Blut von gefasteten Tieren, die vier Kopien des Gens trugen, war signifikant reduziert im Vergleich zu Tieren, die nur zwei Kopien trugen (Church, *et al.*, 2010).

In vivo-Analysen geben also deutliche Hinweise darauf, dass FTO eine Rolle bei der Nahrungsaufnahme und der Energieumsetzung spielt.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Fettleibigkeit und damit verbundene metabolische Erkrankungen sind ein weltweit wachsendes Problem. Die Notwendigkeit, die Ursachen zu verstehen, um präventive und therapeutische Ansätze zu finden, steigt stetig. Mit dem Fortschreiten der genetischen Forschung wird die Beteiligung genetischer Prädispositionen immer deutlicher.

In genomweiten Assoziationsstudien konnten SNPs in verschiedenen Genen mit Adipositas und dem metabolischen Syndrom in Verbindung gebracht werden. Innerhalb der gefundenen, mit Adipositas assoziierten Gene zeigt *FTO* die stärkste Korrelation (Speliotes, *et al.*, 2010). Die Ergebnisse der GWAS konnten mit Hilfe verschiedener Mausmodelle bestätigt werden. So zeigen *Fto*^{-/-}-Mäuse reduziertes Körpergewicht und verringerte Fettmasse im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern (Fischer, *et al.*, 2009, Gao, *et al.*, 2010, McMurray, *et al.*, 2013).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Beantwortung der Frage, ob *FTO*, auch über den Zusammenhang mit Fettleibigkeit hinaus, in der Entwicklung des metabolischen Syndroms eine Rolle spielt. Für die Analysen wurde ein Funktionsverlust des *Fto*-Gens in dem ausführlich charakterisierten Leptin-defizienten Mausmodell herbeigeführt. Verschiedene Parameter des metabolischen Syndroms wurden in *Lep*^{ob/ob};*Fto*^{-/-}-Mäusen untersucht und die Ergebnisse mit denen von wildtypischen, *Lep*^{ob/ob};*Fto*^{+/+}- und *Lep*^{ob/ob};*Fto*^{+/-}-Mäusen verglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Standardlösungen

In der vorliegenden Arbeit wurden, soweit nicht anders beschrieben, alle Chemikalien von den Firmen Applichem GmbH (Darmstadt, Deutschland), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (NEB) (Schwalbach, Deutschland), Promega (Heidelberg, Deutschland), Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland), Riedel deHaen (Seelze, Deutschland), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. In der Beschreibung der einzelnen Methoden sind detailliert die jeweils benötigten Materialien genannt. Für die folgenden molekularbiologischen Arbeiten wurden die notwendigen Lösungen mit Hilfe von hochreinem Wasser aus einer Millipore-MilliQ-Anlage angesetzt. Soweit erforderlich wurden die verwendeten Lösungen, Gefäße und Verbrauchsmaterialien durch Autoklavieren bei 121 °C, 2 bar für 30 Minuten sterilisiert. Bei den in den folgend beschriebenen Experimenten genutzten Geräten und Verbrauchsmaterialien, die in diesem Kapitel nicht genannt werden, handelt es sich um in einem molekularbiologischen Labor übliche Utensilien.

2.2 Tierarbeiten

2.2.1 **Mauslinien**

Die kombiniert heterozygoten Mäuse ($Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$) für diese Arbeiten entstanden aus der Verpaarung von $Fto^{+/-}$ -Mäusen mit C57BL/6J $Lep^{ob/+}$ -Mäusen, welche freundlicher Weise von Jens Brüning, Institut für Genetik der Universität Köln, zur Verfügung gestellt wurden. Die $Fto^{+/-}$ -Mäuse wurden im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf generiert (Fischer, *et al.*, 2009). Für diese Arbeit wurden zwei $Fto^{+/-}$ -Mauslinien verwendet. Eine mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6J und eine zweite mit einem eingekreuzten NMRI-Hintergrund (C57BL/6J/ NMRI).

2.2.2 Mauszucht und -haltung

Die für diese Arbeit benötigten Mäuse wurden in der Tierversuchsanlage der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten und gezüchtet. Alle Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C bis 24 °C in einem 12 h/12 h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Alle Experimente wurden entsprechend der staatlichen Richtlinien (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW, LANUV) durchgeführt und vom Veterinäramt kontrolliert.

Grundsätzlich erfolgte die Zucht durch Verpaarung eines kombiniert heterozygoten ($Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$) Weibchens mit einem kombiniert heterozygoten ($Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$) Männchen im Alter von ca. 8 Wochen. In Einzelfällen wurde auch eine Verpaarung von kombiniert heterozygoten ($Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$) Weibchen mit einem Männchen des Genotyps $Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$ verwendet.

2.2.3 Gewichts- und Längenmessungen

Nach dem Absetzen der Nachkommen im Alter von 3 Wochen wurde damit begonnen, das Gewicht der Tiere zu dokumentieren. Die Tiere wurden bis zum Alter von 30 Wochen wöchentlich gewogen (Waage: Ohaus Corporation, CS200). Die initialen Daten wurden von Stefanie Kuschel und Dr. Julia Fischer (Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere) erhoben und bereits in der Diplomarbeit (Ikels, 2009) vorgestellt. Im Alter von 30 Wochen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Die Länge der Tiere wurde von Schnauzenspitze bis After (ohne Schwanz) durch Abmessung mittels eines Lineals bestimmt. Die Organe bzw. die Fettdepots wurden einzeln herauspräpariert, gewogen und entweder direkt weiter verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff in Eppendorfgefäßen schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die ersten Daten hierzu wurden bereits während der Anfertigung der Diplomarbeit erhoben und ebenfalls dort vorgestellt (Ikels, 2009).

2.2.4 Blutglukose-Messungen

Die Glukosemenge wurde im Vollblut mit Hilfe eines Standard-Blutzuckermesssystems (GlukoMen-Visio) bestimmt. Hierfür wurde die Schwanzvene der Maus angeritzt und ein Tropfen Blut auf einen Teststreifen aufgetragen. Die quantitative Messung der Blutglukose erfolgt hierbei über eine Glukose-Oxidase-Reaktion. Das Enzym Glukose-Oxidase katalysiert die Sauerstoff-abhängige Oxidation von Glukose. Während dieser Reaktion entsteht Wasserstoffperoxid. Dieses kann durch eine elektrochemische Messung erfasst und darüber die Glukosemenge bestimmt werden.

2.2.4.1 Glukose-Toleranz-Test

Der Glukose-Toleranz-Test (GTT) dient der Analyse der Glukoseverwertung. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass ein gesunder Körper einen erhöhten Blutzuckerspiegel erkennt und durch eine sofortige Insulinantwort senkt. Für den Test wird den Tieren eine definierte, dem Körpergewicht angepasste Glukosemenge appliziert. Der künstlich erhöhte Glukosespiegel im Blut führt zu einer Stimulation der Insulinsekretion durch die Bauchspeicheldrüse und damit zur Speicherung der Glukose in verschiedenen Zellen des Körpers (siehe 1.2). Ein verzögerter Abfall der Blutglukose weist hierbei auf eine gestörte Glukoseverwertung hin.

Zur Kontrolle der Glukoseverwertung der Tiere wurden Glukose-Toleranz-Tests im Alter von 6 und 14 Wochen durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere über 16 Stunden gefastet (Wasser *ad libitum*). Zunächst wurde die Schwanzvene des Testtieres angeritzt und die Blutglukose in gefastetem Zustand (Fastenglukose) gemessen (GlukoMen-Visio, A. Menarini Diagnostics). Im Anschluss wurde eine Glukoselösung intraperitoneal (i.p.) appliziert. Den jüngeren Tieren (im Alter von 6 Wochen) wurden 2 g/kg Glukose injiziert, den Älteren (14 Wochen) 1 g/kg. Die Blutglukose wurde dann zu festgelegten Zeitpunkten (15, 30, 60 und 120 Minuten nach Injektion) gemessen. Die gemessene Glukosemenge im Blut wurde in mg/dl angegeben.

Verwendete Chemikalien und Lösungen:

Glukose	D-(+)-Glukose	Sigma, #G7528-250G
---------	---------------	-----------------------

Glukose-Lösung:	20% Glukose (w/v) in demin. H ₂ O
-----------------	---

2.2.4.2 Insulin-Toleranz-Test

Die Verwendung des Insulin-Toleranz-Tests (ITT) dient der Analyse der Insulinsensitivität und damit der Kontrolle, ob eventuell eine Insulinresistenz vorliegt. Durch Injektion einer definierten Menge menschlichen Insulins (Actrapid, Novo Nordisk) wird der Blutzuckerspiegel künstlich abgesenkt. Die Messung der Blutglukose über einen definierten Zeitraum gibt Aufschluss darüber, wie schnell der Körper auf das applizierte Insulin reagiert, d. h. wie schnell der Blutglukosespiegel absinkt und ebenso wie lange es dauert, bis sich der Glukosespiegel wieder normalisiert.

Im Alter von 7 und 15 Wochen wurde bei den Tieren ein Insulin-Toleranztest (ITT) durchgeführt. Hierbei wurden die Tiere ungestet gemessen, allerdings wurde ihnen das Futter während des Tests entzogen. Nach Bestimmung des Startglukosewertes wurde dem jeweiligen Versuchstier 7,5 µl Insulinlösung/g Körpergewicht (0,75 U/kg) i.p. appliziert und die Blutglukose 15, 30 und 60 Minuten nach der Injektion quantitativ bestimmt (GlukoMen-Visio, A. Menarini Diagnostics). Die gemessene Start-Glukosemenge (vor Insulin-Injektion) wurde hierbei auf 100% gesetzt und die weiteren Glukosewerte (nach Injektion) relativ zur Start-Glukosemenge angegeben.

Verwendete Chemikalien und Lösungen:

Insulin:	Actrapid	Novo Nordisk
----------	----------	--------------

Insulin-Lösung:	0,1% Insulin in demin. H ₂ O
-----------------	--

2.2.5 Messung von Insulin im Blutplasma mittels ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der Insulinkonzentration im Blutplasma wurde ein sog. *Sandwich*-ELISA (engl.: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) verwendet. Hierbei binden 2 Antikörper an zwei unterschiedliche Epitope des Antigens (Insulin). Der erste anti-Insulin-Antikörper ist in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gebunden. An diesen bindet das Antigen (hier Insulin) in der Probe. Der zweite anti-Insulin-Antikörper ist Enzym-gekoppelt. Dieses Enzym setzt ein Substrat, welches ebenfalls hinzugegeben wird, in einen Farbstoff um. Dieser kann photometrisch gemessen werden, wobei die Konzentration proportional zur Konzentration des gebundenen Antigens ist.

2.2.5.1 Gewinnung von Plasma aus Vollblut

Im Alter von 30 Wochen wurde den Tieren Blut zur Bestimmung der Insulinkonzentration im Plasma entnommen. Um die Blutgerinnung zu verhindern, wurde eine Spritze (0,01-1 ml, Braun, Omnifix-F, #3B18048) mit breiter Kanüle (0,5 X 23 mm, Erosa, #1024) mit 250 mM EDTA gespült. Das EDTA bedeckt die Wände der Spritze und ca. 20 µl bleiben oberhalb der Kanüle übrig. Das Blut wurde mit Hilfe der Spritze direkt nach der Tötung aus dem noch schlagenden Herzen der Maus entnommen. Das Blut wurde in Eppendorfgefäße überführt und bei 2000 x g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C weggefroren.

Verwendete Lösungen:

EDTA	250 mM in H ₂ O, pH 8	AppliChem, # A2937.1000
------	----------------------------------	----------------------------

2.2.5.2 Bestimmung der Konzentration von Insulin

In einem vorherigen Testlauf wurde festgestellt, dass die Konzentration an Insulin im Plasma aller drei Leptin-defizienten Tiergruppen oberhalb der maximalen Detektionsgrenze des ELISA lag. Deshalb wurden die Plasmaproben der Leptin-

defizienten Tiere 1:2 in *Sample Diluent* verdünnt und die der wildtypischen Tiere unverdünnt eingesetzt. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Für eine Standardkurve wurden ebenfalls in Duplikaten definierte Konzentrationen (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 µg/ml) von Ratten-Insulin-Standard eingesetzt.

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 95 µl *Sample Diluent* und 5 µl der Probe bzw. der Standardkonzentrationen gegeben. Diese wurden dann für 2 Stunden bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde jede Vertiefung 5 mal mit 300 µl Waschpuffer gründlich gewaschen und 100 µl Enzym-Konjugatlösung hinzugegeben. Diese Lösung enthält Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-Insulin Antikörper, die wiederum an den Komplex aus dem ersten anti-Insulin-Antikörper und dem nachzuweisenden Insulin bindet. Es folgte ein weiterer 30minütiger Inkubationsschritt, eine gründliche Waschprozedur (7 mal mit 300 µl Waschpuffer) und im Anschluss wurden 100 µl Enzym-Substrat (TMB, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Lösung hinzugegeben. Das ebenfalls in der Lösung enthaltene Wasserstoffperoxid wird durch die Peroxidase reduziert. Dabei frei werdende Protonen oxidieren das zunächst farblose TMB und es kommt zu einer Blaufärbung. Nach einer 10minütigen Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe einer schwefelsauren Lösung abgestoppt. Hierdurch kommt es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der Färbung wurde mittels *ELISA-Readers* (Tecan Sunrise) bei einer Wellenlänge 450 und 630 nm gemessen und die Insulin-Konzentration mit Hilfe der Standardkurve bestimmt.

Verwendete Materialien:

Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit

Crystal Chem Inc.,
90060

2.2.6 Semiquantitative Messung von Glukose im Urin

Der Anteil von Glukose im Urin wurde im Alter von 30 Wochen bestimmt. Hierfür wurde ein handelsüblicher Test aus der Humanmedizin verwendet (Combur⁹-Test, Cobas). Dieser beruht auf der Glukoseoxidase-Peroxidase-Reaktion. Die Urinproben wurden von ungestauten Tieren gesammelt und direkt auf die Teststreifen aufgetragen. Nach 60 Sekunden wurden die Farben der Testfelder mit dem

angegebenen Farbblock verglichen. Die Farbe wurden per Augenmaß der ähnlichsten Farbe des Farbblocks zugeordnet und die Kategorie notiert. Der Test erlaubt lediglich eine semiquantitative Aussage der einzelnen Proben, weshalb bei der Bewertung der unterschiedlichen Genotypen der durchschnittliche Schwellenwert (\leq) als Kategorie angegeben und keine statistische Auswertung durchgeführt wurde.

2.2.7 Erhebung metabolischer Daten

Die Daten der körperlichen Aktivität, der Nahrungsaufnahme und der indirekten Kalorimetrie wurden im Alter von 8 und 16 Wochen in sog. Stoffwechsel-Käfigen (*PhenoMaster*, *TSE-Systems*) erhoben. Die Tiere wurden für 72 Stunden in Einzelhaltung adaptiert. Dazu wurden Käfige benutzt, die identisch zu den Messkäfigen waren, ohne mit dem Messsystem verbunden und damit luftdicht abgeschlossen zu sein. Anschließend wurden die Mäuse gewogen und für 72 Stunden in den Messkäfigen, die nach außen luftdicht abgeschlossen waren, gehalten.

2.2.7.1 Messung der körperlichen Aktivität

Während des Zeitraums von 72 Stunden wurde die Aktivität mittels Infrarot-Lichtschraken gemessen. Die Rahmen der Stoffwechselkäfige waren mit jeweils 16 Lichtschraken auf der X-, Y- und der Z-Achse ausgestattet. Auf der einen Seite der Käfige waren die Infrarotsender angebracht und auf der gegenüberliegenden Seite die entsprechenden Empfänger, die eine Unterbrechung des Lichtstrahls registrierten. Der Abstand zwischen den Lichtschraken betrug 15 mm. Es konnte während der Messung zwischen geringen Bewegungen (Feinaktivität, 1 Lichtschranke wurde durchbrochen) und größeren Bewegungen (mindesten 2 Lichtschraken werden unterbrochen) unterschieden werden. Die Unterbrechungen wurden von einer Kontrolleinheit registriert und mit Hilfe eines Computerprogramms automatisch aufgezeichnet (*Process Control MoTil2*, *TSE Systems*). In dieser Arbeit ist die gesamte Aktivität (feine und grobe Aktivität) aller Achsen ausgewertet und in Einheiten pro Stunde (Einheiten/h) dargestellt worden.

2.2.7.2 Messung der Nahrungsaufnahme

Die Nahrungsaufnahme wurde über die gesamte Zeit mit Hilfe von in der Aufhängung der Futter- und Wasserbehälter integrierten Wiegesensoren gemessen. Dafür wurde in regelmäßigen Abständen (alle 27 Minuten) das Gewicht der Futter und Wasserbehälter gewogen. Die Gewichtsabnahme dieser wurde automatisch durch eine Messeinheit (*Process Control Drinking Feeding, TSE Systems*) in die aufgenommene Futtermenge umgerechnet und aufgezeichnet. Zur Auswertung wurden die Rohdaten der Futter- und Wasseraufnahme sowie die Daten bezogen auf die fettfreie Masse der Tiere berechnet und in Diagrammen dargestellt.

2.2.7.3 Indirekte Kalorimetrie

Die Indirekte Kalorimetrie wurde bestimmt, indem die O_2 und CO_2 -Anteile in der Atemluft vor Eingang in den Käfig und nach Ausfluss aus dem Käfig gemessen wurde. Eine eingebaute Kalorimetrie-Einheit (*High Speed Sensor Unit 994620-CS-HSP-01, Process Control CaloSys, TSE Systems*) berechnete die Differenz für O_2 und CO_2 , also O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe, sowie den respiratorischen Quotient (RQ) und den Energieverbrauch. Der respiratorische Quotient ist der Quotient aus CO_2 -Abgabe und O_2 -Aufnahme und gibt Aufschluss über die Art des verstoffwechselten Substrats. In dieser Arbeit wurden die O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe pro Stunde und bezogen auf die fettfreie Masse sowie RQ und Energieverbrauch dargestellt.

2.2.8 Analyse der Körpermassenanteile

Die Messungen der Körperzusammensetzung wurden ebenfalls im Alter von 8 und 16 Wochen direkt im Anschluss an die Messungen in den Stoffwechselkäfigen durchgeführt. Anteile der Fettmasse und der fettfreien Masse wurden mit Hilfe einer NMR (engl.: *Nuclear Magnetic Resonance*)-Analyse (Minispec mq7.5 NMR Analyzer, Bruker) bestimmt. Dieses System beruht auf der Technik der Niedrigfeld-NMR Analyse. Über die Protonen-Relaxationszeit in einem Magnetfeld können die Anteile von Fettmasse (FM) und fettfreie Körpermasse (FFM) der Tiere ermittelt werden

(Software: OPUS 6.5, Bruker Minispec Plus). Die Methode ist nicht-invasiv und kann ohne Anästhesie zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt werden.

2.3 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die Genotypen der Nachkommen aus den Mausverpaarungen zu bestimmen, wurden im Alter von ca. drei Wochen Biopsien der Schwanzspitzen genommen. Aus diesen wurde die DNA isoliert und mittels PCR analysiert.

2.3.1 Isolation und Aufreinigung von DNA

Die Schwanzspitzen-Biopsien wurden in 2 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und anschließend mit 750 µl „Tail“-Puffer und 30 µl Protein-Kinase K (ProtK) über Nacht bei 56 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurden 250 µl gesättigte NaCl (>6 M) hinzugefügt, gut geschüttelt und die Proben für 10 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert (Eppendorf, #5415D). Hierbei setzen sich Haare und Salz ab. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert, 500 µl 2-Propanol zur Fällung der DNA hinzugefügt, geschüttelt und erneut für 10 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Waschen des DNA-Pellets wurden 500 µl 70%-iges Ethanol verwendet. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (13000 x g für 10 min) wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet etwa eine halbe Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden 100 µl demin. Wasser zugegeben und die DNA-Pellets über Nacht bei Raumtemperatur darin gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Die DNA wurde gelöst in demin. Wasser für den PCR-Ansatz eingesetzt.

Verwendete Lösungen:

„Tail“-Puffer:	100 mM NaCl
	50 mM Tris-HCl, pH 8
	100 mM EDTA
	1% SDS (w/v)

SDS:		Serva Electrophoresis GmbH, #20760
HCl:		Prolabo, #20252.290
Tris:		Prolabo, #103156
ProtK:	10 mg/ml	Roche, #1000144
EDTA:		AppliChem, #A2937.1000
NaCl-Lösung, gesättigt:	NaCl >6 M demin. H ₂ O	Prolabo, #27810.295
2-Propanol:		Fuka, #59300
70% Ethanol:	70 ml Ethanol 30 ml demin. H ₂ O	Sigma-Aldrich, #32213

2.3.2 PCR-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *Polymerase Chain Reaction*, Saiki et al. 1988) wurde bereits 1983 von Kary B. Mullis entwickelt und dient der *in vitro* Amplifikation von DNA. Mit dieser Technik kann ein spezifischer DNA-Abschnitt aus einer Ausgangsprobe (*Template*) vervielfältigt werden. DNA-Doppelstränge werden durch kurzes Erhitzen getrennt, so dass sich kurze synthetische DNA-Stücke (*Primer*) anlagern können, welche die zu amplifizierende Sequenz flankieren. Für die Reaktion wird eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *thermus aquaticus* (*Taq*) verwendet. Diese nutzt die einzelsträngige DNA als Matrize zur Synthese von neuen DNA-Polynukleotidketten vom freien 3'OH der *Primer* an. Hierfür verwendet sie das jeweils komplementäre Nukleotid zu dem am Strang vorliegenden. Während die Polymerase am DNA Einzelstrang entlang wandert erfolgt unter Abspaltung von Diphosphaten die Verknüpfung mit weiteren Desoxy-Ribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), den Bausteinen für einen neuen komplementären Strang und somit für die Amplifikation der Zielsequenz. Die entstandenen Sequenzen werden im nächsten Zyklus wieder als Matrize genutzt. Die Reaktion erfolgt in mehreren Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Phasen. Die Denaturierungsphase dient der Trennung der DNA-Doppelstränge durch Erhitzen. In der Hybridisierungsphase wird die Temperatur wieder erniedrigt, sodass sich die *Primer* an die DNA-Einzelstränge anlagern können. In der Elongationsphase wird die

*Primer*sequenz durch Anfügen der dNTPs mit Hilfe der Polymerase verlängert, um die vollständige gewünschte Sequenz zu erhalten.

Für die PCR wurde die *Taq*-Polymerase (hergestellt im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere an der HHU Düsseldorf nach dem Protokoll von (Pluthero, 1993) mit dem dazugehörigen Puffersystem (Roche, #1146265) verwendet. Das Wasser stammte aus der Millipore-MilliQ-Anlage nach Sambrook et al. (1989). Die Reaktionen wurden in dünnwandigen 0,2 ml PCR-Gefäßen angesetzt und in *Thermocyclern* der Marke MWG Biotech (Primus 25) oder Eppendorf (Mastercycler Gradient) durchgeführt.

Für die Genotypisierung der in dieser Arbeit verwendeten Mausgenotypen wurden zwei unabhängige PCRs durchgeführt, eine für die Bestimmung des *Fto*-Genotyps und eine zweite zur Bestimmung des *Lep*-Genotyps. Hierfür wurden jeweils spezifische *Primer* (Tabelle 2.1) und ein an die jeweiligen *Primer*paare angepasstes Protokoll (Tabelle 2.2 und 2.3) benutzt. Bei jeder PCR wurde je eine Positiv- (bekannte DNA einer *Fto*^{+/-}-Maus, bzw. einer *Lep*^{ob/+}-Maus) und eine Negativkontrolle (H₂O anstelle der DNA) angesetzt.

Für die Genotypisierungen wurden folgende *Primer* verwendet:

Tabelle 2.1: Verwendete *Primer*sequenzen (von 5' nach 3')

<i>Fto</i> KO fwd.	CGCCTCTCCCCCATCTAAATCCT	<i>Fto</i> -Genotypisierung
<i>Fto</i> KO rev.	AAGCCAAGAACAAGTCCATACCTG	<i>Fto</i> -Genotypisierung
<i>Neo</i> KO fwd.	CTGTGCTCGACGTTGTCACCTG	<i>Fto</i> -Genotypisierung
<i>Neo</i> KO rev.	GATCCCCTCAGAAGAACTCGT	<i>Fto</i> -Genotypisierung
<i>Ob</i> fwd.	TGTCCAAGATGGACCAGACTC	<i>Lep</i> -Genotypisierung
<i>Ob</i> rev.	ACTGGTCTGAGGCAGGGAGCA	<i>Lep</i> -Genotypisierung

Folgende PCR-Protokolle wurden zur Genotypisierung verwendet:

Tabelle 2.2: Protokoll der *Fto/Neo*-Genotypisierung

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	30 sek	35 
Primerhybridisierung	56 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	5 min	1

Tabelle 2.3: Protokoll der *Lep*-Genotypisierung

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sek	39 
<i>Primerhybridisierung</i>	63 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	7 min	1

Die einzelnen Bestandteile für einen Standard-PCR-Ansatz von einem Volumen von 20 µl wurden wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 2.4: Zusammensetzung pro PCR-Ansatz

ddH₂O	12,5 µl
PCR-Puffer (5 X)	4 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
Primer (Fwd.) (10 µM)	1 µl
Primer (Rev.) (10 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
DNA (≥ 0,1 µg/µl)	1 µl
Σ	20 µl

Verwendete Lösungen:

dNTP-Gemisch:	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP	Roche, #1969064
PCR-Puffer:	5 x <i>Green GoTaq Reaction Buffer</i>	Promega, #M7911
demin. H ₂ O	autoklaviert	

Im Falle der *Fto*-Genotypisierung binden die *Fto-Primer* lediglich an der wildtypischen DNA und die *Neo-Primer* an der mutierten DNA. Der *Fto*-Genotyp wird nach der PCR entsprechend der vorhandenen Banden bestimmt.

Die *Primer* der *Leptin*-Genotypisierung hingegen binden sowohl an das mutante als auch an das wildtypische Gen. Für die Bestimmung des Genotyps muss daher nach der PCR noch ein sog. Restriktionsverdau durchgeführt werden.

2.3.3 DNA-Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) werden aus Bakterien gewonnen. Sie erkennen spezifische Basensequenzen in einem Gen und können DNA-Stränge in Stücke definierter Größe hydrolysieren.

Bei der Bestimmung des *Lep*-Genotyps wurde die Tatsache genutzt, dass die Mutation im Leptin-Gen eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym Ddel (Biolabs, #R0175L) zur Folge hat.

Nach der *Lep*-PCR wurde das Amplifikat über Nacht bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym Ddel verdaut, um Proben mit Schnittstellen sichtbar zu machen. Die amplifizierten und geschnittenen DNA-Fragmente konnten dann anhand ihrer unterschiedlichen Größe (wildtypisches Allel: 150 bp, mutantes Allel: 100 bp) identifiziert werden.

Der Verdau für 10 µl PCR-Produkt wurde wie folgt angesetzt:

Tabelle 2. 5: Ansatz des *Lep*-Restriktionsverdaus für 10 µl PCR-Produkt

Ddel (Biolabs, #R0175L)	1 µl
Puffer (NEBuffer3, Biolabs #B7003S)	2 µl
demin. H₂O	7 µl
PCR-Produkt	10 µl

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurde die Auftrennung nach deren Größe mittels der Agarose-Gelelektrophorese genutzt.

Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen hergestellt. Sie wird durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und geliert beim Abkühlen. Dabei entstehen Poren, deren Größe von der Konzentration der Agarose abhängt. Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladen. Diese Tatsache wird bei der Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Das Gel wird in eine Elektrophoresekammer in TAE-

Puffer überführt und die zu untersuchenden Proben werden in die Taschen des Gels aufgetragen. Der TAE-Puffer dient als Laufpuffer und die Proben werden mit 6x Ladepuffer versetzt, um das Absinken der Proben zu gewährleisten. Durch das Anlegen einer Spannung wird ein elektrisches Feld erzeugt. Die Nukleinsäuren wandern zum positiven Pol und werden durch die Poren des Gels ihrer Größe nach aufgetrennt. Größere Fragmente wandern langsamer als kleinere. Zum Größenabgleich wird ein DNA-Marker aufgetragen. Dieser enthält mehrere DNA-Fragmente definierter Größe, anhand derer die Größe der Proben abgemessen werden kann. Um die Nukleinsäuren in dem Gel sichtbar zu machen, wird das Agarosegel entweder mit Ethidiumbromid (EtBr) oder mit *GelRed* versetzt. Aus Sicherheits- bzw. gesundheitlichen Gründen wurde im Laufe dieser Arbeit das Labor von der Nutzung von Ethidiumbromid auf die Nutzung von *GelRed* umgestellt. Sowohl EtBr als auch *GelRed* interkalieren in Nukleinsäuren und verändern dadurch ihr Anregungsspektrum, sodass die Fluoreszenz bei Anregung durch ultraviolettes (UV) Licht stark erhöht wird. Dadurch können die Proben inklusive der Kontrollen unter UV-Licht (254 nm) detektiert und mit Hilfe einer computerbasierten Video-Dokumentationsanlage fotografiert werden.

Für die Auftrennung der PCR-Produkte der *Fto*-Genotypisierung wurde ein 1%iges Gel mit 0,05 µl/ml EtBr oder *GelRed* verwendet und die elektrophoretische Auftrennung bei Raumtemperatur mit einer Spannung von 120 V über etwa 30 Minuten durchgeführt.

Die Proben der *Lep*-PCR wurden aufgrund der sehr kleinen DNA-Fragmente in einem höher konzentrierten Gel (2%) unter denselben Bedingungen über etwa 45 Minuten aufgetrennt.

Verwendete Lösungen:

Agarose:		PeqLab, #35-120
Ladepuffer:	50% Glycerin	Roth, #3783.1
	2% Orange G (w/v)	Merck, #14277
	in TAE-Puffer	
Ethidiumbromid (EtBr):	1% in H ₂ O (w/v)	Fluka, #46067
<i>GelRed</i> :	<i>Nucleic Acid Stain</i>	
	10.000X in Wasser	Biotium, #41003

TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat	
	2 mM EDTA	
	pH 8.2	
DNA-Marker	1 Kb Plus DNA <i>Ladder</i>	Invitrogen, #10787026

2.4 Histologische Techniken

2.4.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Zur Anfertigung von Paraffinschnitten wurden die frisch isolierten Organe über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe in 4% PFA fixiert. Anschließend wurden sie für jeweils 1,5 Stunden in einer Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 100%) unter leichtem Schwenken entwässert. Danach wurden sie über Nacht in 1-Butanol inkubiert und für je zwei Stunden in 60 °C heißem Paraffin zunächst ohne und dann mit Vakuum, zur Verhinderung von Lufteinschlüssen, inkubiert (Medax, #47511; Vakuubrand, #BVC21). Im Anschluss wurden sie in Paraffin eingebettet und nach der gewünschten Schnittfläche ausgerichtet. Nach der Aushärtung wurden am Mikrotom (Leica RM 2035) 7-12 µm dicke Schnitte hergestellt, direkt zum Strecken in ein 45-50 °C warmes Wasserbad überführt und auf Objektträger (SuperFrost, Roth) gebracht. Zum Trocknen und vollständigen Strecken erfolgte eine Inkubation auf einer Heizbank (30-60 min, 45 °C; OMNILAB Jürgens). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei 4 °C gelagert.

Verwendete Lösungen:

4% PFA:	4% Paraformaldehyd in PBS (w/v)	Merck, #8.18715
70% Ethanol	70% Ethanol in dH ₂ O (v/v)	
80% Ethanol	80% Ethanol in dH ₂ O (v/v)	
90% Ethanol	90% Ethanol in dH ₂ O (v/v)	
100% Ethanol	abs.	Prolabo, #20821.330
1-Butanol		Prolabo, #20810.323

2.4.2 Anfertigung von Gefrierdünnschnitten

Die präparierten Organe wurden direkt für zwei Stunden bei 4 °C auf einer Wippe in 4%igem PFA fixiert und anschließend über Nacht in 30%iger Saccharose-Lösung ebenfalls bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurden die Organe in einem Einbettmedium für Gefrierdünnschnitte (O.C.T.) eingebettet, ausgerichtet und auf Trockeneis durchgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Vor dem Schneiden wurden die Organe im Kryostat (Leica, CM 3050S) bei -20 °C für etwa 20 Minuten vorinkubiert, mit Hilfe von O.C.T. auf einem Träger befestigt und anschließend mit einer Schichtdicke von 12 µm geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Superfrost Plus, Menzel GmbH) aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Verwendete Lösungen:

PBS:	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O		
	16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O		
	150 mM NaCl		
	pH 7.3		
	autoklav. (121 °C, 2 bar, 30 min)		
O.C.T.:	Tissue-Tek O.C.T.		
	Compound	Sakura	Finetechnical, #4583
4% PFA:	4% Paraformaldehyd	Merck, #8.18715	
	in PBS (w/v)		
30% Saccharose:	30% Saccharose	Merck, #107651	
	in PBS (w/v)		

2.4.3 Hämalaun/Eosin-Färbung auf Paraffindünnschnitten

Hämalaun ist ein positiv geladener Farbstoff und färbt effektiv DNA in einem Blauton an. Eosin ist negativ geladen und färbt die übrigen Zellstrukturen in unterschiedlichen Rottönen an. Diese Färbung macht man sich zu Nutze, um die Histologie von Zellen und Geweben deutlicher zu erkennen.

Die Objektträger mit Paraffinschnitten (Leberschnitte und Pankreasschnitte) wurden zunächst zweimal für fünf Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend für drei

Minuten in 100%igem Ethanol inkubiert. Darauf folgte die Inkubation in einer absteigenden Ethanolreihe (90%, 70%, 50%) für je zwei Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte für zwei Minuten in destilliertem H₂O und dann für weitere zwei Minuten in der Hämalaun-Färbelösung inkubiert. Es folgte ein Waschschrift unter fließendem H₂O über 10 Minuten zur Ausdifferenzierung der Färbung. Anschließend wurden die Objektträger kurz in destilliertem H₂O gespült und für 30 Sekunden in der Eosin-Färbelösung inkubiert. Es folgte ein weiterer kurzer Waschschrift in destilliertem H₂O und dann eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) für je eine Minute. Zum Schluss wurden die Schnitte für drei Minuten in Xylol inkubiert und dann mit Entellan unter Deckgläschen (Roth, #878) eingedeckelt. Nach dem Trocknen wurden sie bei 4 °C gelagert.

Verwendete Lösungen:

50% Ethanol	50% Ethanol in dH ₂ O (v/v)	
70% Ethanol	70% Ethanol in dH ₂ O (v/v)	
90% Ethanol	90% Ethanol in dH ₂ O (v/v)	
100% Ethanol demin. H ₂ O	abs.	Prolabo, #20821.330

Eosin-Lösung:	96% Ethanol (v/v)	
	2% Eosin gelb (w/v)	Merck, #1.15935.0100
	1% Essigsäure (v/v)	Fluka, #45731
	ü. N. lösen lassen filtrieren (Faltenfilter)	Machery-Nagel, #531024

Entellan: Merck, #1.07961.0500

Hämalaun-Lösung:	50 ml Mayer's Hämalaun-Lösung	
		Merck, #1.09249.0500
	150 ml dest. H ₂ O	

Xylol: Prolabo, #28975.291

2.4.4 Oil red O-Färbung auf Gefrierdünnschnitten der Leber

Oil red O ist ein fettlöslicher Farbstoff, der zum Anfärben von Triglyzeriden verwendet wird. Lipidtropfen im Gewebe werden rot angefärbt und können so in Form, Größe und Anzahl analysiert werden.

Die Organe wurden direkt nach der Präparation fixiert und am Kryostat (Leica, CM 3050S) wurden Gefrierdünnschnitte angefertigt. Die *Oil red O*-Färbelösung wurde in ein Glasgefäß gegeben und für etwa 10 Minuten stehen gelassen, damit sich restliche Feststoffe absetzen. Die Objektträger (Superfrost Plus, Menzel GmbH) mit den Leberschnitten wurden kurz in demin. H₂O gewaschen und anschließend vorsichtig mit Hilfe eines Objektträger-Schiffchens für 10 Minuten in die Färbelösung gehangen. Dieser Färbeschritt wurde lichtgeschützt durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte erst 20 Sekunden in demin. H₂O und dann 10 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen. Zur Gegenfärbung wurden die Zellkerne eine Minute in Hämalaun angefärbt, die Schnitte nochmals unter fließendem Wasser 10 Minuten gewaschen, in Glycerol-Gelatine eingedeckelt und mit Zaponlack versiegelt. Die Dokumentation am Mikroskop erfolgte innerhalb von wenigen Tagen.

Verwendete Lösungen:

Glycerol-Gelatine:		Sigma-Aldrich, #GG1
Hämalaun:	Mayer's Hämalaun-Lösung, abs.	Merck, #1.09249
<i>Oil red O</i> -Grundlösung:	300 mg <i>Oil red O</i> 100 ml 2-Propanol lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren	Sigma-Aldrich, #09755
<i>Oil red O</i> -Färbelösung:	24 ml <i>Oil red O</i> -Grundlösung 16 ml demin. H ₂ O filtrieren	
Zaponlack:		Roth, #6804.1

2.5 Antikörperfärbung auf Gefrierdünnschnitten

Zur histologischen Analyse von Proteinverteilungen in Geweben sowie zur Detektion definierter Zelltypen wurden die Proteine von Interesse mittels Antikörpern sichtbar gemacht. Antikörper gegen Insulin und Glukagon wurden verwendet, um α - und β -Zellen im Pankreas sichtbar zu machen.

Nachdem die frisch entnommenen Organe in O.C.T. eingebettet und am Kryostat Gefrierdünnschnitte angefertigt wurden (siehe 2.4.2), konnten diese für eine Antikörperfärbung verwendet werden. Zunächst wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Fettstift (ImmEdge Pen) umrandet. Dann wurden sie zweimal für jeweils 15 Minuten auf einer Wippe mit PBT inkubiert. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte wurden in einer Dunkel-Feuchtkammer durchgeführt. Die Schnitte wurden zunächst für mindestens 30 Minuten mit 10%igem fötalem Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS) inkubiert, um unspezifische Bindestellen der Antikörper zu blockieren. Im Anschluss wurden sie über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden Primärantikörper (Tabelle 2.6) verdünnt in 1% FCS inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für 15 Minuten mit PBT gewaschen und anschließend für 2-6 Stunden mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (Tabelle 2.7) bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte nochmals gründlich im Dunkeln mit PBT gewaschen und mit Mowiol, welches 4',6-diamidino-2-phenylindol, Dihydrochlorid (DAPI) enthielt, eingedeckelt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an DNA anlagert und dadurch die Zellkerne sichtbar macht. Das Mowiol härtete über Nacht, ebenfalls im Dunkeln, aus. Nachdem die Immunfluoreszenzbilder am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen wurden, konnten die Schnitte bei 4 °C gelagert werden.

Verwendete Materialien und Lösungen:

DAPI:	DAPI-Reagenz in PBS (0,1 µg/ml)	Merck, #1.24653
FCS:	Fötales Kälberserum 1% und 10% (v/v) in PBS	PAA Laboratories GmbH, #A15-108

ImmEdge Pen:		Vektor Laboratories Inc., #H-4000
Mowiol:	5 g Mowiol 4-88	Polysciences Inc., #17951
	in 20 ml PBS ü. N. unter Rühren lösen 10 ml Glyzerin	Roth, #3783.1
	15 min bei 12000 Upm zentrifugieren	
PBS:	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3 autoklav. (121 °C, 2 bar, 30 min)	
PBS-T:	1% Triton-X-100 (v/v) in PBS	Sigma, #234729

Folgende Erstantikörper wurden für die Immunfluoreszenzanalysen verwendet:

Tabelle 2. 6: Verwendete Primärantikörper

Name	Verdünnung	Wirt	Bezugsquelle	Bestellnummer
Insulin	1:250	Kaninchen	Santa Cruz	sc-9168
Glukagon	1:2000	Meerschweinchen	Millipore	4031-01F

Folgende Zweitantikörper wurden für die Immunfluoreszenzanalysen verwendet:

Tabelle 2. 7: Verwendete Sekundärantikörper

Name	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Cy TM 2-konjugiert Esel anti-Meerschweinchen IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch	706-225-148
Cy TM 3-konjugiert Esel anti-Kaninchen IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch	711-165-152

2.6 Bestimmung der Fettmenge in der Leber

Zur Extraktion der Triglyzeride wurden direkt nach dem Töten der Mäuse neun Proben von etwa 50 mg Gewicht aus dem größten Leberlappen entnommen. Das genaue Gewicht wurde notiert. Die Proben wurden in 15 ml Falcons in jeweils 500 µl H₂O homogenisiert und in Glasröhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml Chlorophorm-Methanol-Lösung und gründlichem Vortexen wurde über Nacht die Phasentrennung abgewartet (4 °C). Am nächsten Tag wurden 0,8 ml 0,9% NaCl hinzugefügt, erneut durch Vortexen gründlich gemischt und bei 2500 Upm für 10 Minuten zentrifugiert. Hierbei entstanden drei Phasen. Die untere Phase wurde in ein weiteres Glasgefäß, welches zuvor gewogen wurde, transferiert. Hierbei wurden jeweils drei Proben derselben Maus in einem Glasfläschchen gesammelt. Dieses wurde anschließend drei Tage unter einem Abzug gelagert, währenddessen die Flüssigkeit verdampfen konnte. Das aus der Leber isolierte Fett blieb im Glas zurück. Nach dem Trocknen wurde das Fläschchen erneut gewogen und die Differenz zum leeren Gefäß bestimmt. Das erhaltene Fettgewicht aus drei Proben wurde in Relation zum Gewicht der verwendeten Leberstückchen gesetzt. Es wurden pro Individuum drei Bestimmungen mit insgesamt 9 Leberproben durchgeführt.

Verwendete Materialien und Lösungen:

Chloroform	abs.	Prolabo, #22711.290
Methanol	abs.	Fisher Chemical, #M/4000/17
Chloroform/Methanol-Lsg.	2:1	
NaCl	0,9% (w/v) in dH ₂ O	
Glasröhrchen		Lenz, Laborglas GmbH & Co.KG, #5700107
Glasfläschchen		Steiner GmbH, Chemie- und Labortechnik, #1201906220

2.7 Fotodokumentation und Statistik

2.7.1 Fotodokumentation

Hämalaun-Eosin- und Oil red O-gefärbte Schnitte wurden mittels eines Durchlichtmikroskops und einer dazugehörigen Kamera (AxioCam MRc, Zeiss) aufgenommen. Antikörperfärbungen wurden mit Hilfe eines epi-Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager A2, Zeiss) und der entsprechenden Kamera (Axio Cam MRm, Zeiss) fotografiert. Die digitalen Aufnahmen wurden im Anschluss mit Hilfe der Software Adobe Photoshop 7.0 und Adobe Illustrator CS4 verarbeitet. Beispielhaft wurden Collagen erstellt.

2.7.2 Ausmessungen der Langerhans'schen Inseln auf Pankreasschnitten

Pro Tier wurden 9 Pankreasschnitte in einem Abstand von durchschnittlich 20 Schnitten ausgewertet. Die Langerhans'schen Inseln wurden mit Hilfe einer Dokumentationssoftware (AxioVision Rel. 4.8, Zeiss) in den digitalen Aufnahmen umrandet und die Fläche ausgemessen. Weiterhin wurden die Inseln ihrer Größe nach in drei Kategorien (I: $100 \mu\text{m}^2 - 10000 \mu\text{m}^2$, II: $10000 \mu\text{m}^2 - 100000 \mu\text{m}^2$, III: $>100000 \mu\text{m}^2$) eingeteilt und die Anzahl der Inseln jeder Kategorie bestimmt. Die Gesamtfläche der Pankreasschnitte wurde am Durchlicht-Binokular (Stemi SV 11, Zeiss) mit einer entsprechenden Kamera (AxioCam MRc, Zeiss) fotografiert und ebenfalls mit einer Dokumentationssoftware (AxioVision Rel. 4.7, Zeiss) ausgemessen. Schließlich wurde die Fläche der gefundenen Inseln bezogen auf die Gesamtschnittfläche für jedes Individuum bestimmt und anschließend der Mittelwert für jeden Genotyp berechnet. Die Daten wurden nach in 2.7.4 dargestellten statistischen Kriterien miteinander verglichen.

2.7.3 Auswertung der Wiegedaten

Die Daten der Messungen von Tiergewichten und -längen, Organgewichten sowie Fettmengen wurden mit Hilfe des Programms Excel, sortiert nach Geschlecht und

Genotypen ausgewertet. Hierbei wurden zunächst Mittelwerte errechnet und diese durch weitere statistische Auswertungen (siehe 2.7.4) miteinander verglichen.

2.7.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden die Standardabweichung (StabW) und der *Standard Error of Mean* (SEM) mit Hilfe des Programms Excel bestimmt und in Graphen dargestellt. Die Werte der einzelnen Genotypen wurden mit Hilfe des Student t-Tests verglichen und die Signifikanzen folgendermaßen festgelegt:

$p \leq 0,05$	→ *	= signifikant
$p \leq 0,01$	→ **	= hochsignifikant
$p \leq 0,001$	→ ***	= höchstsignifikant

Für die Darstellung der statistisch signifikanten Werte verschiedener Genotypen in den Gewichts- und Blutglukosekurven (Abbildung 3.1 a, 3.4 c+d, 3.5 c+d, 8.1 a, 8.5 c,d,g,h) wurde zur Unterscheidung eine andere Markierung gewählt:

Vergleich $Lep^{+/+};Fto^{+/+}$	-	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$	→ *
Vergleich $Lep^{+/+};Fto^{+/+}$	-	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	→ §
Vergleich $Lep^{+/+};Fto^{+/+}$	-	$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$	→ ❖
Vergleich $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$	-	$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$	→ #
Vergleich $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	-	$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$	→ +

Zur statistischen Auswertung der Genotypenverteilung innerhalb der Würfe der C57BL/6J- und der C57BL/6J/NMRI-Verpaarungen wurde der Chi-Quadrat (X^2)-Test angewendet. Die Berechnungen wurden mit dem *Free-Software*-Programm „R“ durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

Adipositas ist eine grundlegende Ursache für die Entstehung des metabolischen Syndroms und damit auch ein wichtiger Ansatzpunkt für vorbeugende und therapeutische Behandlungen. Während *Lep^{ob/ob}*-Mäuse aufgrund einer spontanen Mutation unter Hyperphagie und starker Fettleibigkeit sowie an verschiedenen Symptomen des metabolischen Syndroms leiden (Ingalls, *et al.*, 1950, Westman, 1970, Lindström, 2007), sind *Fto^{-/-}*-Mäuse kleiner und leichter als wildtypische Geschwister. FTO-Defizienz schützt daher Mäuse vor übermäßiger Gewichtszunahme (Fischer, *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der Effekt einer FTO-Inaktivierung auf die Gewichtsentwicklung von Leptin-defizienten Mäusen einen gesundheitlich positiven Effekt hat und auch weitere metabolische Erkrankungen beeinflusst. Dafür wurde der Effekt unterschiedlicher *Fto*-Genotypen in Leptin-defizienten Mäusen analysiert. Die initialen Wiegeanalysen wurden bereits im Jahre 2008 von Frau Stefanie Kuschel und Frau Dr. Julia Fischer im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tier der Heinrich-Heine-Universität erhoben und in der Diplomarbeit „Wirkung von *Fto* auf Leptin-defiziente Mäuse“ (Ikels, 2009) vorgestellt.

3.1 FTO-Defizienz reduziert genetisch bedingte Fettleibigkeit bei Mäusen

Zur ersten phänotypischen Analyse wurden Tiere der Genotypen *Lep^{+/+};Fto^{+/+}*, *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*, *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}* und *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}* ab dem Zeitpunkt des Absetzens, im Alter von drei Wochen, bis zum Alter von 30 Wochen wöchentlich gewogen. In Abbildung 3.1 a sind die Gewichtskurven der vier Genotypen von Woche drei bis Woche 16 dargestellt. *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäuse zeigen ab der dritten Woche und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*-Mäuse ab der fünften Woche ein signifikant erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zu Wildtypen. Im Alter von 16 Wochen erreichen *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Weibchen ein Gewicht von durchschnittlich 53 g und *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Weibchen von durchschnittlich 56 g, während wildtypische Weibchen im Alter von 16 Wochen etwa 24 g Körpergewicht haben. In Woche drei und vier sowie von Woche sechs bis

Woche 12 ist das Gewicht der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Weibchen sogar im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Weibchen signifikant erhöht. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse sind in den ersten Lebenswochen (dritte bis einschließlich sechste Woche) signifikant leichter als wildtypische Geschwister. Ab der 15. Woche sind sie aber signifikant schwerer, mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von ca. 30 g im Alter von 16 Wochen. Im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen weisen $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse ab der dritten Woche ein durchgehend signifikant geringeres Körpergewicht auf. Abbildung 3.1 b zeigt Tiere der vier verschiedenen Genotypen im Alter von 30 Wochen. Beim direkten Vergleich ist neben einem unterschiedlichen Grad an Adipositas auch ein klarer Größenunterschied innerhalb der einzelnen Genotypen zu erkennen. Die $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Maus ist wie auch die $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Maus im Vergleich zum Wildtyp größer und stark adipös. Untereinander unterscheiden sich die beiden Genotypen nicht in Statur und Größe. Die $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Maus hingegen ist kleiner und dicker als der Wildtyp, aber nicht so adipös wie seine Leptin-defizienten Geschwister.

In Abbildung 3.1 c sind die Ergebnisse der Körperlängenmessung im Alter von 30 Wochen dargestellt. Während $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse mit durchschnittlich 10 cm Körperlänge signifikant größer sind als wildtypische (9 cm Körperlänge), weisen $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse mit 8,5 cm eine signifikante Reduktion der Körperlänge zu allen 3 verglichenen Genotypen auf.

Um den Faktor der Längenreduktion beim Vergleich der Gewichtsreduktion mit einzubeziehen, wurden die Gewichte bei 9, 16 und 30 Wochen auf die Länge bezogen. Hierbei wurde die Länge der adulten Tiere im Alter von 30 Wochen verwendet, da bei jüngeren Tieren keine Längenmessungen erhoben wurden (Abbildung 3.1 d). Trotz der drastischen Längenunterschiede sind Leptin-defiziente Mäuse, die wildtypisch oder heterozygot für Fto sind, in allen gemessenen Altersstufen bezogen auf die Körperlänge signifikant schwerer als $Lep^{+/+};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse. Im Vergleich zu $Lep^{+/+};Fto^{+/+}$ - sind $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse im Alter von 9 Wochen noch nicht signifikant schwerer. Im Alter von 16 und 30 Wochen zeigt sich aber eine signifikante Gewichtszunahme, die sich auch bei einer Korrelation mit der Körpergröße widerspiegelt (die Gewichtsdaten im Alter von 30 Wochen sind nicht gezeigt).

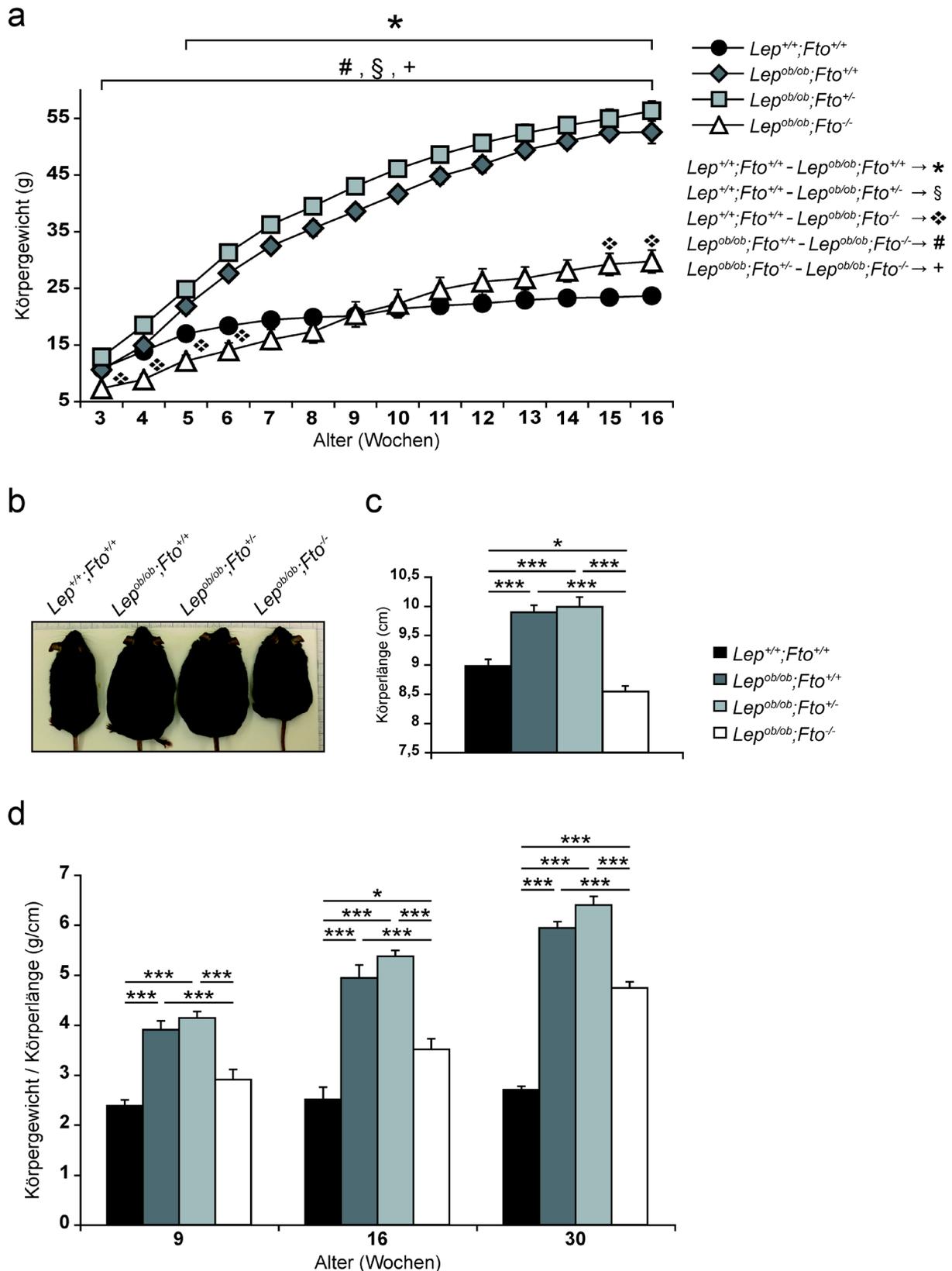


Abb. 3.1: Gewichts- und Größenanalysen weiblicher Leptin-defizienter Mäuse mit verschiedenen *Fto*-Genotypen. a) Gewichtsentwicklung zwischen der 3. und 16. Lebenswoche. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse sind von der 3. bis zur 6. Lebenswoche signifikant leichter als wildtypische Geschwister. Ab der 15. Woche weisen sie ein signifikant höheres Gewicht auf. Sie sind über den gesamten Messzeitraum leichter als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und

Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}-Mäuse. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen wurden mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet: “*” (Wildtyp gg. *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*), “§” (Wildtyp gg. *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*), “❖” (Wildtyp gg. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*), “#” (*Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}* gg. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*), “+” (*Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}* gg. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*). n= Wildtypen: 15-20, *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*: 16-21, *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*: 15-19, *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*: 9-12. b) Abbildungen von Tieren der 4 Genotypen im Alter von 30 Wochen. Die *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Maus ist schlanker und kleiner als *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*- Mäuse allerdings dicker und dennoch kleiner als die wildtypische. c) Körperlänge der Mäusen im Alter von 30 Wochen. n= Wildtypen: 14, *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*: 17, *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*: 18, *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*: 16. *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*- Mäuse sind größer, *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse hingegen sind kleiner als Wildtypen. d) Körpergewicht bezogen auf die Körperlänge im Alter von 9, 16 und 30 Wochen. n= Wildtypen: 9,7,14; *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*: 8,8,17; *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*: 8,8,18; *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*: 6,6,16. Im Alter von 9 Wochen unterscheiden sich *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse nicht von Wildtypen. In der 16. und 30. Woche zeigt sich ein kontinuierlich steigender Unterschied. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse haben ein höheres Körpergewicht bezogen auf die Körperlänge im Vergleich zu wildtypischen Tieren, aber ein geringeres im Vergleich zu *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäusen.

Die parallel erhobenen Daten der männlichen Geschwister zeigen ähnliche Resultate auf. Sie sind im Anhang abgebildet (Abbildung 8.1). Die Standardabweichungen sind aufgrund der teils sehr geringen Tierzahlen (*Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*: n=4-6) sehr viel höher als in den Diagrammen der Weibchen. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Männchen sind in der dritten bis sechsten Lebenswoche signifikant leichter als die wildtypischen Männchen. Bis zur 16. Woche erreichen sie ein Gewicht von etwa 30 g und sind damit nicht schwerer als Wildtypen. Erst die Analysen im Alter von 30 Wochen zeigen ein signifikant höheres Körpergewicht pro Körperlänge im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern. Über den gesamten Zeitraum besteht eine signifikante Gewichtsreduktion gegenüber den *Lep^{ob/ob}*-Männchen, die wildtypisch oder heterozygot für *Fto* sind.

3.2 FTO-Defizienz führt zu reduzierter Fettmasse in Leptin-defizienten Mäusen

Adipositas (krankhaftes Übergewicht) bedeutet eine starke Zunahme an Fettgewebe mit schweren, krankhaften Folgen. In dieser Arbeit wurde die Körperzusammensetzung von Fettmasse (FM) und fettfreier Körpermasse (FFM) in jungen und älteren Mäusen untersucht.

In Abbildung 3.2 a ist die Zusammensetzung der Körpermasse von 8 Wochen alten weiblichen Mäusen dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass Leptin-defiziente Mäuse, die *Fto* exprimieren, bereits zu diesem Zeitpunkt sowohl signifikant mehr

Fettmasse als auch fettfreie Masse besitzen als wildtypische. Tiere mit den Genotypen $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ unterscheiden sich hierbei nicht. Allerdings ist zu sehen, dass eine FTO-Defizienz eine Auswirkung auf die Fettmasse und die fettfreie Masse von Leptin-defizienten Tieren hat. Im Alter von 8 Wochen gibt es noch keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtypen. Die fettfreie Masse korreliert allerdings mit der Größe des Individuums, die im Fall der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse reduziert ist (Abb. 3.1). Um den relativen Anteil der Fettmasse der Tiere vergleichen zu können, ist in Abbildung 3.2 b die Fettmasse bezogen auf die fettfreie Körpermasse dargestellt. Leptin-defiziente Mäuse aller drei *Fto*-Genotypen zeigen im Vergleich zu Wildtypen eine signifikant erhöhte Fettmasse bezogen auf die fettfreie Körpermasse, allerdings weisen $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse eine signifikante Reduktion im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen auf. Analysen im Alter von 16 und 30 Wochen zeigen vergleichbare Ergebnisse. Im Alter von 16 Wochen haben $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse etwa genausoviel Fettmasse wie fettfreie Masse (Abb. 8.2 b). In $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Tieren ist im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Tieren eine klare Reduktion im Anteil der Fettmasse pro fettfreier Masse zu erkennen. Allerdings ist sie ab dem Alter von 16 Wochen im Vergleich zu den Wildtypen bereits signifikant erhöht. Im Alter von 30 Wochen haben $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse sowohl mehr Fettmasse als auch mehr fettfreie Masse als Wildtypen. Dennoch ist der Fettmassenanteil bezogen auf den fettfreien Anteil signifikant geringer als bei $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen (s. Abbildung 8.2). Auch die Untersuchung männlicher Mäuse weist ähnliche Ergebnisse auf wie die der weiblichen. Die Zusammensetzung der Körpermasse ist abhängig von An- oder Abwesenheit von FTO. Ebenfalls ist ein deutlicher Unterschied zwischen jungen und alten Tieren zu erkennen (Abbildung 8.3 a-d).

Zur weiteren Differenzierung der Fettakkumulation wurden die Tiere im Alter von 30 Wochen getötet und die Fettverteilung näher betrachtet. Hierbei wurden unterschiedliche Fettdepots analysiert (Abbildung 3.2 c). Die größten Fettdepots sind das epigonadale (in dem die Gonaden eingebettet sind), das inguinale (Unterhaut-Bauchfett) und das interskapuläre (zwischen den Schultern und am Rücken) Fettgewebe. Auch kleinere Fettdepots, wie das retroperitoneale (an den Nieren liegend) und das mesenterische, das sich zwischen den Darmschlingen befindet, wurden untersucht.

Leptin-defiziente, weibliche Mäuse zeigen im Alter von 30 Wochen eine massive, signifikante Fettzunahme in allen fünf analysierten Geweben im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. Es fällt auf, dass die stärkste Zunahme (400-500%) im inguinalen und interskapulären Gewebe zu verzeichnen ist. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse zeigen keine Unterschiede untereinander. FTO-Defizienz in Leptin-defizienten Tieren führt allerdings zu drastischen Veränderungen. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben signifikant mehr epigonadales Fettgewebe als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse, zeigen aber signifikante Reduktionen in der Masse des inguinalen, interskapulären und retroperitonealen Fettdepots. Die Menge des mesenterischen Fettgewebes ist unverändert im Vergleich zu der von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen. Männliche Mäuse zeigen in der Menge des epigonadalen Fettgewebes keine Leptin- und FTO-abhängigen Unterschiede. Allerdings zeigen auch männliche Leptin-defiziente Mäuse eine enorme Zunahme der restlichen analysierten Fettdepots im Vergleich zu Wildtypen. Eine FTO-Defizienz in $Lep^{ob/ob}$ -Mäusen führt wiederum zu einer signifikanten Reduktion des inguinalen, interskapulären und retroperitonealen Fettgewebes (Abbildung 8.3 e).

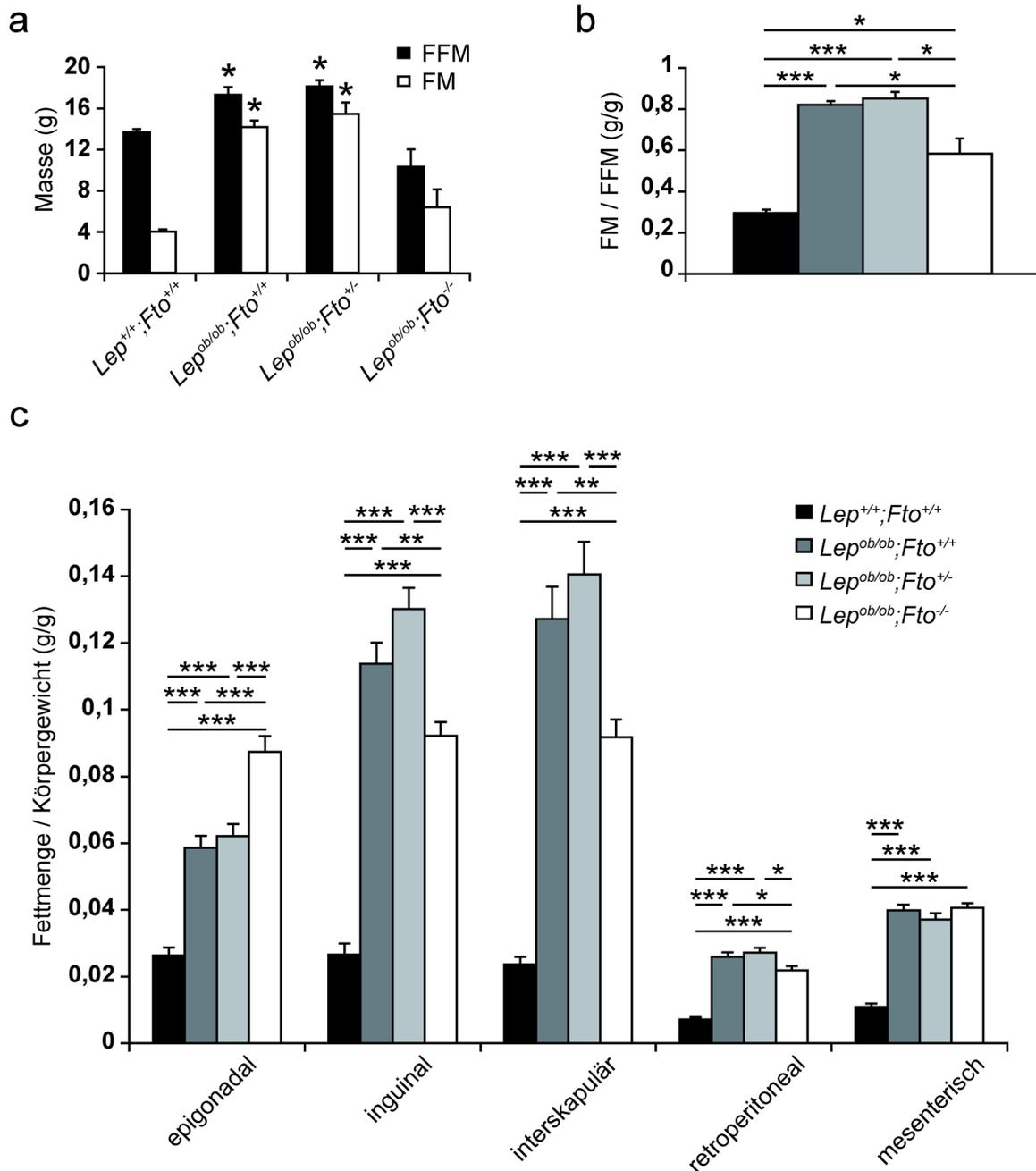


Abb. 3.2: Untersuchungen der Körpermassenzusammensetzung weiblicher Mäuse. a) Anteile von Fettmasse (FM) und fettfreier Masse (FFM) in wildtypischen ($n=7$), $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ ($n=8$), $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ ($n=4$) und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen ($n=4$) im Alter von 8 Wochen. Die Sterne geben signifikante Unterschiede zur jeweiligen Masse der Wildtypen an. b) Fettmasse bezogen auf die fettfreie Masse, berechnet aus den in a) dargestellten Rohwerten. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben bezogen auf die fettfreie Masse einen deutlich erhöhten Fettmassenanteil im Vergleich zu Wildtypen. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben anteilig ebenfalls mehr Fettmasse, aber weniger als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse. c) Anteil der epigonadalen (an den Gonaden liegend), inguinalen (unter der Bauchdecke liegend), interskapulären (Rücken- und Schulterbereich), retroperitonealen (an den Nieren liegend) und mesenterischen (zwischen den Darmschlingen liegend) Fettdepots am Gesamtkörpergewicht der Mäuse. n = Wildtypen: 14, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 17, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 18, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 16. Leptin-defiziente weibliche Mäuse zeigen einen Anstieg der Masse in allen analysierten Fettdepots. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben sogar mehr epigonadales Fett als

$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse, allerdings zeigen sie eine Reduktion im Anteil des inguinalen, interskapulären und retroperitonealen Fettgewebes.

3.3 FTO-Defizienz führt zu reduzierter Fetteinlagerung in der Leber von Leptin-defizienten Mäusen

Zusätzlich zur starken Vergrößerung der Fettgewebe tritt bei Übergewicht eine verstärkte ektopische Akkumulation von Triglyzeriden in diversen Organen auf. Ein Beispiel hierfür ist die sogenannte Fettleber.

In Abbildung 3.3 ist sowohl das Gewicht der Leber im Vergleich zur Körpergröße (Abbildung 3.3. a) als auch der Fettanteil in der Leber (Abbildung 3.3. b und c) von 30 Wochen alten, weiblichen Mäusen dargestellt. In $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Tieren ist im Vergleich zu wildtypischen eine starke Gewichtszunahme der Leber zu verzeichnen. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse weisen zwar auch eine schwerere Leber im Vergleich zu wildtypischen Tieren auf, allerdings ist im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen eine deutliche Gewichtsreduktion der Organe zu beobachten (Abbildung 3.3 a). Diese Beobachtung konnte auch in männlichen Tieren desselben Alters gezeigt werden (Abbildung 8.4 a).

Histologische Untersuchungen zeigen, dass die Leber von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Tieren starke Fetteinlagerungen aufweisen. Eine Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung auf Paraffinschnitten der Leber macht deutlich, dass die Organe keine homogene Struktur aufweisen, sondern geradezu „durchlöchert“ sind. Durch eine Färbung mit *Oil red O*, das Triglyzeride auf Gefrierschnitten anfärbt, können Fetteinlagerung in diesen Vakuolen nachgewiesen werden. Die Fettvakuolen in den Lebern der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ - und der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Maus sind im Vergleich zum wildtypischen Organ um ein Vielfaches vergrößert. Die der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Maus zeigen hingegen nicht solche extrem großen Löcher und auch der Grad der Verfettung ist längst nicht so stark (Abbildung 3.3 c).

Die Isolierung und Mengenbestimmung der Triglyzeride aus der Leber bestätigt diese Beobachtungen sowohl für weibliche als auch für männliche Tiere (Abbildung 3.3 b und Abbildung 8.4 b). Leptin-defiziente Mäuse haben, bezogen auf das Lebergewicht, signifikant mehr Fett in der Leber als Wildtypen. Allerdings ist die Fettmenge in Lebern von $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen nicht signifikant höher als die der

Wildtypen ($p=0,096$), wohl aber signifikant geringer als in Lebern von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäusen. Weibliche $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse zeigen im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäusen mit einem p-Wert von 0,051 eine deutliche Tendenz zu reduzierter Fetteinlagerung. In den männlichen Tieren ist die Reduktion hochsignifikant (Abbildung 8.4 b). Zwischen $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen ergeben diese Analysen keine signifikanten Unterschiede ($p=0,419$).

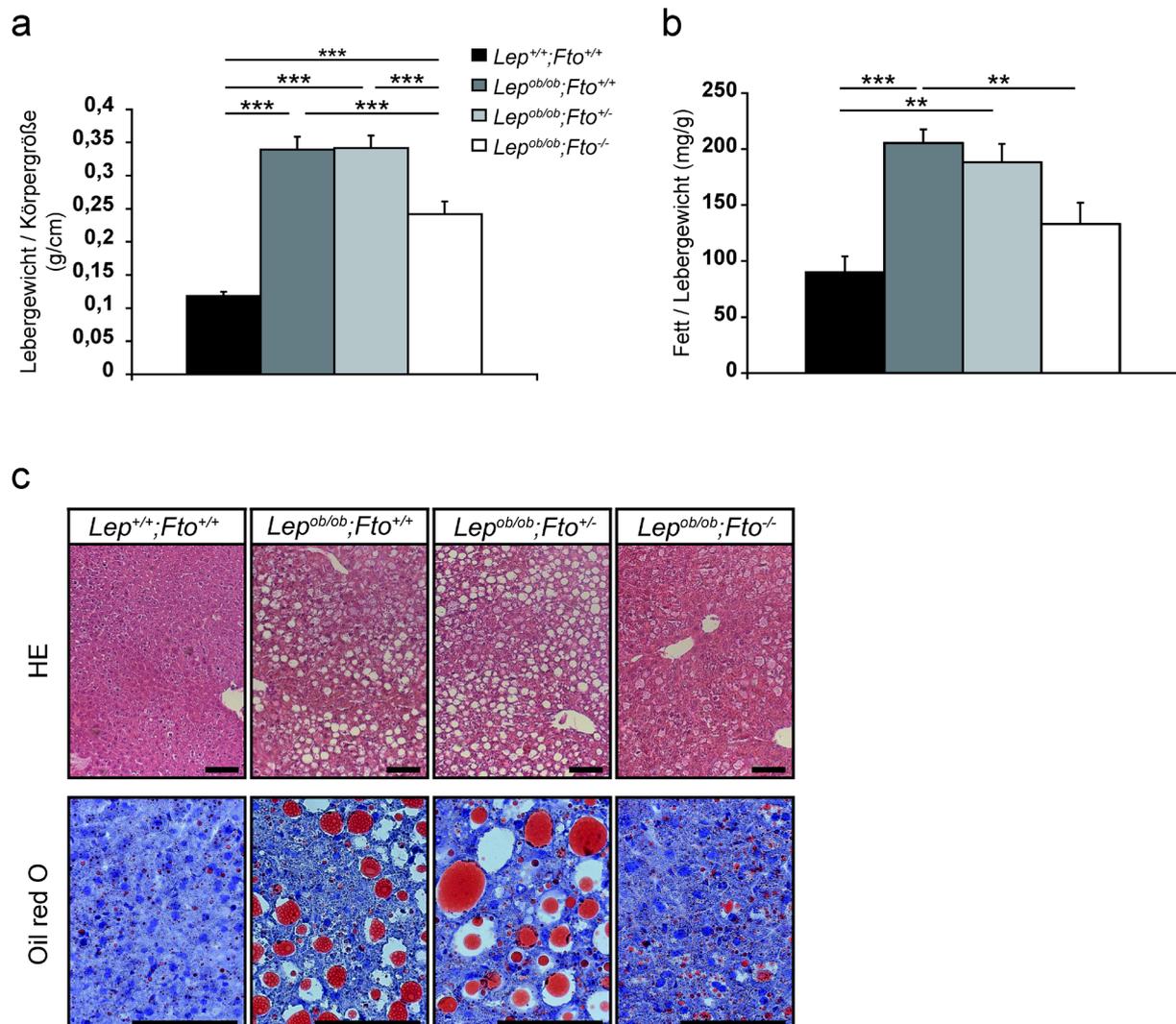


Abb. 3.3: Analysen der Lebern weiblicher Mäuse im Alter von 30 Wochen. a) Lebergewicht bezogen auf die Körpergröße. Leptin-defiziente Mäuse weisen ein stark erhöhtes Lebergewicht bezogen auf ihre Körpergröße im Vergleich zu wildtypischen Mäusen auf. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen ein geringeres Lebergewicht pro Körpergröße. $n=$ Wildtypen: 13, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 14, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 16, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 15. b) Aus der Leber isolierte Triglyzeride pro Gramm Leber. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse haben etwa den doppelten Fettgehalt in der Leber als Wildtypen. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse hingegen haben nicht signifikant mehr Fett in der Leber. $n=6$ für jeden Genotyp. c) Leberhistologie der 4 Genotypen im Vergleich. HE-Färbungen von Leber-Paraffinschnitten (obere Reihe) zeigt deutliche Veränderungen in den Organen von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen. Anstatt einer homogenen Fläche weisen die

Schnitte kreisrunde Löcher auf. Diese sind im Organ der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Maus in weitaus geringerer Anzahl zu erkennen. Vergrößerung: 40X. *Oil red O*-Färbungen auf Kryoleberschnitten zeigen extreme Lipideinlagerungen in den Organen der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse. Die Leber der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Maus weist im Vergleich zur Leber einer wildtypischen Maus nur eine leicht erhöhte Lipideinlagerung auf. Vergrößerung: 63X. b+c) Die Maßstabsbalken betragen 100 μ m.

3.4 Analysen des Glukosestoffwechsels

Die Fettleibigkeit von Leptin-defizienten Mäusen ist auf eine stark erhöhte Nahrungsaufnahme (Hyperphagie) zurückzuführen. Diese führt zu einem permanent erhöhten Blutglukosespiegel (Hyperglykämie), der wiederum eine Verschlechterung der Glukose- und Insulintoleranz zur Folge hat.

3.4.1 $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse entwickeln keine Hyperglykämie und haben eine verbesserte Glukosetoleranz

Messungen der Blutglukosewerte in gefastetem und nicht gefastetem Zustand von jungen (6-7 Wochen, Abbildung 3.4 a und b) und älteren (14-15 Wochen, Abbildung 3.5 a und b) Leptin-defizienten Mäusen zeigen eine altersabhängige Erhöhung der Glukosewerte. Während im Alter von sechs Wochen noch kein signifikanter Unterschied zwischen den Glukosespiegeln von wildtypischen und Leptin-defizienten ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -) gefasteten Mäusen zu verzeichnen ist (Abbildung 3.4 a), sieht man im Alter von 14 Wochen bereits eine deutliche Erhöhung der Glukosewerte im Blut von gefasteten $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen (Abbildung 3.5 a). Blutproben von ungefasteten $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Tieren zeigen bereits im Alter von sieben Wochen und auch im Alter von 15 Wochen eine deutliche Hyperglykämie (50-100% erhöhte Blutglukosewerte) im Vergleich zu wildtypischen Proben (Abbildungen 3.4 b und 3.5 b).

$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse hingegen zeigen im Alter von sechs bis sieben Wochen einen signifikant geringeren Glukosespiegel (sowohl in gefastetem als auch in nicht gefastetem Blut) im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen. Die Glukosespiegel liegen jeweils im Bereich der wildtypischen Werte (Abbildung 3.4 a und b). Ältere $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben in gefastetem Zustand einen signifikant

höheren Blutzuckerspiegel als die Wildtypen. Dieser ist etwa vergleichbar mit dem von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Tieren. Auffällig sind in diesem Fall allerdings Leptin-defiziente Mäuse, die heterozygot für Fto sind ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$). Deren Werte sind signifikant höher als die von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Tieren (Abbildung 3.5 a). Der Glukosespiegel in nicht gefastetem Blut unterscheidet sich nicht zwischen $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Tieren und ist signifikant höher als der wildtypischer Tiere. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse zeigen wieder einen Wildtyp-ähnlichen Zustand. Die Werte sind im Vergleich zu denen von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen signifikant reduziert (Abbildung 3.5 b).

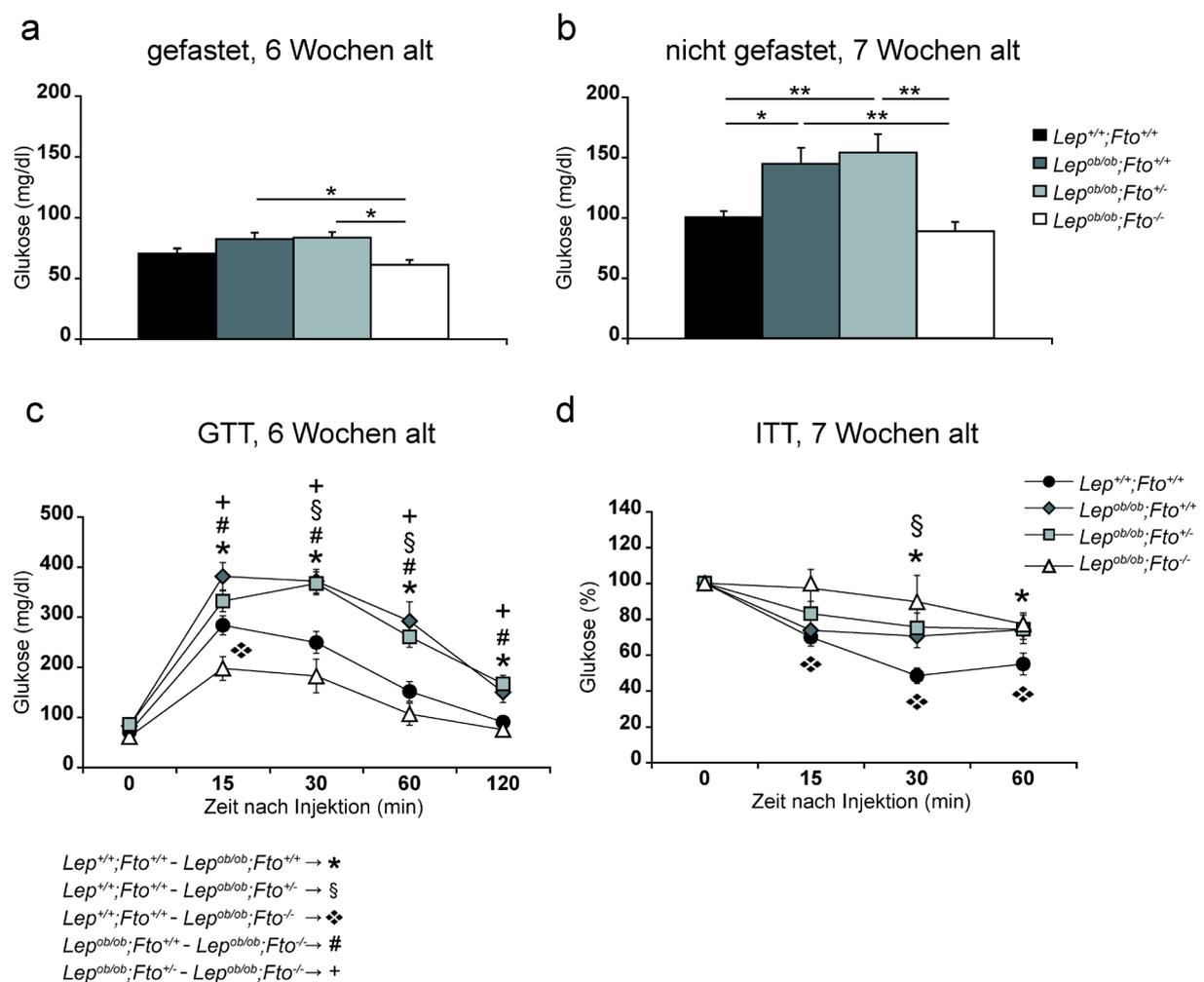


Abb. 3.4: Analysen des Glukosestoffwechsels in 6 und 7 Wochen alten weiblichen Mäusen. a) Blutglukosewerte nach 16stündigem Fasten. Die Werte von $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen sind signifikant niedriger als die von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen. b) Blutglukosewerte von ungefasteten Tieren. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse haben erhöhte Blutglukosewerte im Vergleich zu wildtypischen. Die Werte von $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen sind vergleichbar mit den wildtypischen. c) GTT nach 16stündigem Fasten. Während $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse einen stärkeren Anstieg der Glukose aufweisen und nach 2 Stunden den Startwert noch nicht wieder erreicht haben, weisen

Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen nach 15 Minuten einen geringeren Anstieg auf und zeigen im weiteren Verlauf eine Wildtyp-ähnlichen Glukosereaktion. d) ITT von ungestauten Tieren. Die Werte sind prozentual in Bezug auf den Startwert ($\triangleq 100\%$) berechnet. Im Vergleich zu wildtypischen Tieren reagieren Leptin-defiziente Mäuse unabhängig vom *Fto*-Genotyp kaum auf die Insulininjektion. a+c) n= Wildtypen: 13, *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*: 10, *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*: 12, *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*: 8. b+d) n= Wildtypen: 12, *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*: 9, *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*: 12, *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*: 9. Die statistisch signifikanten Unterschiede in GTTs und ITTs zwischen den einzelnen Genotypen wurden mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet: “*” (Wildtyp gg. *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*), “§” (Wildtyp gg. *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*), “❖” (Wildtyp gg. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*), “#” (*Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}* gg. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*), “+” (*Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}* gg. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*).

Glukosetoleranztests (GTT) und Insulintoleranztests (ITT) sind Methoden, um die Sensitivität der Tiere auf Glukose und Insulin zu untersuchen. *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Tiere weisen nach Glukose-Injektion zu jedem Messzeitpunkt signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Wildtypen auf (*, §). Leptin-defiziente Mäuse mit wildtypischem oder heterozygotem *Fto* zeigen im GTT (6 und 14 Wochen) einen stärkeren Anstieg der Glukose im Blut nach einer Glukose-Injektion als wildtypische Tiere (Abbildungen 3.4 c und 3.5 c). Zudem weisen sie einen verspäteten und verlangsamten Abfall des Blutglukosespiegels auf. 30 Minuten nach der Injektion entsteht eine Art Plateau bzw. der Glukosespiegel steigt zu diesem Zeitpunkt noch weiter an (siehe GTT bei 14 Wochen für *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäuse). Im Gegensatz dazu ist sowohl bei wildtypischen als auch bei *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäusen deutlich zu erkennen, dass der maximale Blutglukosewert bei 15 Minuten nach Injektion erreicht ist und danach stetig wieder absinkt (Abbildungen 3.4 c und 3.5 c). Messungen der *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse zeigen, dass der Anstieg der Glukose im Alter von sechs Wochen 15 Minuten nach der Glukose-Injektion sogar geringer ist als der von wildtypischen Tieren (❖, Abbildung 3.4 c). Im Alter von sechs Wochen sind die Werte der *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse nach der Glukoseinjektion im Vergleich zu Werten der *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäuse signifikant (+, #) verringert (Abbildung 3.4 c). 14 Wochen alte *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse zeigen signifikante Unterschiede zu *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäusen in allen Messwerten (+). Im Vergleich zu *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*-Mäusen sind die Glukosewerte zu den Zeitpunkten 15, 30 und 60 Minuten nach der Injektion signifikant reduziert (#), gleichen sich aber zwei Stunden nach der Injektion diesen wieder an (Abbildung. 3.5 c).

Der ITT bei jungen Mäusen im Alter von sieben Wochen zeigt nach 30 Minuten eine Reduktion der Glukosewerte wildtypischer Mäuse auf etwa 50% des Startwertes.

Leptin-defiziente Mäuse im selben Alter hingegen reagieren unabhängig vom *Fto*-Genotyp deutlich schlechter auf die Insulininjektion. Sie weisen lediglich eine Senkung der Glukosemenge auf ca. 80% des Startwertes auf. Die Werte der *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse sind zu jedem Zeitpunkt signifikant höher als die der Wildtypen (\diamond). *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäuse reagieren zunächst (15 min nach Injektion) in gleichem Maße wie die Wildtypen. Erst die späteren Messungen (30 und 60 min nach Injektion) machen einen Unterschied deutlich (Abbildung 3.4 d).

Im Alter von 15 Wochen hat sich die Insulinsensitivität nochmals drastisch verschlechtert. Im Gegensatz zu wildtypischen Mäusen reagieren Leptin-defiziente Mäuse aller *Fto*-Genotypen gar nicht auf Insulin (Abbildung 3.5 d).

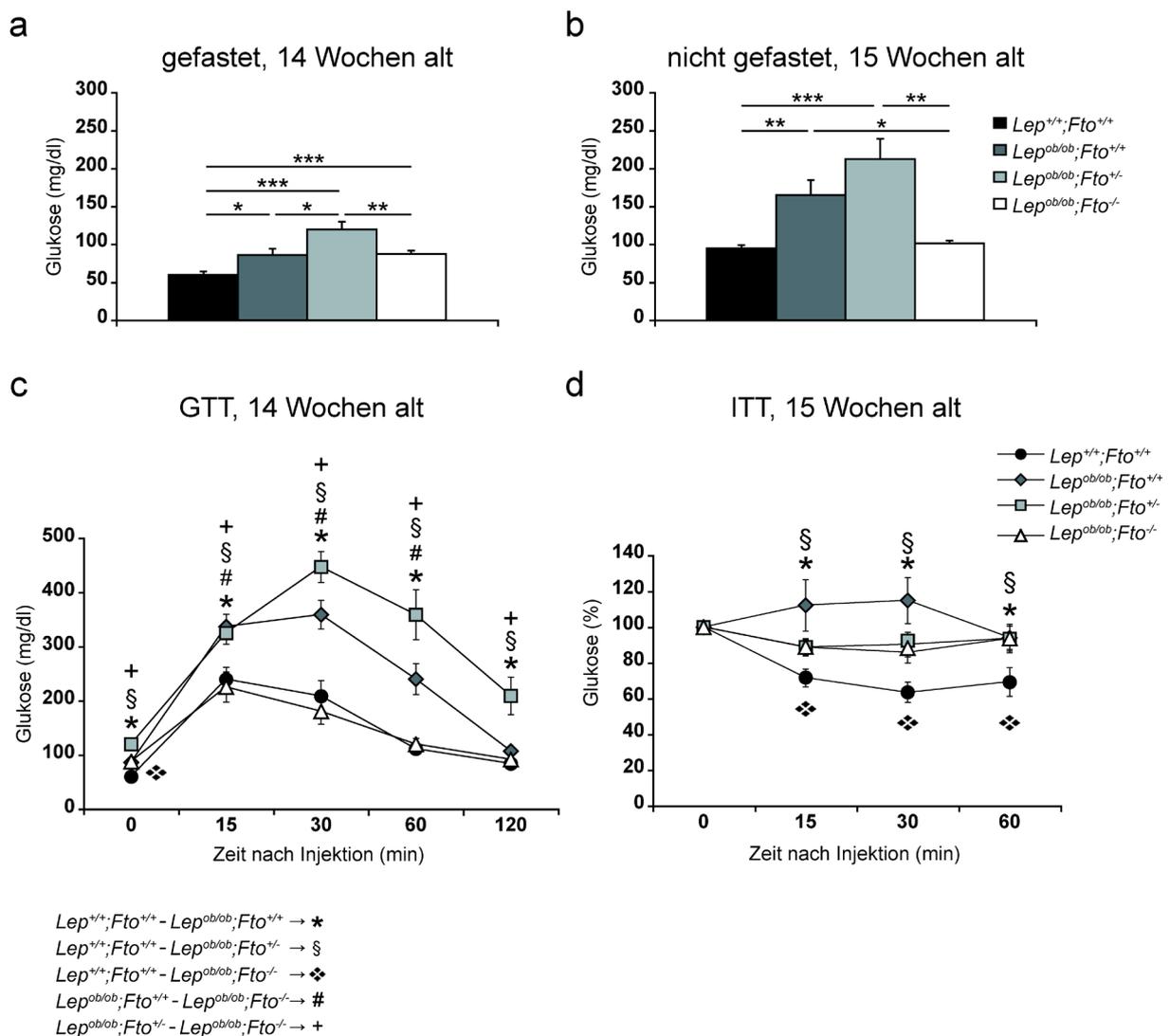


Abb. 3.5: Analysen des Glukosestoffwechsels in 14 und 15 Wochen alten weiblichen Mäusen. a) Blutglukosewerte nach 16stündigem Fasten. Die Werte aller Leptin-defizienten

Mäuse sind im Vergleich zu denen von wildtypischen Mäusen erhöht. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse haben zusätzlich signifikant höhere Blutglukosewerte als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse. b) Blutglukosewerte von ungestauten Tieren. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse haben erhöhte Blutglukosewerte im Vergleich zu wildtypischen. Die Werte von $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen sind vergleichbar mit den wildtypischen. c) GTT nach 16 stündigem Fasten. Während $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse einen deutlich stärkeren Anstieg der Glukose aufweisen, zeigen $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse eine mit der der Wildtypen fast identische Kurve. d) ITT von ungestauten Tieren. Die Werte sind prozentual in Bezug auf den Startwert ($\pm 100\%$) berechnet. Im Vergleich zu wildtypischen Tieren reagieren Leptindefiziente Mäuse unabhängig vom *Fto*-Genotyp nicht mit Glukosesenkung auf die Insulininjektion. a+c) n= Wildtypen: 13, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 10, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 12, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 8. b+d) n= Wildtypen: 12, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 9, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 12, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 9. Die statistisch signifikanten Unterschiede in GTTs und ITTs zwischen den einzelnen Genotypen wurden mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet: "*" (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$), "§" (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$), "❖" (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$), "#" ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$), "+" ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$).

Analysen von männlichen Mäusen derselben Altersstufen ergeben ähnliche Ergebnisse (Abbildung 8.5). In nicht gestautem Zustand liegen die Glukosewerte der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse auf demselben Niveau wie die der Wildtypen. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Tiere weisen signifikant erhöhte Werte auf (Abbildung 8.5 b und f). Auffällig ist zudem, dass $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Tiere, wie schon bei den Weibchen festgestellt werden konnte, im Alter von 14 Wochen signifikant höhere Fasten-Glukosewerte aufweisen als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Tiere (Abbildung 8.5 e). GTTs zeigen, dass die Abwesenheit von FTO auch einen positiven Effekt auf die Glukosetoleranz der Leptin-defizienten männlichen Mäuse hat (Abbildung 8.5 c, g). $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Tiere reagieren bereits im Alter von 6 Wochen mit einer verzögerten Glukosesenkung im Vergleich zu Wildtypen (Abbildung 8.5 c). Dies wird im Alter von 14 Wochen noch deutlicher (Abbildung 8.5 g). Die Glukosewerte der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse weisen im Alter von 6 Wochen hohe Abweichungen auf (Abbildung 8.5 c). Aber im Alter von 14 Wochen zeigen sie eine Reaktion, die vergleichbar mit der von Wildtypen und damit signifikant besser als bei $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Tieren ist (Abbildung 8.5 g).

Die Reaktion im ITT unterscheidet sich, wie bei den Weibchen, nicht innerhalb der drei Leptin-defizienten Gruppen (Abbildung 8.5 d). Im Alter von 14 Wochen reagieren sie im Gegensatz zu wildtypischen Tieren nicht mehr auf die Stimulation mit Insulin (Abbildung 8.5 h).

3.4.2 FTO-Defizienz verhindert Hyperplasie der Langerhans'schen Inseln in Leptin-defizienten Mäusen

Leptin-defiziente Mäuse weisen starke Abnormitäten der Langerhans'schen Inseln im Pankreas auf (Bleich, *et al.*, 1952, Gepts, *et al.*, 1960). Diese sind aber nicht primär auf die Leptin-Defizienz zurückzuführen, sondern beruhen auf einem verstärkten Bedarf an Insulin. Hyperglykämie führt im frühen Stadium der Insulinresistenz zu einer Hyperinsulinämie, einer permanenten exzessiven Insulinproduktion durch die β -Zellen im Pankreas. Durch diese können zunächst normale Blutglukosespiegel aufrechterhalten werden. Eine Kompensation der Insulinresistenz bedarf einer stetig steigenden Insulinproduktion sowie einer stark erhöhten akuten Glukose-stimulierten Insulinsekretion. Dies erfolgt durch ein extremes Wachstum der β -Zellmasse (Hyperplasie) (Weir und Bonner-Weir, 2004, Bouwens und Rooman, 2005).

Leptin-defiziente Mäuse weisen im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern einen stark erhöhten Glukosespiegel auf (Abbildung 3.4 und 3.5). Zur histologischen Analyse der Langerhans'schen Inseln im Pankreas wurden HE-Färbungen auf Paraffinschnitten (Abbildung 3.6 a) und Antikörperfärbungen auf Gefrierdünnchnitten (Abbildung 3.6 b) durchgeführt. β -Zellen wurden mit einem Antikörper gegen Insulin markiert, α -Zellen mit einem Antikörper gegen Glukagon (Abbildung 3.6 b). Bereits 2009 konnte gezeigt werden, dass die β -Zellmasse der untersuchten Leptin-defizienten Tiere stark vergrößert ist. Zu dem Zeitpunkt war ebenfalls schon deutlich zu erkennen, dass eine FTO-Defizienz dieser Hyperplasie der Langerhans'schen Inseln entgegenwirkt (Ikels, 2009). Die Untersuchung weiterer Tiere im Alter von 30 Wochen kann dieses Ergebnis bestätigen. Sowohl HE-Färbungen als auch Antikörperfärbungen gegen Insulin und Glukagon zeigen enorme Langerhans'sche Inseln in $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen. Die Inseln der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Tiere ähneln denen der Wildtypen (Abbildung 3.6 a und b).

Zur genaueren Analyse wurden die Inseln auf den Insulin-gefärbten Schnitten ausgemessen und die Gesamtfläche der Inseln bezogen auf die gesamte Schnittfläche berechnet. Die Auswertungen der durchschnittlichen Inselnfläche pro Schnittfläche ergeben, dass sowohl die Inseln der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - als auch die der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse im Durchschnitt um ein Vielfaches (400-700%) größer sind als die der Wildtypen (Abbildung 3.6 c). Auch die Inselnfläche im Pankreas der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse ist signifikant vergrößert, allerdings nur um etwa das Zwei- bis

Dreifache. Die Messungen zeigen eine deutliche Reduktion der Inselfläche in Pankreaten von Leptin-defizienten Mäusen, wenn kein FTO vorhanden ist. Der Größenunterschied zwischen Inseln von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen ist signifikant. Allerdings weisen die Messwerte der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse eine sehr hohe Standardabweichung auf, so dass die Unterschiede nicht statistisch signifikant sind. Die Größenauftrennung (Abbildung 3.6. d) der Inseln zeigt deutlich, dass Pankreaten von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen signifikant mehr große Inseln (von 10000 bis 100000 μm^2 Größe) haben als die der wildtypischen Mäuse. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Pankreaten hingegen haben im Vergleich zu wildtypischen ebenfalls signifikant mehr Inseln dieser Größe, aber signifikant weniger im Vergleich zu denen der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäuse. Die Anzahl der Inseln mit der Größe von 100 bis 10000 μm^2 unterscheidet sich nicht zwischen wildtypischen und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - bzw. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Pankreaten. Allerdings weisen Pankreaten von $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen signifikant mehr kleinere Inseln auf als die wildtypischer Geschwister. Gigantische Inseln mit einer Größe von mehr als 100000 μm^2 sind lediglich in Pankreaten von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen zu finden. Weder Wildtypen noch $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ - Mäuse weisen Inseln solcher Größe in ihrem Pankreas auf.

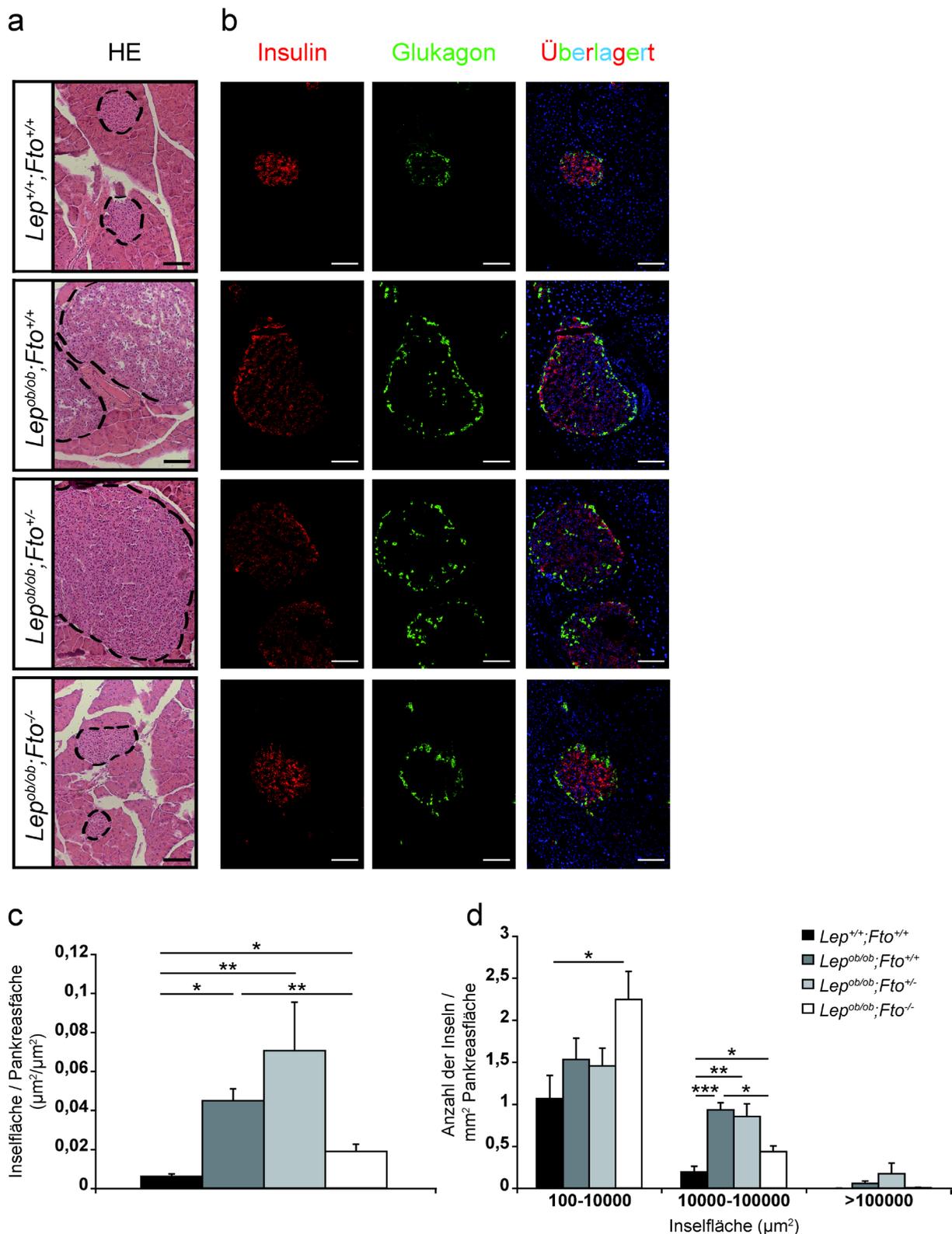


Abb. 3.6: Untersuchungen der Langerhans'schen Inseln von weiblichen Mäusen im Alter von 30 Wochen. a) Histologische Betrachtung von HE-gefärbten Pankreasschnitten. Die Langerhans'schen Inseln von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen weisen starke Hyperplasie auf. Die Inseln der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse sind nicht erkennbar größer als die der Wildtypen. b) Antikörperfärbung gegen Insulin (rot) und Glukagon (grün) auf Kryoschnitten der Pankreata. Die Zellkerne sind mit Hilfe von DAPI (blau) sichtbar gemacht. Es ist deutlich zu erkennen, dass die β -Zellfläche in Pankreata von Leptin-defizienten Mäusen im

Vergleich zu wildtypischen stark vergrößert ist. In $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen sind die Flächen allerdings weniger vergrößert als in $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen. a+b) Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm c) Auswertung der Inselfläche bezogen auf die gesamte analysierte Pankreasfläche. Die Inselfläche der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse ist im Vergleich zu denen der Wildtypen stark vergrößert. Die Inselfläche der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse ist leicht vergrößert und signifikant kleiner als die der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäuse. d) Einteilung der Inseln nach ihrer Größe in 3 Kategorien. Angegeben ist jeweils die Anzahl der Inseln einer Kategorie. In Kategorie 1 (100-10000 μm^2) weisen lediglich $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse eine erhöhte Inselanzahl auf. In Kategorie 2 (10000-100000 μm^2) sind Inseln der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse in erhöhter Menge vertreten. Auch $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse weisen mehr Inseln dieser Größe auf als Wildtypen, allerdings weniger als Leptin-defiziente Mäuse mit FTO. Inseln der Kategorie 3 (>100000 μm^2) sind nur in Pankreaten von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen zu finden. c+d) n= Wildtypen: 5, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 6, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 7, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 5.

Männliche Mäuse desselben Alters wurden ebenfalls untersucht. Hierbei konnte eine Tendenz zu vergleichbaren Ergebnissen beobachtet werden. Wegen einer zu geringen Tierzahl konnte allerdings keine statistische Auswertung vorgenommen werden (Daten nicht gezeigt).

3.4.3 $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben stark erhöhte Seruminsulinwerte

$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse weisen zwar eine sehr gute Glukoseverwertung auf, zeigen aber Hinweise für eine Insulinresistenz (Abbildung 3.4 und 3.5). Gleichzeitig ist die β -Zellmasse im Vergleich zu der von Wildtypen erhöht, was auf eine verstärkte Insulinproduktion schließen lässt. Für nähere Untersuchungen wurde die Insulinkonzentration im Serum weiblicher Tiere gemessen.

Wie erwartet sind die Insulinspiegel im Serum von Leptin-defizienten Mäusen mit FTO im Vergleich zu denen der Wildtypen extrem erhöht. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse weisen ebenfalls eine stark erhöhte Insulinmenge auf, wenn auch signifikant weniger als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäuse (Abbildung 3.7).

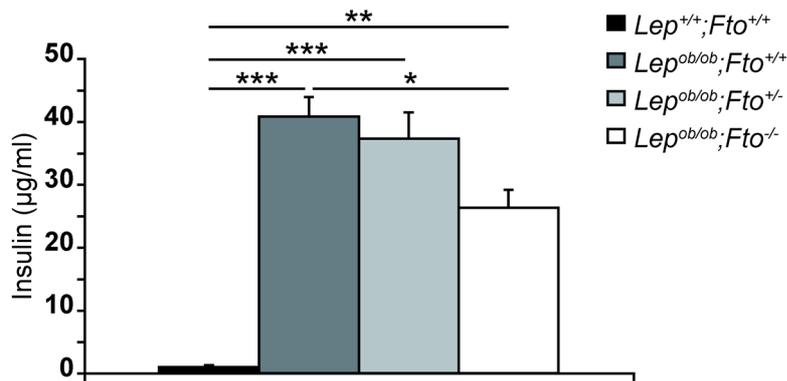


Abb. 3.7: Seruminsulin weiblicher Mäuse im Alter von 30 Wochen. Die Proben der Leptin-defizienten Mäuse wurden 1:2 verdünnt, die der Wildtypen wurden unverdünnt eingesetzt. Alle Leptin-defizienten Tiere weisen einen stark erhöhten Insulinspiegel im Blut auf, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben allerdings weniger Insulin im Serum als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse. n= Wildtypen: 3, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 3, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 7, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 3.

3.5 Analysen metabolischer Parameter von Leptin-defizienten Mäusen

Übergewicht resultiert meist aus einem gestörten Gleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch. Für Leptin-defiziente Mäuse ist beschrieben, dass sie aufgrund von Hyperphagie und gleichzeitig reduzierter körperlicher Aktivität an Adipositas erkranken. FTO-defiziente Mäuse zeigen, trotz reduzierter Gewichtszunahme, bezogen auf ihre fettfreie Körpermasse, eine gesteigerte Futteraufnahme und reduzierte körperliche Aktivität. Allerdings konnte ein erhöhter Energieumsatz detektiert werden, worauf auch das reduzierte Gewicht zurückgeführt wurde (Fischer, *et al.*, 2009). Um den Einfluss des kombinierten Verlustes der beiden Gene auf den Stoffwechsel der Tiere zu untersuchen, wurden die metabolischen Parameter ebenfalls gemessen.

3.5.1 $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ Mäuse zeigen eine reduzierte Nahrungsaufnahme

Die Futteraufnahme von Leptin-defizienten Mäuse mit FTO ist, wie erwartet, sowohl im Alter von 8 Wochen als auch im späteren Alter von 16 Wochen im Vergleich zu wildtypischen Tieren erhöht (Abbildung 3.8 a+b). Sie fressen mit etwa 0,3 g/h doppelt so viel wie Wildtypen. Bezogen auf die fettfreie Masse der Tiere ist kein signifikanter

Unterschied feststellbar (Abbildung 3.8 c und d). $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse fressen im Alter von 8 Wochen lediglich 0,05 g/h und damit signifikant weniger als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse (Abbildung 3.8 a). Dies ist auch bezogen auf die fettfreie Körpermasse noch deutlich (Abbildung 3.8 c). Auffällig ist in diesem Alter allerdings auch, dass die $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Tiere, auch im Vergleich zu den Wildtypen signifikant weniger trinken (Abbildung 3.8 a und c). Im Alter von 16 Wochen fressen $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse tendenziell auch weniger als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse, allerdings sind die Unterschiede nicht signifikant ($p=0,054$ und $0,059$) (Abbildung 3.8 b).

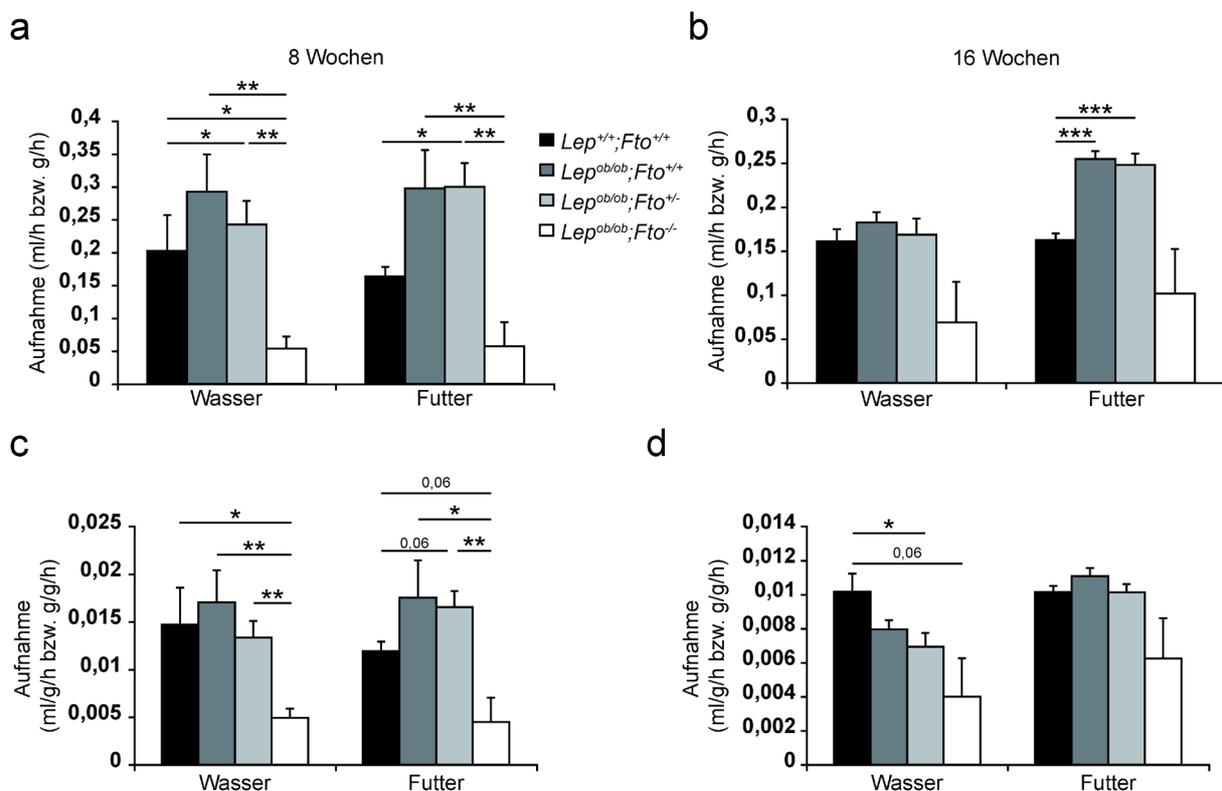


Abb. 3.8: Futter- und Wasseraufnahme von weiblichen Mäusen im Alter von 8 und 16 Wochen. a) Aufgenommene Menge an Wasser und Futter pro Stunde im Alter von 8 Wochen. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäuse trinken im Vergleich zu Wildtypen mehr. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse trinken im Vergleich zu allen anderen Genotypen extrem wenig. Die Futteraufnahme von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen ist im Vergleich zu Wildtypen signifikant erhöht, die der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen signifikant erniedrigt. b) Aufgenommene Menge an Wasser und Futter pro Stunde im Alter von 16 Wochen. Das Trinkverhalten zeigt keine signifikanten Unterschiede innerhalb der 4 Gruppen. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse fressen allerdings deutlich mehr als Wildtypen. c) Wasser- und Futteraufnahme pro Stunde bezogen auf die fettfreie Masse der Tiere im Alter von 8 Wochen. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse fressen und trinken signifikant weniger als alle anderen Tiere. d) Wasser- und Futteraufnahme pro Stunde bezogen auf die fettfreie Masse der Tiere im Alter von 16 Wochen. Im Alter von 16 Wochen zeigen die Daten lediglich in $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen eine reduzierte Wasseraufnahme im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. Die

Futteraufnahme zeigt keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Genotypen. a+c) n= Wildtypen: 7, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 8, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 4, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 4. b+d) n= Wildtypen: 7, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 7, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 6, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 4.

3.5.2 FTO-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Aktivität Leptin-defizienter Mäuse

Analysen zur Aktivität der Mäuse zeigen, dass Leptin-defiziente Tiere sich unabhängig vom *Fto*-Genotyp etwa halb so viel bewegen wie Wildtypen (Abbildung 3.9). Wildtypische Mäuse durchbrechen die Lichtschranken auf horizontaler (x- und y-Achse) und vertikaler (z-Achse) Ebene etwa 4000mal pro Stunde. Bei der Aufnahme der Aktivität wurde nicht zwischen Feinaktivität (nur eine Schranke wird durchbrochen) und grober Aktivität (mindestens zwei Schranken werden durchbrochen) unterschieden.

Leptin-defiziente Mäuse weisen nur etwa 2000 Durchbrechungen pro Stunde auf. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse zeigen keinerlei Unterschiede zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse. Des Weiteren sind hinsichtlich der Aktivität keine altersspezifischen Unterschiede zu erkennen (Vgl. Abbildung 3.9 a und b). FTO hat also keinen Einfluss auf die Aktivität Leptin-defizienter Mäuse.

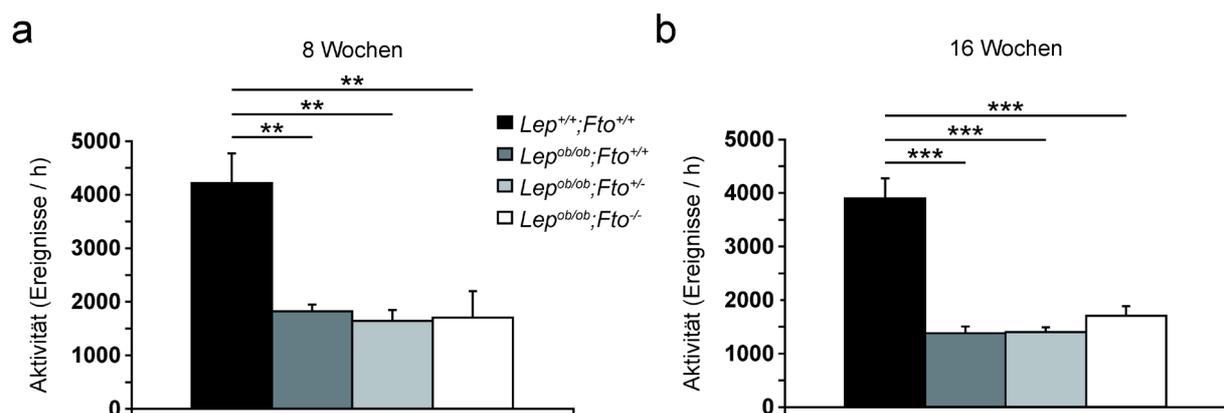


Abb. 3.9: Aktivität von weiblichen Mäusen im Alter von 8 (a) und 16 (b) Wochen. Leptin-defiziente Mäuse bewegen sich unabhängig vom *Fto*-Genotyp weniger als Wildtypen. a) n= Wildtypen: 7, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 8, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 4, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 4. b) n= Wildtypen: 7, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 7, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 6, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 4.

3.5.3 FTO-Defizienz hat in jungen Tieren Einfluss auf den Energieumsatz

Neben der Nahrungsaufnahme ist der Energieumsatz ein wichtiger Faktor für die Erhaltung eines konstanten Körpergewichts. In dieser Arbeit wurde die Methode der indirekten Kalorimetrie angewandt. Hierbei wird die Sauerstoff (O₂)-Aufnahme und die Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Abgabe bestimmt und daraus weiterhin der Energieverbrauch und der respiratorische Quotient (RQ) ermittelt.

Dargestellt sind in Abbildung 3.10 die O₂-Aufnahme und die CO₂-Abgabe bezogen auf die fettfreie Masse weiblicher Tiere aufgeteilt nach Tag und Nacht (Abbildung 3.10 a-d), sowie der Energieverbrauch (Abbildung 3.10 e und f) und der respiratorische Quotient. Die Messungen wurden im Alter von acht (Abbildung 3.10 a,c,e,g) und 16 (Abbildung 3.10 b,d,f,h) Wochen durchgeführt.

Im Alter von acht Wochen ist die O₂-Aufnahme am Tag bezogen auf die fettfreie Masse in *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Tieren erniedrigt (Abbildung 3.10 a). *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Tiere zeigen eine ähnliche Tendenz (p= 0,06 und 0,07). Auffällig ist allerdings, dass *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäuse auch im Vergleich zu *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*-Mäusen eine signifikant reduzierte O₂-Aufnahme zeigen. Nachts ist die O₂-Aufnahme aller Leptin-defizienter Gruppen im Vergleich zu Wildtypen niedriger. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse nehmen im Vergleich zu *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäusen tendenziell noch weniger Sauerstoff auf (p= 0,06 und 0,07). Die CO₂-Abgabe bezogen auf die fettfreie Masse am Tag ist in jungen *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäusen ebenfalls erniedrigt (Abbildung 3.10 c). Nachts zeigen wiederum alle Leptin-defizienten Tiere eine erniedrigte CO₂-Abgabe, wobei *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse tendenziell noch weniger CO₂ abgeben als *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäuse (p=0,06 und 0,05). Im Alter von 16 Wochen zeigen lediglich *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäuse eine veränderte O₂-Aufnahme und CO₂-Abgabe. Nachts sind ihre Werte signifikant niedriger als die von *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*-Mäusen (Abbildung 3.10 b und d).

Die Auswertung des Energieverbrauchs zeigt in jungen *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäusen eine tendenzielle Erhöhung im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse haben im Vergleich zu allen anderen analysierten Genotypen einen stark erniedrigten Energieverbrauch (Abbildung 3.10 e). Im Alter von 16 Wochen ist der Energieverbrauch von Leptin-defizienten Tieren mit FTO im Vergleich zu Wildtypen

und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen erhöht, die Werte der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse sind mit denen der Wildtypen vergleichbar (Abbildung 3.10 f).

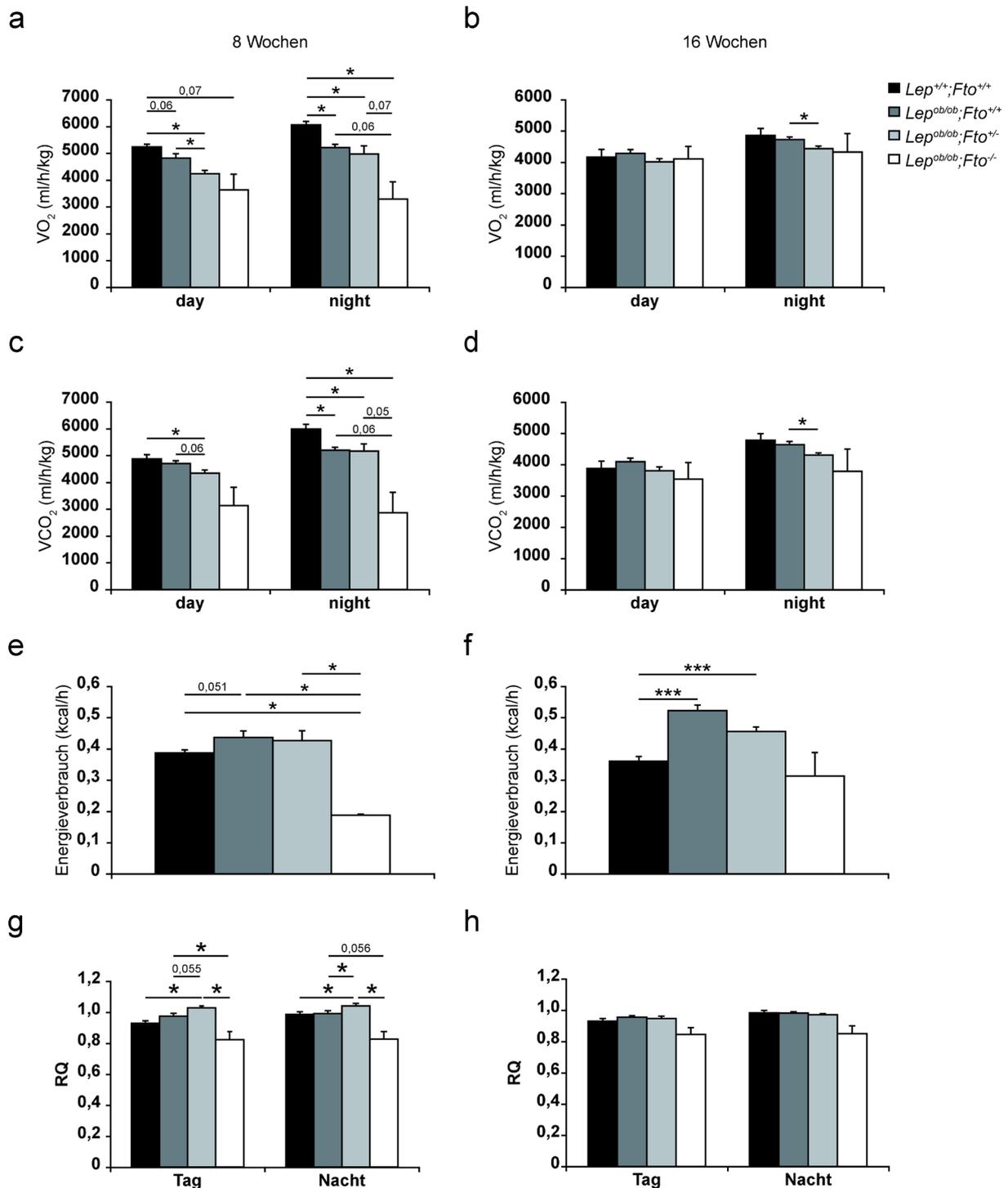


Abb. 3.10: Ergebnisse der indirekten Kalorimetrie weiblicher Mäuse im Alter von 8 und 16 Wochen. a+c) O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe junger Tiere im Alter von 8 Wochen bezogen auf die fettfreie Masse der Tiere. Leptin-defiziente Mäuse zeigen nachts deutlich niedrigere Werte als Wildtypen, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen tendenziell noch geringere O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe. b+d) O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe älterer Tiere im Alter von 16 Wochen bezogen auf die

fettfreie Masse der Tiere. Im Alter von 16 Wochen gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen wildtypischen und Leptin-defizienten Tieren. Nur $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse zeigen nachts eine signifikante Reduktion in O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäusen. e+f) Energieverbrauch der Tiere im Alter von 8 und 16 Wochen. Junge $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben einen signifikant niedrigeren Energieverbrauch als die Tiere der anderen Genotypen. In höherem Alter zeigen $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse im Vergleich zu Wildtypen und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen einen erhöhten Energieverbrauch. g+h) Respiratorischer Quotient im Alter von 8 und 16 Wochen. Im Alter von 8 Wochen ist der RQ von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen erhöht, der von $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen erniedrigt. Im Alter von 16 Wochen gibt es keine signifikanten Unterschiede. n (8W/16W)= Wildtypen: 7/7, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 8/7, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 4/6, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 4/4.

Der respiratorische Quotient gibt den Zusammenhang von O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe wieder und ist abhängig von dem jeweiligen verstoffwechselten Substrat.

Im Alter von acht Wochen ist sowohl tagsüber als auch nachts der RQ von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen höher als der von Wildtypen und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäusen. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben einen niedrigeren RQ als wildtypische und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse (Abbildung 3.10 g). Im Alter von 16 Wochen sind keine signifikanten Unterschiede innerhalb der vier Genotypen nachzuweisen (Abbildung 3.10 h).

3.6 $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse sind unter den Nachkommen unterrepräsentiert

Über den gesamten Zeitraum der Analysen wurden die Würfe regelmäßig kontrolliert und die Genotypenverteilung notiert. Bereits in den ersten Monaten konnte festgestellt werden, dass während der Genotypisierung im Alter von drei Wochen auffallend wenig $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse auftraten. Besonders männliche Mäuse dieses Genotyps waren selten in den Würfen zu finden. Zudem wurde festgestellt, dass im Laufe der Zeit immer wieder Tiere dieses Genotyps verstarben. Da für $Fto^{-/-}$ -Tiere bereits eine erhöhte postnatale Sterberate bekannt war (Fischer, *et al.*, 2009, Gao, *et al.*, 2010, Jäger, 2013, McMurray, *et al.*, 2013), wurden die Genotypenverteilungen im Alter von drei und 16 Wochen tabellarisch erfasst und statistisch ausgewertet. Hierzu wurde die Verteilung der erhaltenen Genotypen der gesamten Würfe mit der nach den Mendelschen Regeln zu erwartenden Verteilung verglichen (Tabelle 3.1). Es wurden 995 Tiere aus 153 Würfen ($Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$ X $Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$) verglichen. Zusätzlich wurden die Geschlechter getrennt betrachtet, da schon während der

ersten Wiegeanalysen auffiel, dass aus den Verpaarungen wesentlich weniger männliche als weibliche $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse hervorgingen.

Der angewendete Chi-Quadrat-Test gibt sowohl für Weibchen ($p=4,082*10^{-8}$) als auch für Männchen ($p=6,712*10^{-9}$) eine signifikante Abweichung der Genotypenverteilung von der Mendelschen Verteilung an (Tabelle 3.1). Zunächst fällt auf, dass alle $Fto^{-/-}$ -Genotypen geringer vertreten sind, als theoretisch erwartet. Besonders deutlich wird es, wenn die männlichen $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse betrachtet werden. Im Alter von drei Wochen gibt es statt der erwarteten 31 nur neun Tiere dieses Genotyps. Im Alter von 16 Wochen waren mit fünf weiteren Tieren sogar noch einmal mehr als 50% der Tiere gestorben. Bei den Weibchen hingegen überlebten nur zwei Tiere von 18 zwischen der dritten und der 16. Woche nicht. Bei genauerer Betrachtung der restlichen Genotypen ist dies kein ungewöhnliches Phänomen. In fast jeder Gruppe stirbt in dieser Zeit ein kleiner Prozentsatz. Die Sterberate innerhalb der ersten drei Lebenswochen (oder sogar schon vor der Geburt, was in diesem Fall nicht untersucht wurde) ist daher sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen zu beobachten. Eine erhöhte Sterberate nach der dritten Lebenswoche tritt allerdings nur bei männlichen $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen auf.

Tabelle 3.1: Genotypenverteilung der Nachkommen aus $Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$ x $Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$ Verpaarungen (C57/Bl6-Linie). Ausgewertet wurden 153 Würfe mit insgesamt 995 Nachkommen. Die Genotypen sind nach Geschlechtern getrennt aufgelistet. Dargestellt ist die erwartete Verteilung nach Mendelschen Regeln und die tatsächlichen Zahlen im Alter von 3 und 16 Wochen. Angegeben sind jeweils die Anzahl und die prozentuale Verteilung der Genotypen, sowie der prozentuale Unterschied (Differenz) des Anteils bei 3 Wochen zum erwarteten Anteil (gerundet auf 2 Nachkommastellen). Unterhalb der Tabelle sind die Ergebnisse der Chi-Quadrat-Tests (erwartete Anzahl gg. erhobene Anzahl im Alter von 3 Wochen) getrennt nach Männchen und Weibchen angegeben. Im Alter von 3 Wochen weicht die Genotypenverteilung signifikant von den nach Mendel erwarteten Zahlen ab. FTO-defiziente Tiere sind in beiden Geschlechtern unterrepräsentiert und besonders $Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$ -Männchen sind in sehr geringer Anzahl vorhanden. Im Alter von 16 Wochen fällt auf, dass noch einmal 50% der männlichen $Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$ -Mäuse verstorben sind.

Ges. (Männchen und Weibchen): 995 ; Anzahl Würfe: 153

	Weibchen									
	$Lep^{+/-};Fto^{+/-}$	$Lep^{+/-};Fto^{+/-}$	$Lep^{+/-};Fto^{-/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$
erwartet	31,09	62,19	31,09	62,19	124,38	62,19	31,09	62,19	31,09	31,09
erwartet (%)	3,125	6,25	3,125	6,25	12,5	6,25	3,125	6,25	3,125	3,125
3 Wochen	25	96	12	71	156	18	42	65	18	18
%	2,51	9,65	1,21	7,14	15,68	1,81	4,22	6,53	1,81	1,81
Differenz	- 0,61	+ 3,40	- 1,92	+ 0,89	+ 3,18	- 4,44	+ 1,10	+ 0,28	- 1,32	- 1,32
16 Wochen	25	95	11	69	146	15	40	62	16	16
%	2,51	9,55	1,11	6,93	14,67	1,51	4,02	6,23	1,61	1,61

	Männchen									
	$Lep^{+/-};Fto^{+/-}$	$Lep^{+/-};Fto^{+/-}$	$Lep^{+/-};Fto^{-/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$
erwartet	31,09	62,19	31,09	62,19	124,38	62,19	31,09	62,19	31,09	31,09
erwartet (%)	3,125	6,25	3,125	6,25	12,5	6,25	3,125	6,25	3,125	3,125
3 Wochen	37	85	14	61	152	17	36	81	9	9
%	3,72	8,54	1,41	6,13	15,28	1,71	3,62	8,14	0,90	0,90
Differenz	+ 0,59	+ 2,29	- 1,72	- 0,12	+ 2,78	- 4,54	+ 0,49	+ 1,89	- 2,22	- 2,22
16 Wochen	36	83	14	58	147	17	33	73	4	4
%	3,62	8,34	1,41	5,83	14,77	1,71	3,32	7,34	0,40	0,40

p= 4,082x10⁻⁹

p= 6,712x10⁻⁹

3.7 Analysen an Mäusen mit einem genetischen Mischhintergrund (C57BL/6J/NMRI)

Da auffallend wenig $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse unter den Nachkommen der C57BL/6J-Verpaarungen waren, wurde eine zweite Linie verpaart. Jeweils ein C57BL/6J-Tier ($Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$) wurde mit einem $Fto^{+/-}$ -Tier des genetischen Hintergrundes NMRI verpaart. Kombiniert heterozygote Nachkommen wurden dann in der zweiten Generation weiter untereinander verpaart. So kam eine Linie mit Mischhintergrund zustande, die auf dieselben Parameter untersucht wurde wie die erste Mauslinie. So konnten potentielle Unterschiede aufgrund der genetischen Hintergründe analysiert werden.

3.7.1 $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit einem C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund weisen keine erhöhte Sterberate auf

Zunächst konnte festgestellt werden, dass es bei der Betrachtung von 361 Tieren aus 45 Verpaarungen keine signifikanten Abweichungen von der erwarteten Verteilung gab (Tabelle 3.2). Von den $Fto^{-/-}$ -Tieren fallen lediglich männliche Tiere mit dem Genotyp $Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$ auf, da sie in deutlich geringerer Anzahl (ca. 50%) vorkommen als erwartet. Allerdings fällt dasselbe Phänomen bei wildtypischen Männchen auf. Auch eine sichtbar erhöhte Sterberate zwischen der dritten und 16. Lebenswoche ist nicht zu verzeichnen. Das Einkreuzen von Tieren mit einem NMRI-Hintergrund scheint die erhöhte Sterberate der $Fto^{-/-}$ -Tiere aufzuheben.

Tabelle 3.2: Genotypenverteilung der Nachkommen aus $Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$ x $Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$ Verpaarungen (C57BL/6J/NMRI-Linie). Ausgewertet wurden 45 Würfe mit insgesamt 361 Nachkommen. Die Genotypen sind nach Geschlechtern getrennt aufgelistet. Dargestellt ist die erwartete Verteilung nach Mendelschen Regeln und die tatsächlichen Zahlen im Alter von 3 und 16 Wochen. Angegeben sind jeweils die Anzahl und die prozentuale Verteilung der Genotypen, sowie der prozentuale Unterschied (Differenz) des Anteils bei 3 Wochen zum erwarteten Anteil (gerundet auf 2 Nachkommastellen). Unterhalb der Tabelle sind die Ergebnisse der Chi-Quadrat-Tests (erwartete Anzahl gg. erhobene Anzahl im Alter von 3 Wochen) getrennt nach Männchen und Weibchen angegeben. Die Verteilung der Genotypen weicht im Alter von 3 Wochen nicht von der nach den Mendelschen Regeln berechneten ab. Allerdings fällt auf, dass weniger $Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$ -Weibchen und $Lep^{+/+};Fto^{+/-}$ -Männchen gezählt wurden als erwartet. Im Alter von 16 Wochen ist keine erhöhte Sterberate eines Genotyps zu verzeichnen.

Ges. (Männchen und Weibchen): 361; Anzahl Würfe: 45

	Weibchen									
	$Lep^{+/+};Fto^{+/+}$	$Lep^{+/+};Fto^{+/-}$	$Lep^{+/+};Fto^{-/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{+/+}$	$Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$	
erwartet	11,28	22,56	11,28	22,56	45,13	22,56	11,28	22,56	11,28	
erwartet (%)	3,125	6,25	3,125	6,25	12,5	6,25	3,125	6,25	3,125	
3 Wochen	12	23	14	26	49	18	7	31	10	
%	3,32	6,37	3,88	7,20	13,57	4,99	1,94	8,59	2,77	
Diff. (%)	+ 0,20	+ 0,12	+ 0,75	+ 0,95	+ 1,07	- 1,26	- 1,19	+ 2,34	- 0,35	
16 Wochen	12	23	13	26	49	18	7	31	10	
%	3,32	6,37	3,60	7,20	13,57	4,99	1,94	8,59	2,77	

	Männchen									
	$Lep^{+/+};Fto^{+/+}$	$Lep^{+/+};Fto^{+/-}$	$Lep^{+/+};Fto^{-/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{+/+}$	$Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$	
erwartet	11,28	22,56	11,28	22,56	45,13	22,56	11,28	22,56	11,28	
erwartet (%)	3,125	6,25	3,125	6,25	12,5	6,25	3,125	6,25	3,125	
3 Wochen	5	27	9	25	54	11	8	21	11	
%	1,39	7,48	2,49	6,93	14,96	3,05	2,22	5,82	3,05	
Diff. (%)	- 1,74	+ 1,23	- 0,63	+ 0,68	+ 2,46	- 3,20	- 0,91	- 0,43	- 0,08	
16 Wochen	5	27	9	25	54	11	8	21	9	
%	1,39	7,48	2,49	6,93	14,96	3,05	2,22	5,82	2,49	

p= 0,9062

p= 0,3976

3.7.2 FTO-Defizienz hat auch in Leptin-defizienten Mäusen mit NMRI-Hintergrund einen positiven Einfluss auf die Gewichtsentwicklung

In Abbildung 3.11 ist die Gewichtsentwicklung von weiblichen (a) und männlichen (b) Mäusen mit einem genetischen Mischhintergrund (C57BL/6J/NMRI) dargestellt. Sowohl weibliche als auch männliche Leptin-defiziente Tiere mit FTO ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$) sind bereits in den ersten Lebenswochen, direkt nach dem Absetzen von der Mutter, signifikant schwerer als wildtypische und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse und wiegen im Alter von 16 Wochen etwa das Doppelte der Wildtypen. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse hingegen weisen in den ersten Lebenswochen ein geringeres Gewicht auf als Wildtypen. Erst ab der 9. (Männchen) bzw. 10. (Weibchen) Woche sind sie signifikant schwerer als wildtypische Geschwister. Bei Tieren des reinen C57BL/6J-Hintergrundes waren $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse erst ab der 15. Woche (Weibchen, Abbildung 3.1a) oder sogar noch später (Männchen, Abbildung 8.1a) signifikant schwerer als wildtypische Geschwister. FTO hat also auch bei Mäusen eines genetischen Mischhintergrundes Einfluss auf die Gewichtsentwicklung Leptin-defizienter Mäuse, allerdings ist die Stärke der Ausprägung in den zwei Mauslinien unterschiedlich.

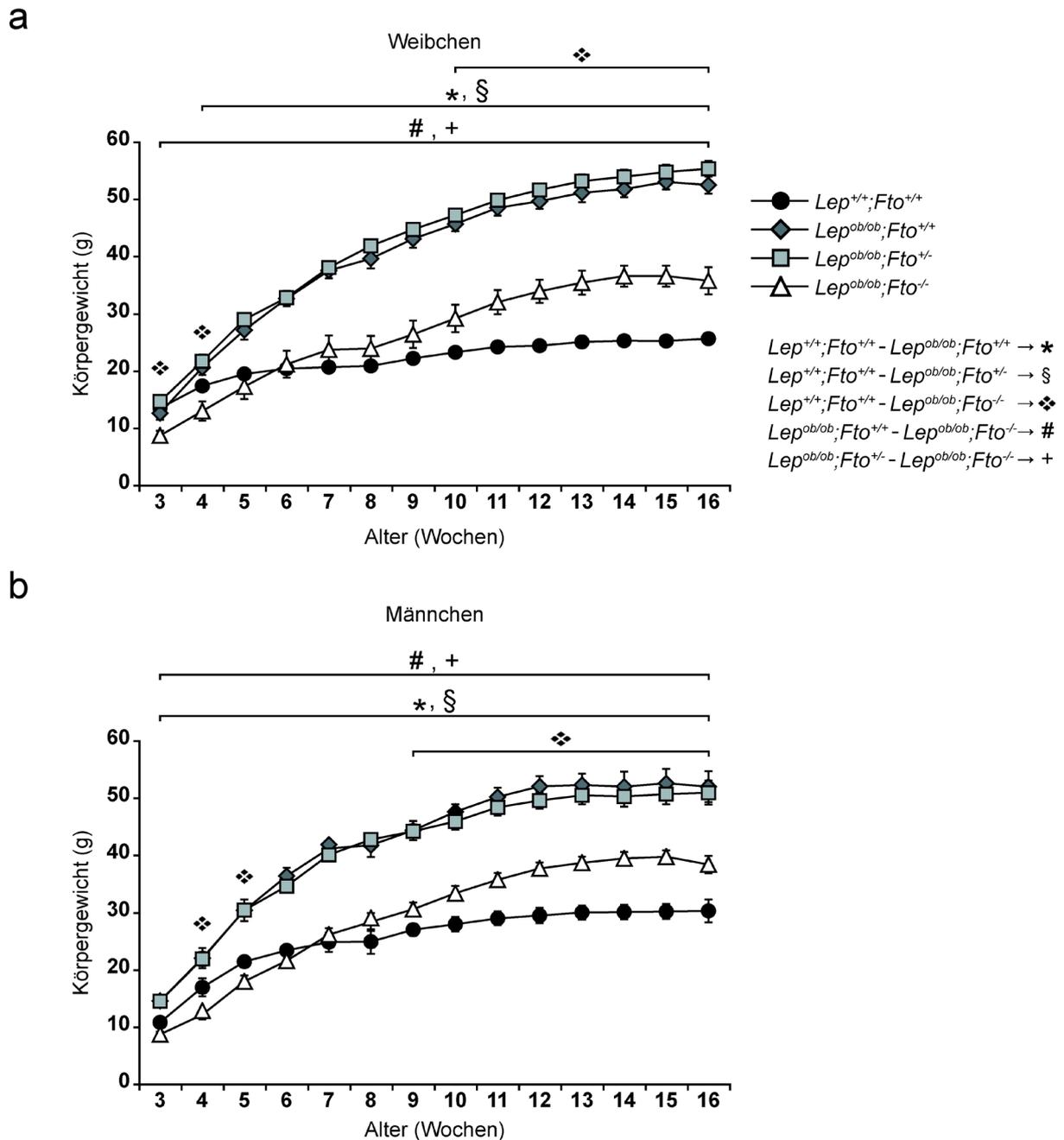


Abb. 3.11: Gewichtsentwicklung weiblicher (a) und männlicher (b) Mäuse auf C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund von der 3. bis zur 16. Lebenswoche. a) Weibliche $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäuse sind ab der 4. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse bereits ab der 3. Lebenswoche signifikant schwerer als wildtypische Mäuse. Ab der 12. Woche wiegen sie bereits etwa doppelt so viel. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse hingegen wiegen in Woche 3 und 4 signifikant weniger als Wildtypen, ab Woche 10 wiegen sie mehr. n= Wildtypen: 12-13, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 7-8, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 17-21, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 10. b) Männliche $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse sind ab der 3. Lebenswoche bereits signifikant schwerer als Wildtypen und zeigen eine ähnliche Gewichtsentwicklung wie die weiblichen Geschwister. Auch die Gewichtskurve der männlichen $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse ist mit der der weiblichen vergleichbar. In den ersten Wochen sind sie signifikant leichter als wildtypische Geschwister und ab Woche 9 ist ihr Gewicht signifikant erhöht. n= Wildtypen: 5, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 10-11, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 16-18, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 11-13. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen wurden mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet: “*” (Wildtyp gg.

$Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$, “§” (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$), “❖” (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$), “#” ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$), “+” ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$).

Die in der C57BL/6J-Linie analysierten Parameter zur Körperzusammensetzung wurden ebenfalls in der Linie mit Mischhintergrund untersucht. In Tabelle 3.3 und Tabelle 8.1 sind die Ergebnisse für Weibchen und Männchen zusammengefasst. Untersuchungen im Alter von 30 Wochen zeigen, dass auch die Zusammensetzung des Körperbaus der Tiere unabhängig vom genetischen Hintergrund und abhängig von FTO ist. Dies gilt sowohl für weibliche (Tabelle 3.3) als auch für männliche Mäuse (Tabelle 8.1). Auffällig ist, wie schon bei Tieren mit C57BL/6J-Hintergrund, dass $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu wildtypischen eine Wachstumsretardation aufweisen, obwohl Leptin-defiziente Mäuse mit FTO signifikant größer sind als wildtypische Geschwister. Im Vergleich zu wildtypischen Tieren sind $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Tiere signifikant schwerer, haben mehr Fett und auch das Lebergewicht ist erhöht. Ihre fettfreie Masse ist im Gegensatz zu der von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen nicht erhöht.

Im direkten Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen sind $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse signifikant kleiner, leichter und haben weniger Fettmasse. Epigonadales und inguinales Fett, sowie das Lebergewicht sind ebenfalls signifikant reduziert.

Tabelle 3.3: Analysen der Körperzusammensetzung weiblicher Mäuse mit C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund im Alter von 30 Wochen. Gemessen wurde das Körpergewicht, die Körperlänge, fettfreie Masse, Fettmasse, epigonadales Fett, inguinale Fett und das Gewicht der Leber. “#” kennzeichnen signifikante Unterschiede zu Wildtypen. “*” kennzeichnen signifikante Unterschiede zu *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäusen. Im Vergleich zu wildtypischen Tieren sind alle Werte in Leptin-defizienten Tieren mit FTO erhöht. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse weisen auch ein höheres Körpergewicht sowie erhöhte Fettmengen und ein erhöhtes Lebergewicht auf. Allerdings ist die fettfreie Masse nicht erhöht und die Messung der Körperlänge zeigt im Vergleich zu wildtypischen Mäusen eine Wachstumsretardation. Zusätzlich wird deutlich, dass *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse in allen gemessenen Parametern signifikant geringere Werte aufweisen als *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäuse.

Weibchen (30 Wochen)	<i>Lep^{+/+};Fto^{+/+}</i>	<i>Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}</i>	<i>Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}</i>	<i>Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}</i>
Körpergewicht (g)	28,6 ± 0,8 (n=11) *	61,7 ± 3,2 (n=5) * #	69,0 ± 2,01 (n=13) *#	41,3 ± 1,8 (n=12)
Länge (cm)	9,8 ± 0,1 (n=11) *	10,9 ± 0,15 (n=5) * #	10,6 ± 0,16 (n=13) *#	9,5 ± 0,14 (n=12)
FFM (g)	21,0 ± 1,0 (n=4)	28,9 ± 1,6 (n=7) * #	31,3 ± 0,7 (n=3) * #	21,4 ± 0,4 (n=7)
FM (g)	6,9 ± 0,9 (n=4) *	25,5 ± 2,3 (n=7) * #	25,6 ± 1,0 (n=3) * #	14,7 ± 0,7 (n=7)
epig. Fett (g)	1,0 ± 0,1 (n=10) *	5,1 ± 0,4 (n=5) * #	5,0 ± 0,3 (n=13) * #	2,5 ± 0,3 (n=12)
ing. Fett (g)	1,0 ± 0,1 (n=10) *	6,1 ± 0,5 (n=5) * #	7,7 ± 0,5 (n=13) * #	3,2 ± 0,3 (n=12)
Leber (g)	1,3 ± 0,2 (n=10) *	4,0 ± 0,4 (n=5) * #	5,0 ± 0,01 (n=13) * #	2,4 ± 0,2 (n=12)

FTO-Verlust zeigt in beiden Linien einen Effekt auf das Gewicht und den Körperbau Leptin-defizienter Mäuse. Allerdings sind wildtypische Mäuse des genetischen Mischhintergrundes größer und schwerer (Weibchen im Durchschnitt 9,8 cm lang und 28,6 g schwer) als C57BL/6J-Mäuse (Weibchen im Durchschnitt 9 cm lang und 24,2 g schwer) und auch der Effekt von FTO scheint unterschiedlich stark auszufallen. Somit müssen sie als getrennte Gruppen betrachtet werden.

3.7.3 FTO hat auch in *Lep^{ob/ob}*-Mäusen mit Mischhintergrund Einfluss auf die Blutglukose

Die Daten der Blutanalyse der Weibchen mit C57BL/6J/NMRI-Hintergrund sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Untersuchungen der Blutglukosewerte zeigen in sechs Wochen alten Leptin-defizienten Tieren unter Fastenbedingungen erhöhte Werte im Vergleich zu Wildtypen, unabhängig vom *Fto*-Genotyp. Werden die Mäuse allerdings nicht gefastet, zeigen nur *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäuse im Alter von 7

Wochen signifikant erhöhte Glukosewerte. Eine Wiederholung der Tests zu späteren Zeitpunkten (14 und 15 Wochen) ergibt ähnliche Resultate. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben unter Fastenbedingungen im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen erniedrigte Blutglukosewerte. Die Werte der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäuse streuen im Alter von 14 Wochen bei einer sehr geringen Tieranzahl allerdings stark, so dass keine signifikanten Unterschiede zu wildtypischen oder $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen aufzuweisen sind.

Tabelle 3.4: Blutglukosewerte weiblicher Mäuse (C57BL/6J/NMRI) im Alter von 6-7 und 14-15 Wochen. Dargestellt sind die Werte von gefasteten und ungefasteten Tieren. “#” kennzeichnen signifikante Unterschiede zu Wildtypen. “*” kennzeichnen signifikante Unterschiede zu $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen. 6 Wochen alte Leptin-defiziente Mäuse haben unabhängig vom *Fto*-Genotyp einen erhöhten Fasten-Glukosespiegel. Ungefastet zeigt sich in jungen Tieren nur in $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen ein erhöhter Blutzuckerspiegel. In älteren Tieren ist der Glukosespiegel in gefastetem Blut von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen erhöht, allerdings ist der Glukosespiegel von $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen gleichzeitig signifikant niedriger als der von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen. Ältere ungefastete $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse haben signifikant mehr Glukose im Blut als Wildtypen und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse.

	Weibchen	$Lep^{+/+};Fto^{+/+}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$
Glukose gefastet (mg/dl)	6 Wochen	44,1 ± 1,7 (n=12)	78,4 ± 12,4 (n=5) #	87,5 ± 6,4 (n=15) #	71,6 ± 8,5 (n=9) #
	14 Wochen	48,7 ± 3,2 (n=12)	103,6 ± 23,0 (n=5)	97,5 ± 8,5 (n=13) # *	73,2 ± 5,5 (n=9) #
Glukose nicht gefastet (mg/dl)	7 Wochen	92,2 ± 2,1 (n=12)	232,6 ± 46,4 (n=5) #	186 ± 19,0 (n=15) #	140,3 ± 23,8 (n=9)
	15 Wochen	99,2 ± 5,3 (n=13)	301,6 ± 42,2 (n=5) # *	197,1 ± 22,1 (n=13) # *	116,3 ± 8,2 (n=8)

Auch die Blutglukose von männlichen Geschwistern wurde untersucht und in Tabelle 8.2 dargestellt. Die Fastenglukosewerte der männlichen Tiere im Alter von sechs Wochen unterscheiden sich nicht signifikant innerhalb der vier Genotypen. Im Alter von 14 Wochen zeigen Leptin-defiziente Mäuse aber bereits erhöhte Werte. Hierbei sind $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse am stärksten betroffen. Die Werte der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse liegen zwischen denen der Wildtypen und der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäuse. Ungefastet weisen Leptin-defiziente Mäuse allerdings bereits im Alter von sieben Wochen deutlich erhöhte Glukosewerte im Blut auf. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäuse haben fast dreimal mehr Glukose im Blut als Wildtypen, während $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse gerade einmal eine Erhöhung um 50% aufweisen. Im Alter von 15 Wochen sind die Blutglukosewerte von ungefasteten $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen weiter

dramatisch gestiegen. Die der Wildtypen und der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse sind im Vergleich zur 7. Woche unverändert.

In Abbildung 3.12 sind GTTs und ITTs weiblicher Mäuse mit C57BL/6J/NMRI-Hintergrund dargestellt. Die Messungen wurden, wie schon bei Tieren der C57BL/6J-Linie, in zwei verschiedenen Altersstufen erhoben.

Im Alter von sechs Wochen ist bereits zu erkennen, dass $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ - Mäuse nach der Glukoseinjektion einen stärkeren Anstieg der Blutglukose zeigen als Wildtypen und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse. Der Höhepunkt der Kurve ist 30 Minuten nach der Injektion erreicht, während die Werte der wildtypischen und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Tiere bereits nach 15 Minuten wieder abfallen. Die Blutglukosewerte nach 120 Minuten unterscheiden sich zwischen allen drei Leptin-defizienten Gruppen allerdings nicht und sind höher als die der Wildtypen (Abbildung 3.12 a). Im Alter von 14 Wochen sind ähnliche Unterschiede in der Glukosereaktion zu erkennen (Abbildung 3.12 c). $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse zeigen einen stärkeren Anstieg der Blutglukose, während die Kurve der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse mit der der Wildtypen vergleichbar ist. Die Reaktion auf die Insulininjektion ist in beiden Altersstufen in Leptin-defizienten Mäusen unabhängig vom *Fto*-Genotyp deutlich schlechter als die der Wildtypen. Während wildtypische Mäuse 30 Minuten nach der Insulininjektion einen Abfall der Blutglukose auf etwa 60% zeigen, fallen die Werte von Leptin-defizienten Mäusen gerade mal auf etwa 80% des Startwertes ab (Abbildung 3.12 b und d).

In Abbildung 8.6 sind GTTs und ITTs von männlichen Mäusen mit C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund dargestellt. Im Alter ist die Reaktion von Leptin-defizienten Tieren nicht abhängig vom *Fto*-Genotyp. Alle drei Gruppen benötigen länger für den Abbau der Glukose als Wildtypen (Abbildung 8.6 a). Im Alter von 14 Wochen zeigen Wildtypen und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse eine vergleichbare Reaktion auf die Glukoseinjektion, während $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse allerdings eine deutlich verschlechterte Glukosetoleranz zeigen (Abbildung 8.6 c).

ITTs im Alter von sieben Wochen eröffnen wieder einen klaren Unterschied zwischen Wildtypen und Leptin-defizienten Mäusen unabhängig vom *Fto*-Genotyp (Abbildung 8.6 b). Leptin-defiziente Mäuse reagieren kaum auf die Insulininjektion. Im Alter von 15 Wochen steigt der Blutglukosespiegel von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen nach der Insulininjektion sogar an. Der Glukosespiegel von $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -

Mäusen sinkt auf etwa 85% des Startwertes, während der Wert wildtypischer Tiere auf etwa 65% sinkt (Abbildung 8.6 d).

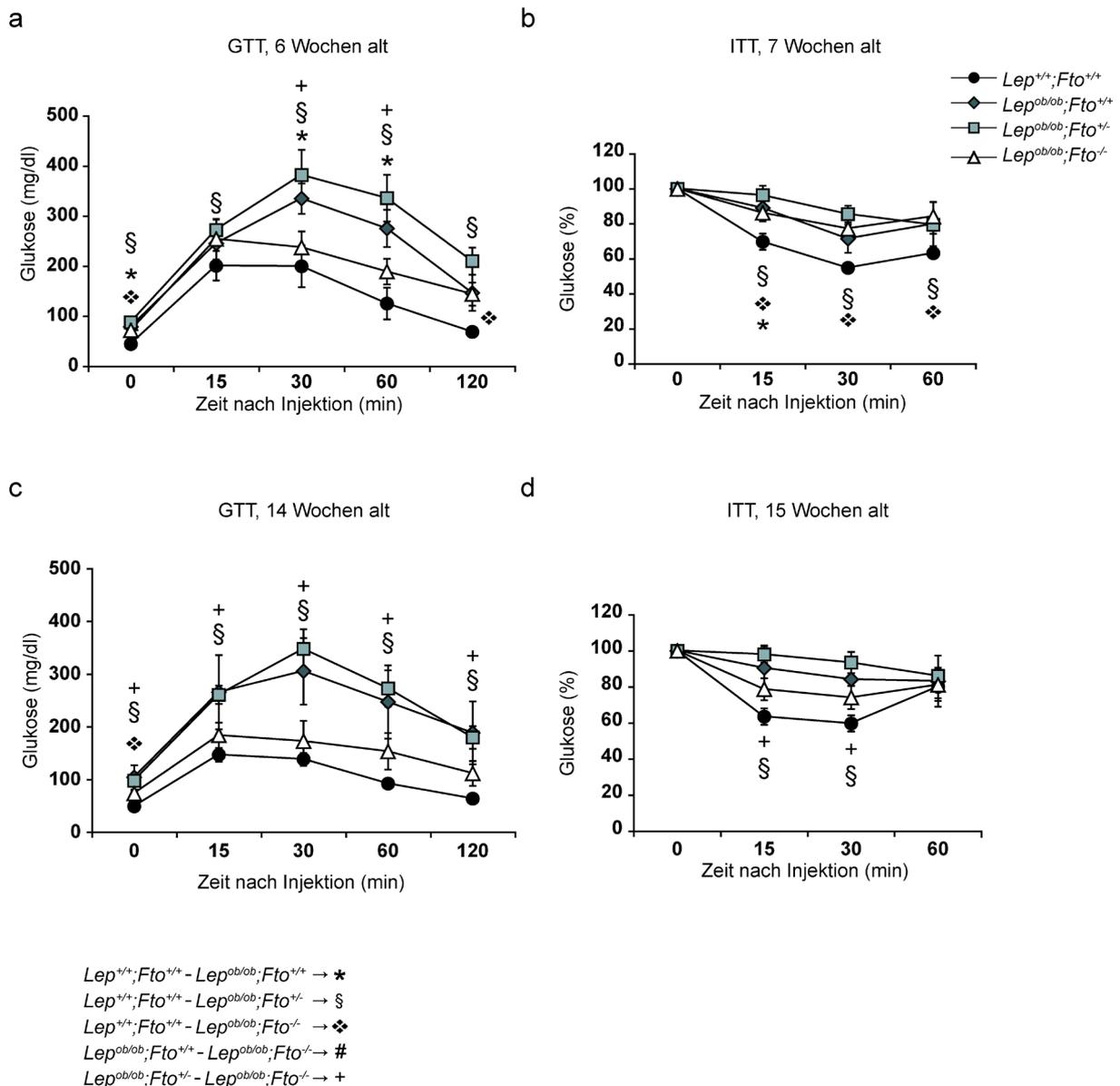


Abb. 3.12: GTTs und ITTs weiblicher Mäuse mit C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund. a+c) GTTs im Alter von 6 und 14 Wochen. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse weisen nach der Glukoseinjektion einen stärkeren Anstieg der Blutglukose auf als Wildtypen und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse. Die Kurve von Wildtypen und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen verläuft ähnlich. Allerdings erreichen Wildtypen im Alter von 6 Wochen nach 120 Minuten einen niedrigeren Glukosewert als $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse. Im Alter von 14 Wochen zeigen die GTTs ähnliche Ergebnisse, allerdings haben die Messwerte der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäuse eine hohe Standardabweichung und Vergleiche zeigen keine signifikanten Unterschiede. b+d) ITTs im Alter von 7 und 15 Wochen. Die Werte sind prozentual in Bezug auf den Startwert ($\triangleq 100\%$) berechnet. Im Vergleich zu wildtypischen Tieren reagieren Leptin-defiziente Mäuse unabhängig vom *Fto*-Genotyp nicht sehr deutlich mit einer Glukosesenkung auf die Insulininjektion. Die statistisch signifikanten Unterschiede in GTTs und ITTs zwischen den einzelnen Genotypen wurden mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet: “*” (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$), “§” (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$), “¶” (Wildtyp gg.

$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$, „#“ ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$), „+“ ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$). n= Wildtypen: 12-13, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 5, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 13-15, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 8-9.

3.7.4 Das Einkreuzen des NMRI-Hintergrundes führt zu Glukosurie in Leptin-defizienten Mäusen

Die ersten Analysen zeigten keine auffälligen Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien. In höherem Alter kam es allerdings zu Auffälligkeiten in der C57BL/6J/NMRI-Linie. Immer wieder konnte beobachtet werden, dass Mäuse der Genotypen $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ sehr plötzlich stark an Gewicht verloren. Gleichzeitig waren die Wasserflaschen extrem schnell leer und die Tiere urinieren übermäßig viel. Dies sind alles Hinweise auf akuten Diabetes, welche nie in der C57BL/6J-Linie beobachtet wurden.

Um im Alter von 30 Wochen die Glukoseverwertung zu untersuchen, wurden Urinproben der Tiere gesammelt und diese mit Teststreifen auf vorhandene Glukose im Urin getestet. Glukosewerte im Urin sind unter gesunden Umständen nur sehr gering, da der Zucker, der aus dem Blut in den Harn gelangt, von den Nieren wieder aufgenommen wird. Ist der Glukosespiegel im Blut allerdings zu hoch, kommt es zu einer „Glukosurie“ (Urinzucker), da die Nierenschwelle, d.h. die Kapazität der Nieren Zucker aufzunehmen, erreicht ist (Bailey, 2011).

Tabelle 3.5 zeigt die Ergebnisse für jedes getestete Individuum sortiert nach Genotyp und Geschlecht. Die Glukosewerte der Wildtypen liegen alle im vom Test angegebenen „Normalbereich“. Allerdings fällt auf, dass alle $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse stark erhöhte Glukosewerte im Urin aufweisen. Von den analysierten $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen zeigt lediglich ein Männchen leicht erhöhte Werte.

Tabelle 3.5: Uringlukose-Konzentrationen getrennt nach Kategorien. Dargestellt sind Glukosewerte im Urin von Mäusen mit einem C57BL/6J/NMRI-Hintergrund, aufgetrennt nach Geschlecht und Genotyp. Jeder Wert entspricht der Glukosemenge im Urin eines Individuums. Die Kategorien wurden vom Teststreifen per Augenmaß abgelesen. Die Definition der Kategorien ist in der Legende neben der Tabelle dargestellt. Sowohl weibliche, als auch männliche $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse weisen einen messbar erhöhten Glukosewert auf, während von Mäusen des Genotyps $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ nur ein einzelnes Männchen einen leicht erhöhten Wert hat.

Weibchen	$Lep^{+/+};Fto^{+/+}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$
	n	4	3	n
	n	4	4	n
	n	4	3	n
		4		n
		4		
Männchen				
	n	4	4	1
	n	4	4	n
	n	4	4	n
		2	4	
			4	
			4	

n = Normalbereich
 1 = 50 mg/dl
 2 = 100 mg/dl
 3 = 300 mg/dl
 4 = 1000 mg/dl

3.8 Effekt von Leptin-Defizienz auf $Fto^{-/-}$ -Tiere

Zur Darstellung des unterschiedlichen Effekts einer Leptin-Defizienz wurden Gewicht und Länge von $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäusen direkt einander gegenübergestellt. Abbildung 3.13 zeigt die Daten für weibliche Mäuse der C57BL/6J-Linie. In $Fto^{+/+}$ -Mäusen hat eine Leptin-Defizienz bereits sehr früh Einfluss auf das Körpergewicht. Im Alter von neun Wochen sind die Tiere bereits doppelt so schwer wie wildtypische. Zwischen $Fto^{-/-}$ -Mäusen mit $Lep^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob}$ -Genotyp zeigt sich in diesem Alter noch kein Unterschied im Körpergewicht (Abbildung 3.13 a). Im Alter von 30 Wochen haben $Fto^{+/+}$ -Tiere mit Leptin-Defizienz bereits das Dreifache an Körpergewicht von $Fto^{+/+}$ -Tieren mit wildtypischem Leptin. In diesem Alter ist der Einfluss der Leptin-Defizienz auch in $Fto^{-/-}$ -Tieren deutlich. $Fto^{-/-};Lep^{ob/ob}$ -Mäuse wiegen zu diesem Zeitpunkt doppelt so viel wie $Fto^{-/-}$ -Tiere (Abbildung 3.13 b). Die Körperlänge wurde an ausgewachsenen Tieren im Alter von 30 Wochen gemessen. Der Vergleich der Körperlänge zeigt einen klaren Effekt von Leptin-Defizienz auf $Fto^{+/+}$ -Mäuse. $Lep^{ob/ob}$ -Tiere sind etwa 1 cm länger als wildtypische. Interessanterweise gibt es keinen Effekt von Leptin-Defizienz auf die Länge von $Fto^{-/-}$ -Mäusen (Abbildung 3.13 c).

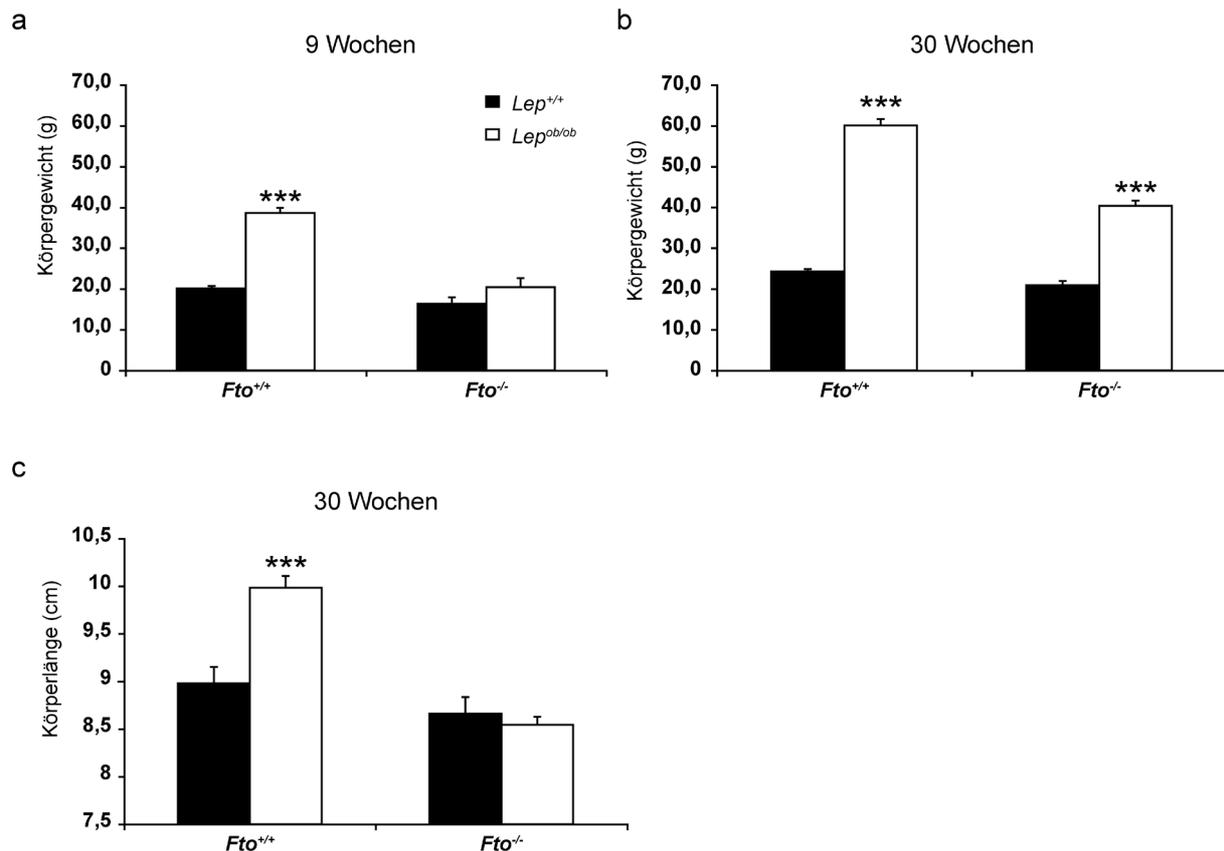


Abb. 3.13: Vergleich der Wirkung von Leptin-Defizienz auf *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäuse. Dargestellt ist das Gewicht in weiblichen jungen (a) und alten Tieren (b) sowie die Körperlänge alter Tiere. a) Körpergewicht 9 Wochen alter Mäuse. Während Leptin-Defizienz in *Fto*^{+/+}-Mäusen bereits zu diesem Zeitpunkt in einer Verdopplung des Körpergewichtes resultiert, zeigt eine Leptin-Defizienz in *Fto*^{-/-}-Mäusen noch keine signifikante Auswirkung. n= Wildtypen: 20, *Lep*^{ob/ob};*Fto*^{+/+}: 21, *Lep*^{+/+};*Fto*^{-/-}: 5, *Lep*^{ob/ob};*Fto*^{-/-}: 11. b) Körpergewicht der Mäuse im Alter von 30 Wochen. Zu diesem Zeitpunkt ist auch in *Fto*^{-/-}-Mäusen ein deutlicher Effekt der Leptin-Defizienz zu erkennen. c) Körperlänge der Mäuse im Alter von 30 Wochen. Ausgewachsene weibliche *Fto*^{+/+}-Mäusen mit Leptin-Defizienz sind etwa 1 cm größer als mit wildtypischem Leptin. Auf die Körpergröße von *Fto*^{-/-}-Mäusen hat die Leptin-Defizienz keinerlei Einfluss. b+c) n= Wildtypen: 14, *Lep*^{ob/ob};*Fto*^{+/+}: 17, *Lep*^{+/+};*Fto*^{-/-}: 10, *Lep*^{ob/ob};*Fto*^{-/-}: 16.

Analysen zeigen dieselben Ergebnisse für männliche Tiere und auch für die C57BL/6J/NMRI-Mauslinie konnte dies bestätigt werden (Daten werden hier nicht gezeigt).

4 DISKUSSION

Die Analysen dieser Arbeit zeigen, dass die Inaktivierung von *Fto* in Leptin-defizienten Mäusen zu einer reduzierten Gewichtszunahme und damit einem geringeren Fettanteil führt. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass FTO Einfluss auf Fetteinlagerungen in der Leber und eine Funktion in der Regulation des Blutzuckerspiegels hat. FTO-Defizienz verhindert die Entstehung von enormen Langerhans'schen Inseln im Pankreas von Leptin-defizienten Mäusen und führt zu leicht reduzierten Insulinwerten im Blut, hat aber keinen Einfluss auf die Insulinsensitivität Leptin-defizienter Mäuse. Weiterhin können bei *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäusen eine reduzierte Futtermengeaufnahme und ein geringerer Energieverbrauch gemessen werden, was auf eine Wirkung von FTO in der Kontrolle der Nahrungsaufnahme sowie des Energiehaushaltes hindeutet. Allerdings zeigen sie im Vergleich zu *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*-Mäusen keine Veränderungen in der körperlichen Aktivität. In *Fto^{-/-}*-Mäusen auf einem C57BL/6J-Hintergrund wurde zudem eine erhöhte Letalitätsrate festgestellt, die bei männlichen *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäusen am höchsten war.

4.1 FTO ist entscheidend an der Gewichtsentwicklung Leptin-defizienter Mäuse beteiligt

In den letzten Jahren gab es deutliche Fortschritte in den Erkenntnissen über genetische Prädispositionen für diverse Krankheiten. Genetische Variationen rücken daher auch in therapeutischer Hinsicht immer mehr in den Vordergrund.

Für die Gewichtsentwicklung und damit auch für die Entwicklung von Übergewicht werden heutzutage eine ganze Reihe von Genvariationen verantwortlich gemacht. Zur Analyse dieser und für mögliche Therapieansätze werden Mausmodelle, wie z.B. Leptin-defiziente Mäuse, genutzt. In diesen kann sowohl die Funktion des inaktivierten Gens als auch die Funktion bzw. der Einfluss anderer Gene auf den Phänotyp untersucht werden. Dadurch können Zusammenhänge und komplexe Netzwerke, die zu einem Phänotyp beitragen, beschrieben werden. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen bereits zeigen, dass die Inaktivierung einzelner Gene

aus der Fettsäuresynthese und aus der Regulierung der Nahrungsaufnahme dem Leptin-defizienten Phänotyp entgegen wirken können. Im Jahr 2002 zeigten Naveilhan und seine Kollegen, dass die Entfernung des NPY-Rezeptors (Y2) in Leptin-defizienten weiblichen Mäusen einen positiven Einfluss auf die Gewichtsentwicklung hat. Y2 ist demnach an der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energie-Homöostase beteiligt (Naveilhan, *et al.*, 2002). Eine Erhöhung der POMC-Expression führt zu reduzierter Hyperphagie und dadurch ebenfalls zu einer Reduktion der Fettleibigkeit in *Lep^{ob/ob}*-Mäusen (Mizuno, *et al.*, 2003). Die Deletion der RI β -Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) vermindert auch die Nahrungsaufnahme und den adipösen Phänotyp Leptin-defizienter Mäuse (Newhall, *et al.*, 2005).

Fischer und ihre Kollegen haben 2009 bereits gezeigt, dass eine konstitutive Inaktivierung des *Fto*-Gens in Mäusen zu reduzierter Fetteinlagerung und einem schlanken Phänotyp führt und dadurch vor Fettleibigkeit schützen kann (Fischer, *et al.*, 2009). Die Untersuchung von Leptin-defizienten Mäusen mit zusätzlicher *Fto*-Inaktivierung sollte in dieser Arbeit Aufschluss darüber geben, in welchem Maße FTO an der Entstehung der Fettleibigkeit und weiteren metabolischen Fehlfunktionen in genetisch adipösen Mäusen beteiligt ist und ob es Ansätze für eine Therapie genetisch fettleibiger Menschen liefern kann.

Die Analysen der *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse zeigen einen klaren Beitrag des FTO-Proteins zur Gewichtsentwicklung. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Gewichtsanalysen von wildtypischen und *Fto^{-/-}*-Mäusen, die mit einer HFD gefüttert wurden (Fischer, *et al.*, 2009). In beiden Fällen schützt eine FTO-Defizienz in Mäusen vor der Entstehung einer Adipositas, und das unabhängig vom Leptin-Genotyp. Zwar entwickeln auch *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse in höherem Alter ein signifikant erhöhtes Körpergewicht, aber eine vergleichbar starke Adipositas wie Leptin-defiziente Mäuse mit FTO zeigen sie nicht. Dies deutet auf eine altersabhängige Verschiebung der Gewichtszunahme hin (Abbildung 3.13 a und b). Die Gewichtsunterschiede zwischen Leptin-defizienten Mäusen mit und ohne FTO sind hierbei nicht allein auf die Wachstumsretardation der *Fto^{-/-}*-Mäuse zurückzuführen.

Das erhöhte Gewicht Leptin-defizienter Mäuse ist hauptsächlich auf eine dramatische Erhöhung der Fettmasse im Körper zurückzuführen. *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse hingegen haben signifikant weniger Fettmasse bezogen auf ihre fettfreie

Masse (Abbildung 3.2 b). Auch diese Tatsache bestätigt, dass das verringerte Körpergewicht nicht allein durch die reduzierte Körpergröße der Tiere zu erklären, sondern einer reduzierten Einlagerung von Fettmasse zuzuschreiben ist. Im Detail ist dies auf kleinere Fettdepots am Bauch und am Rücken zurückzuführen (Abbildung 3.2 c). Somit ist FTO ein an der Entstehung von morbidem Adipositas beteiligter Faktor.

4.2 FTO-Defizienz verringert die Nahrungsaufnahme von $Lep^{ob/ob}$ -Mäusen

Die Futteraufnahme von Leptin-defizienten Mäusen mit FTO ist sowohl im Alter von acht Wochen als auch im Alter von 16 Wochen im Vergleich zu wildtypischen Tieren erhöht (siehe Abbildung 3.8 a und b). Sie fressen mit etwa 0,3 g/h doppelt so viel wie Wildtypen. Bezogen auf die fettfreie Masse der Tiere ist kein signifikanter Unterschied feststellbar (siehe Abbildung 3.8 c und d). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Tiere bereits stark adipös sind und sowohl die Fettmasse als auch die fettfreie Masse zu diesem Zeitpunkt schon signifikant erhöht ist. Die Aktivität Leptin-defizienter Mäuse ist wie erwartet sehr niedrig. Ihnen fällt aufgrund ihrer Körpermasse Bewegung schwerer als Wildtypen.

$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse zeigen im Vergleich zu Leptin-defizienten Mäusen mit FTO keine erhöhte körperliche Aktivität und auch keine erhöhte Stoffwechselrate (Abbildung 3.9 und 3.10). Höchstwahrscheinlich ist der schlankere Phänotyp zum großen Teil auf eine reduzierte Nahrungsaufnahme zurückzuführen, welche hauptsächlich bei jüngeren Tieren zu beobachten ist (Abbildung 3.8 a und c). Interessanterweise sind diese Ergebnisse kontrovers zu denen der $Fto^{-/-}$ -Tiere. Diese zeigten im Vergleich zu Wildtypen zwar auch eine geringere Aktivität, aber eine signifikant höhere Stoffwechselrate und eine erhöhte Nahrungsaufnahme bezogen auf ihre fettfreie Masse (Fischer, *et al.*, 2009). Auch ein weiteres konstitutives FTO-defizientes Mausmodell sowie eine Mauslinie mit neuronalspezifischer Fto -Inaktivierung weisen eine erhöhte Nahrungsaufnahme und einen erhöhten Energieumsatz auf (Gao, *et al.*, 2010). Lediglich die Inaktivierung des Fto -Gens im Hypothalamus von adulten Mäusen führte zu einer signifikanten Reduktion der Nahrungsaufnahme und

hatte keinen Einfluss auf den Energieumsatz der Tiere (McMurray, *et al.*, 2013). Eine Überexpression des *Fto*-Gens in Mäusen führte sogar zu einer FTO-dosisabhängigen Steigerung der Nahrungsaufnahme (Church, *et al.*, 2010), was ebenfalls deutliche Hinweise auf eine Funktion des Proteins in der Regulation der Nahrungsaufnahme gibt. Die Nahrungsaufnahme wird zum Großteil im Hypothalamus reguliert, wo auch die stärkste Expression von FTO gefunden wurde (Gerken, *et al.*, 2007). Es ist daher möglich, dass FTO eine Rolle im Leptin-Signalweg und damit in der Regulation der Nahrungsaufnahme spielt. In einer Vergleichsstudie von Personen mit und ohne *FTO*-Risiko-Allel wurde herausgefunden, dass Personen mit zwei Risiko-Allelen im Vergleich zu Personen mit zwei nicht-Risiko-Allelen postprandial erhöhte Ghrelinwerte sowie ein geringeres Sättigungsgefühl aufweisen (Karra, *et al.*, 2013). Ghrelin ist ein Appetit-anregendes Hormon, welches, ähnlich wie Leptin, die Aktivität von NPY- und AgRP-Neuronen im Gehirn reguliert.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt zusätzlich auf, dass *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse signifikant weniger trinken als Wildtypen. Dies könnte eine Folge der unbekannteren Umgebung sein, welche in den Tieren eine Stresssituation auslöst. Stress kann einen großen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme haben. In seiner Masterarbeit im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie hat André Spsychala zeigen können, dass FTO-defiziente Tiere Verhaltensauffälligkeiten verbunden mit erhöhten Stresshormonen im Blut zeigen (Spsychala, 2012). Frühere Analysen von *Fto^{-/-}*-Mäusen ergaben bereits erhöhte Adrenalinwerte im Blut der Tiere (Fischer, *et al.*, 2009). Es besteht daher die Möglichkeit, dass *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse aufgrund einer erhöhten Stressanfälligkeit sowohl weniger trinken als auch fressen. Des Weiteren hängen die Futtergefäße und die Wasserflaschen in den Stoffwechsellkäfigen höher als in den Haltungskäfigen. Unter Umständen ist es für *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse aufgrund ihres Körperbaus schwieriger bzw. mit mehr Aufwand verbunden, Wasser und Nahrung zu erreichen, was ebenfalls eine reduzierte Nahrungsaufnahme zur Folge hätte.

4.3 FTO und Leptin

Mittlerweile gibt es aufgrund aktueller Studien einige Hinweise darauf, dass FTO Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat. Analysen zeigen, dass Menschen mit zwei *FTO*-Risiko-Allelen Nahrung mit höherem Energiewert präferieren, allerdings konnte bisher nicht belegt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen *FTO*-Varianten und erhöhter Nahrungsaufnahme gibt (Cecil, *et al.*, 2008, Brunkwall, *et al.*, 2013, Iba, *et al.*, 2013). In Mäusen führt die Überexpression von *Fto* zu verstärkter Nahrungsaufnahme, dadurch wiederum zu einer vermehrten Fettmasse und zu erhöhten Leptinspiegeln (Church, *et al.*, 2010). *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse zeigen eine reduzierte Nahrungsaufnahme (siehe Abbildung 3.8). Allerdings müssen die Tiere immer noch genügend Nahrung aufnehmen, um signifikant schwerer zu werden als die Wildtypen. Ein Vergleich von Effekten in *Fto^{+/-}*- und *Fto^{-/-}*-Mäusen zeigt, dass Leptin-Defizienz aufgrund von FTO-Defizienz Teile seiner Wirkung verliert. Zum einen nehmen *Fto^{-/-}*-Mäuse langsamer und in geringerem Maße an Gewicht zu, wenn Leptin fehlt, als *Fto^{+/-}*-Mäuse (siehe Abbildung 3.13 a und b). FTO hat also eine Funktion in der Entwicklung des Übergewichts bei Leptin-defizienten Mäusen. Zum anderen hat eine Leptin-Defizienz keine Wirkung auf das Größenwachstum FTO-defizienter Mäuse, während *Fto^{+/-}*-Mäuse mit Leptin-Defizienz deutlich an Größe zunehmen (siehe Abbildung 3.13 c). Eine Wachstumsretardation kann aufgrund von Beschränkungen bei der Nahrungsaufnahme, Unterernährung oder Malabsorption entstehen (Gat-Yablonski, *et al.*, 2004). Die Befunde aus den Analysen der *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse deuten darauf hin, dass FTO-Defizienz dazu führt, dass die Mäuse zwar Energie aufnehmen und speichern, diese aber relativ schlecht verwerten können. Um diese Theorie bestätigen zu können, wäre es sinnvoll, den Kot der Tiere zu analysieren und eventuell entsprechende Verdauungsenzyme auf ihre Funktion hin zu untersuchen.

4.4 FTO und das metabolische Syndrom

Ein Zusammenhang zwischen Variationen im *FTO*-Gen und dem metabolischen Syndrom im Menschen wurde kürzlich in mehreren Veröffentlichungen diskutiert.

Allerdings kommen diese zu kontroversen Ergebnissen. Während eine Studie eine Risikovariante des *FTO*-Gens in adipösen Frauen untersucht hat und keine Assoziation zum metabolischen Syndrom fand (de Luis, *et al.*, 2013), konnte eine andere, unter Verwendung von Daten aus verschiedenen Studien, eine klare Assoziation zeigen (Wang, *et al.*, 2012). Weitere Vergleichsstudien konnten zudem nachweisen, dass Träger des Risiko-Allels in verschiedenen Populationen ein höheres Risiko für das metabolische Syndrom oder entsprechende Risikofaktoren haben (Al-Attar, *et al.*, 2008, Luczynski, *et al.*, 2012). Zusätzlich belegen viele unabhängige Studien den Zusammenhang von Varianten im *FTO*-Gen mit Adipositas in der Kindheit (Cecil, *et al.*, 2008, Lopez-Bermejo, *et al.*, 2008, Dwivedi, *et al.*, 2012), der Hauptursache für die Entstehung des metabolischen Syndroms.

Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Behandlung von adipösen Mäusen mit Medikamenten, die die Nahrungsaufnahme oder den Stoffwechsel beeinflussen, neben einer Reduktion der Fettleibigkeit auch eine Verbesserung weiterer metabolischer Parameter zur Folge hat (Pelleymounter, *et al.*, 1995, Sodhi, *et al.*, 2009, Chakraborty, *et al.*, 2010, Townsend, *et al.*, 2012).

Zur Analyse der Funktion von *FTO* in der Entwicklung des metabolischen Syndroms wurden in dieser Arbeit Leptin-defiziente Mäuse verschiedener *Fto*-Genotypen sowie wildtypische Mäuse auf verschiedene Parameter dieser Erkrankung hin untersucht. Neben starkem Übergewicht kennzeichnen ektopische Fettakkumulation, erhöhte Blutglukosewerte und Insulinresistenz das metabolische Syndrom.

Die nichtalkoholische Fettleber ist häufig eine Folge von Überernährung und ein beliebtes Beispiel für übermäßige ektopische Fettakkumulation. Leptin-defiziente Mäuse weisen eine solche verstärkte Lipideinlagerung auf. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von *Fto* Leptin-defiziente Mäuse selbst im Alter (30 Wochen) vor einer Fettleber schützt.

Für die Mehrzahl der analysierten Faktoren des metabolischen Syndroms kann gezeigt werden, dass Leptin-defiziente Mäuse von dem *Fto*-Verlust profitieren, wobei allerdings die Insulinsensitivität keine Veränderungen erfährt. Die grundlegende Ursache für die Verbesserungen der metabolischen Parameter ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die reduzierte Fettleibigkeit. Wie bereits in anderen Studien gezeigt, kann die Manipulation von Genen, die direkt an der Regulation der

Nahrungsaufnahme beteiligt sind, sowohl Fettleibigkeit als auch damit einhergehende Symptome reduzieren (Erickson, *et al.*, 1996, Mizuno, *et al.*, 2003, Jager, *et al.*, 2010). Einige Untersuchungen beschrieben eine direkte Wirkung der Inaktivierung von Genen auf Insulin- und Glukosesensitivität, ohne den Adipositas-Phänotyp zu beeinflussen (Sun, *et al.*, 2006, Yoshihara, *et al.*, 2010). Andere wiederum zeigten lediglich eine Wirkung auf die Fettleibigkeit. So führt z.B. die Entfernung von PPAR γ 2 in *Lep^{ob/ob}*-Mäusen zwar zu einem schlankeren Phänotyp, doch mit einer parallelen Verstärkung der Insulinresistenz (Medina-Gomez, *et al.*, 2007). Bei der Suche nach präventiven sowie therapeutischen Mitteln wäre es allerdings wünschenswert, der Hauptursache, nämlich die Fettleibigkeit, vorzubeugen und dadurch Folgesymptome zu verhindern.

4.5 Glukosetoleranz und Insulinsensitivität

Obwohl *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse sehr gut mit einer künstlich erhöhten Blutglukose umgehen und diese ähnlich wie Wildtypen zügig senken können, ist ihre Insulinsensitivität vergleichbar schlecht wie die der *Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}*- und *Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}*-Mäuse. Möglicherweise liegt dies an bereits stark erhöhten Insulinwerten im Blut, wodurch eine Reaktion auf die Insulininjektion im ITT nicht messbar ist.

Die Normalisierung der Glukosetoleranz kann unabhängig von einer Insulinresistenz entstehen. Die Insulin-unabhängige Reduktion der Blutglukose, auch Glukose-Effektivität genannt, hat einen zur Insulin-abhängigen gleichwertigen Beitrag zur Glukosetoleranz. Hierbei ist die Glukose selbst der Auslöser für die Senkung des Blutglukosespiegels (Best, *et al.*, 1996). In Leptin-defizienten Mäusen konnte bereits eine dramatisch reduzierte Glukose-Effektivität festgestellt werden (Alonso, *et al.*, 2012), die durch Administration von *fibroblast growth factor* (FGF)19 normalisiert werden kann (Morton, *et al.*, 2013). 2004 wurde gezeigt, dass die Behandlung mit FGF19 in Leptin-defizienten Mäusen zu einer erhöhten Stoffwechselrate und reduziertem Körpergewicht führt (Fu, *et al.*, 2004). Auch transgene Mäuse, die humanes *FGF19* exprimieren, zeigen einen solchen Effekt (Tomlinson, *et al.*, 2002). Der genaue Mechanismus, über den FGF19 diese Funktion ausübt, ist bisher noch

nicht bekannt. Verschiedene Analysen zeigen jedoch, dass die Aktivität von FGF19 im Gehirn eine tragende Rolle spielt (Morton, *et al.*, 2013).

Die Insulin-unabhängige Glukoseaufnahme wird im zentralen Nervensystem (ZNS) durch die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT3, in der Leber und im Pankreas hauptsächlich durch GLUT2 realisiert.

Die Steigerung der Insulin-unabhängigen Glukoseaufnahme könnte in den $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen eine Erklärung für die Diskrepanz zur Insulinresistenz geben. Diese wäre aber noch genauer zu untersuchen. Die Menge und Funktion vom Insulin-unabhängigen Glukosetransport sowie u.a. die *Fgf19*-Expression im Gehirn von $Fto^{-/-}$ -Mäusen wären mögliche Ansatzpunkte für weitere Analysen.

4.6 $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse weisen eine erhöhte Sterberate auf

Bei der Genotypisierung im Alter von drei Wochen wurde festgestellt, dass die Genotypenverteilung unter den Nachkommen der C57BL/6J $Lep^{ob/+};Fto^{+/-}$ -Verpaarungen signifikant verändert war (siehe Tabelle 3.1). Dabei fiel auf, dass $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Männchen am wenigsten vertreten waren. Zwar wurde die Genotypenverteilungen nicht in Embryonalstudien untersucht, aber es konnte bereits in einer konstitutiven FTO-negativen Mauslinie gezeigt werden, dass es embryonal keine Abweichung von der nach Mendel erwarteten Genotypenverteilung gab (Jäger, 2013). Die erhöhte postnatale Sterberate von $Fto^{-/-}$ -Tieren wurde auch in weiteren Studien in Verbindung mit einer Größenretardation der Tiere (Fischer, *et al.*, 2009, Gao, *et al.*, 2010, McMurray, *et al.*, 2013) festgestellt. Partielle oder adult-konstitutive FTO-Defizienzen, die nicht zu einer Größenretardation führen, weisen keine erhöhte postnatale Sterberate auf (Church, *et al.*, 2009, McMurray, *et al.*, 2013). Es wäre denkbar, dass FTO-defiziente Tiere aufgrund ihrer Wachstumsretardation benachteiligt sind und von ihren größeren Geschwistern von der Nahrungsquelle, also dem Muttertier, verdrängt werden. Gerade unter den extrem hungrigen $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Geschwistern könnte verstärkt Futterneid herrschen. Dagegen spricht allerdings, dass zwischen der dritten und 16 Lebenswoche weitere männliche $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Tiere sterben. In dieser Zeit sind die Tiere bereits abgesetzt und nicht mehr auf das Muttertier als Nahrungsquelle

angewiesen. Sie sitzen in kleinen Gruppen in Käfigen und die Wahrscheinlichkeit, dass sie nicht an Futter herankommen, ist sehr gering. Ein weiteres Gegenargument ist die Tatsache, dass auf einem anderen genetischen Hintergrund (C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund) keine signifikanten Veränderungen in der Genotypenverteilung auftreten (siehe Tabelle 3.2). Somit wäre eine andere Theorie, dass FTO eine Rolle im Stoffwechsel spielt, die, wenn eine Fehlregulation durch FTO-Defizienz stattfindet, in einigen Fällen zum Tode führt. Aufgrund der Tatsache, dass FTO auf molekularer Ebene noch keine eindeutige Funktion zugewiesen werden konnte, ist es schwierig, die genaue Todesursache der Tiere zu ermitteln. Es gibt Hinweise auf Lungenfehlfunktionen und Störungen in der Gliedmaßenentwicklung der *Fto*^{-/-}-Tiere. Diese konnten bisher aber noch nicht näher aufgeklärt werden. (Jäger, 2013).

4.7 Der Einfluss verschiedener genetischer Hintergründe

1973 bewies eine Studie, dass die metabolischen Störungen, die durch die Leptin-Defizienz hervorgerufen werden, abhängig vom genetischen Hintergrund der Maus, unterschiedliche Ausmaße annehmen können (Coleman und Hummel, 1973). So waren Leptin-defiziente Mäuse auf einem C57BL/6J-Hintergrund Zeit ihres Lebens hyperinsulinemisch und nahmen immer mehr zu, wurden aber nicht diabetisch. Leptin-defiziente Mäuse auf einem C57BL/KsJ-Hintergrund hingegen waren hyperglykämisch und nahmen ab dem dritten Lebensmonat kaum noch an Gewicht zu. Viele starben noch vor dem sechsten Lebensmonat.

Während der Mausearbeiten für diese Arbeit fiel auf, dass Leptin-defiziente Mäuse auf dem C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund in fortgeschrittenem Alter von einigen Monaten Anzeichen von Diabetes zeigten. Analysen des Glukoseanteils im Urin der Tiere zeigten eine extreme Glukosurie in Leptin-defizienten Mäusen des Mischhintergrundes. Diese Auffälligkeiten lassen darauf schließen, dass das Einkreuzen des NMRI-Hintergrundes Einfluss auf die Auswirkungen der Leptin-Defizienz hat. Die Tiere haben im Alter scheinbar verstärkt metabolische Fehlfunktionen. Interessanterweise wird dies durch die Inaktivierung von *Fto* völlig aufgehoben.

Auch für andere Mausmodelle ist der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Auswirkungen von Genmanipulationen bekannt (Wolfer, *et al.*, 2002).

In ihrer Dissertation konnte Yvonne Jäger bereits zeigen, dass die präaxiale Polydaktylie und die erhöhte postnatale Letalität von $Fto^{-/-}$ -Mäuse abhängig von ihrem jeweiligen genetischen Hintergrund ist (Jäger, 2013). Analysen der kombinierten Mausmutanten in dieser Arbeit ergaben ebenfalls, dass $Fto^{-/-}$ -Tiere unabhängig vom Lep -Genotyp auf C57BL/6J-Hintergrund unterrepräsentiert sind (siehe Tabelle 3.1). Dies ist auf einem genetischen Mischhintergrund von C57BL/6J und NMRI nicht mehr zu sehen. Lediglich $Lep^{ob/+};Fto^{-/-}$ -Männchen sind unterrepräsentiert. Dies ist auch für männliche Wildtypen der Fall und liegt höchstwahrscheinlich an der zu geringen Anzahl der ausgewerteten Würfen.

Sowohl der Effekt des FTO-Verlustes als auch der des Leptin-Verlustes werden also durch den genetischen Hintergrund der Mäuse beeinflusst. Welche genetischen Variationen bzw. welche Proteininteraktionen diese Unterschiede hervorrufen, wäre eine weitere interessante Frage.

4.8 Geschlechtsspezifische Unterschiede

In der vorliegenden Arbeit wurde der Haupt-Fokus auf die Analyse weiblicher Mäuse gelegt. Der Grund dafür ist, dass in der zunächst betrachteten C57BL/6J-Linie nur eine sehr geringe Anzahl an männlichen $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Nachkommen auftrat. In den einzelnen Analysen ist die Standardabweichung aufgrund der geringen Tierzahl sehr hoch. Eine zu geringe Menge zu untersuchender Tiere erschwert die statistische Auswertung einiger Parameter. Dennoch wurden bei der phänotypischen Analyse von $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen auch etwaige Unterschiede zwischen den Geschlechtern beobachtet.

Besonders deutlich ist der Geschlechterunterschied bei der Betrachtung der Fettdepots (Vgl. Abbildungen 3.2 c und 8.3 e). Während $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Weibchen sogar mehr epigonadales Fett haben als Leptin-defiziente Weibchen mit FTO, zeigen männliche Mäuse in allen vier Genotypen keine Unterschiede. Da das epigonadale Fett zum großen Teil eine Frucht-schützende Funktion hat, ist ein geschlechtsspezifischer Unterschied nicht verwunderlich. Eine Gewichtsabnahme

wird zuerst in anderen Fettdepots stattfinden und bei Zunahme ist dies eines der ersten Einlagerungsorte für Fett.

Ein Vergleich der Gewichtskurven der weiblichen und männlichen Tiere (Vgl. Abbildungen 3.1a und 8.1a) zeigt ebenfalls klare Unterschiede. Während weibliche *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse im Alter von 15 Wochen signifikant schwerer sind als Wildtypen, zeigen männliche Mäuse dieser beiden Genotypen im Alter von 16 Wochen noch keinerlei Unterschiede. Der Grad des Effektes einer *Fto*-Inaktivierung ist also scheinbar in männlichen Tieren stärker als in weiblichen.

Für geschlechtsspezifische Auswirkungen von Fettleibigkeitsgenen gibt es einige Beispiele. Naveilhan und Kollegen konnten zeigen, dass die Entfernung eines NPY-Rezeptors in Leptin-defizienten Mäusen nur in den Weibchen zu einer Gewichtsreduktion führt, während in Männchen keine Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung festzustellen sind (Naveilhan, *et al.*, 2002). Mäuse, die heterozygot für *Insulin-like growth factor 1*-Rezeptor (*Igf1r^{+/-}*) sind, weisen ebenfalls geschlechtsspezifische Unterschiede auf. Während weibliche *Igf1r^{+/-}*-Mäuse signifikant mehr Gewicht zunehmen als wildtypische, wenn sie mit einer HFD gefüttert werden, zeigen männliche Mäuse dieser Genotypen keine Unterschiede (Garg, *et al.*, 2011). Auch Analysen der *Fto^{-/-}*-Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtypen und *Fto^{+/-}*-Mäusen eine stärkere Gewichts- und Fettreduktion in Männchen als in Weibchen (Fischer, *et al.*, 2009).

Auffällig ist auch die Sterberate der *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäuse. In beiden Geschlechtern ist diese erhöht, allerdings ist die Überlebensrate der Männchen noch geringer als die der Weibchen. Auch dieses deutet auf einen geschlechtsspezifischen Grad des Einflusses von FTO-Defizienz hin.

4.9 Molekulare Grundlagen

Über die genaue Funktion von FTO auf molekularer Ebene ist bisher nicht viel bekannt. *In silico*-Analysen des hochkonservierten N-Terminus von FTO zeigten Ähnlichkeiten mit Sequenzen der Alpha-Ketoglutarat-abhängigen Dioxigenase AlkB aus *E.coli* sowie deren Homologen AlkBH2 und AlkBH3 in Säugern (Gerken, *et al.*, 2007, Sanchez-Pulido und Andrade-Navarro, 2007). Diese Dioxigenasen haben ihre

Funktion in der Reparatur von DNA und RNA durch oxidative Demethylierung. Hierbei bevorzugen sie unterschiedliche Substrate. Während z.B. AlkBH2 hauptsächlich doppelsträngige DNA als Substrat nutzt, präferiert AlkBH3 eher einzelsträngige DNA und RNA (Aas, *et al.*, 2003). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass FTO in der Lage ist, m³T in einzelsträngiger DNA sowie m³U und m⁶A in RNA zu demethylieren (Jia, *et al.*, 2008, Jia, *et al.*, 2012). Erst kürzlich wurde *in vitro* nachgewiesen, dass die Wachstumsrate von *Fto*^{-/-}-MEFs im Vergleich zu der wildtypischer MEFs dramatisch reduziert ist. Ebenso konnte in FTO-defizienten Zellen eine geringere Translationsrate der mRNA gemessen werden als in wildtypischen Zellen (Gulati, *et al.*, 2013). Die RNA-Epigenetik ist ein relativ junges Forschungsfeld, dennoch wird ihr eine elementare Rolle in der Genregulation und damit an unzähligen zellulären Prozessen in Entwicklung und Differenzierung von Säugetieren zugeordnet (He, 2010, Dominissini, *et al.*, 2012, Tuorto, *et al.*, 2012). Vergleichsanalysen zwischen wildtypischen und *Fto*^{-/-}-Mäusen enthüllten, dass die Wirkung von FTO nicht alle m⁶A-modifizierten mRNAs betrifft, sondern lediglich einen ausgewählten Teil mit distinkten biologischen Funktionen, wie der neuronalen Signaltransduktion (Hess, *et al.*, 2013). Mögliche epigenetische Unterschiede in Mäusen verschiedener genetischer Hintergründe würden einen unterschiedlichen Grad der Wirkung von FTO erklären. Es konnten in Mäusen mit verschiedenen genetischen Hintergründen z.B. eine unterschiedliche postnatale Letalitätsrate und teilweise präaxiale Polydaktylie beobachtet werden (Vgl. Tabellen 3.1 und 3.2) (Jäger, 2013).

Weiterhin wurden Interaktionen von FTO mit verschiedenen Proteinen der AARS-Familie demonstriert, die eine Rolle im mTORC1-Signalweg spielen (Bonfils, *et al.*, 2012, Han, *et al.*, 2012). mTORC1-Signale haben sehr vielfältige Funktionen, wie die Kontrolle des Zellwachstums, die Energie-Homöostase, die Stimulation der Proteinsynthese und die Inhibierung von Autophagie (Cota, *et al.*, 2006, Ma und Blenis, 2009, Vadlakonda, *et al.*, 2013). Im Hypothalamus, dem Gewebe mit der stärksten *Fto*-Expression (Gerken, *et al.*, 2007, Stratigopoulos, *et al.*, 2008), reguliert mTOR die Nahrungsaufnahme (Cota, *et al.*, 2006). mTOR aktiviert u.a. die S6Kinase (S6K), die wiederum eine regulierende Rolle bei der RNA-Translation spielt (Magnuson, *et al.*, 2012). In *Fto*^{-/-}-Zellen konnte eine reduzierte Aktivität von S6K nachgewiesen werden (Gulati, *et al.*, 2013). Dies darauf hin, dass FTO eine Funktion im mTORC-Signalweg und damit im Zellmetabolismus hat. Leptin-defiziente Mäuse

und Mäuse, die mit einer HFD gefüttert wurden, zeigen im Gegenzug eine gesteigerte mTOR/S6K-Aktivierung (Lee, *et al.*, 2008). Die Reduzierung verschiedener Symptome des metabolischen Syndroms in *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäusen könnte also durchaus auf die verminderte Aktivierung des mTOR/S6K-Signalweges zurückzuführen sein. Für eine Bestätigung dieser Theorie müssten verschiedene Zielgene und Komponenten des Signalwegs untersucht werden.

4.10 Resümee

Die Ergebnisse der durchgeführten Analysen zeigen auf, dass FTO-Defizienz nicht nur einen protektiven Einfluss auf die Entstehung von Fettleibigkeit, sondern auch auf das metabolische Syndrom hat. Daher kann festgestellt werden, dass das Protein eine bedeutende Rolle in der Entstehung dieser Erkrankung spielt. Diese Erkenntnis trägt dazu bei, die Wirkung von FTO zu verstehen und bestärkt die bisherigen Vermutungen, dass es ein interessantes Ziel für therapeutische Maßnahmen bieten könnte.

4.11 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden phänotypische und metabolische Auswirkungen einer Inaktivierung des *Fto*-Gens in Leptin-defizienten Mäusen untersucht. Die Ergebnisse der Analysen geben klare Hinweise darauf, dass FTO eine relevante Rolle in der Entwicklung des metabolischen Syndroms spielt.

Die molekularen Mechanismen, über die FTO wirkt, sind weitgehend unbekannt und zur Aufklärung, wie genau FTO seine Funktion bei der Entstehung des metabolischen Syndroms realisiert, sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.11.1 Glukosemetabolismus

Eine genauere Betrachtung der Glukose- bzw. Insulinreaktion ist ein wichtiger Ansatzpunkt, um den Effekt von FTO näher beschreiben zu können. Hierzu könnte zunächst die Glukose-Effizienz in *Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}*-Mäusen analysiert werden. Eine mögliche Funktion des FTO-Proteins liegt in der Insulin-unabhängigen Glukoseaufnahme. Des Weiteren müsste auch die Insulinresistenz in den Tieren genauer untersucht werden. Eine sensiblere Methode als der ITT wäre hierbei eine sog. *Clamp*-Analyse, bei der die Insulinsensitivität mit Hilfe einer konstanten Insulininfusion bestimmt wird. Möglich wäre auch die Isolation der Langerhans'schen Inseln aus dem Pankreas und die Bestimmung der Insulinsekretion. Zusätzlich sind Analysen der Insulinspiegel im Blut jüngerer Mäuse hilfreich, um den Zeitpunkt zu bestimmen, ab dem sich die Insulinreaktion verändert.

4.11.2 Analyse des Stoffwechsels

Die bisherigen Ergebnisse der Stoffwechselanalysen lassen ebenfalls noch Fragen offen. Zum einen wäre es wichtig, die Nahrungsaufnahme der Tiere nochmals mit Hilfe einer weiteren Methode zu bestätigen, um Faktoren wie Stress in unbekannter Umgebung und mögliche Schwierigkeiten mit den Futterbehältern, auszuschließen. Des Weiteren wären Untersuchungen der Ausscheidungen der Tiere interessant. Zusammensetzungen von Kot und Urin können Aufschluss über die Menge der

verstoffwechselten Nährstoffe geben und mögliche Veränderungen im Metabolismus der Tiere aufzeigen.

4.11.3 Gewebespezifische Funktionsanalysen von FTO

Fto wird ubiquitär in unterschiedlichsten Zelltypen exprimiert und FTO-Defizienz hat in Mäusen verschiedenste Auswirkungen (Fischer, *et al.*, 2009). Für die Klärung der molekularen Mechanismen von FTO in Bezug auf die Entstehung des metabolischen Syndroms ist es wichtig, die Haupt-Wirkungsorte des Proteins zu kennen und zu verstehen. Bisherige Analysen deuten darauf hin, dass FTO eine wichtige Funktion im Hypothalamus hat. Dieser spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme. Gao und Kollegen zeigen mit Hilfe einer neuralspezifischen Inaktivierung von *Fto*, dass diese Auswirkungen auf das Größenwachstum hat. Allerdings ist die Fettmasse der Tiere im Vergleich zu Wildtypen erhöht (Gao, *et al.*, 2010). Ein Verlust von FTO im Hypothalamus von adulten Mäusen führt lediglich zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme der Tiere (McMurray, *et al.*, 2013). Interessant wäre eine Hypothalamus-spezifische Inaktivierung des *Fto*-Gens im juvenilen Alter. Diese könnte Aufschluss darüber geben, ob die neuralspezifische Wirkung von FTO in Bezug auf das metabolische Syndrom hauptsächlich dort stattfindet.

Weiterhin könnte eine spezifische Geninaktivierung im weißen Fettgewebe nähere Erklärungen für die Reduzierung der Fettmasse in konstitutiven *Fto*^{-/-}-Mäusen liefern sowie Veränderungen im Glukosemetabolismus aufklären.

4.11.4 Klinische Aspekte

In dieser Arbeit konnte eine Relevanz des FTO-Proteins in der Entwicklung des metabolischen Syndroms gezeigt werden. In GWAS wurden sog. Risiko-Varianten des *FTO*-Gens mit Fettleibigkeit und, mit Einschränkungen, auch mit dem metabolischen Syndrom in Verbindung gebracht. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt sich nun die Frage, ob FTO einen Angriffspunkt für mögliche therapeutische oder sogar präventive Maßnahmen darstellt.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt die Inhibierung der Demethylase-Aktivität von FTO durch ein in der traditionellen chinesischen Medizin gebräuchliches Naturprodukt namens Rhein (Chen, *et al.*, 2012). Rhein bindet die katalytische

Domäne des FTO-Proteins und verhindert die Demethylierung von m⁶A in einzelsträngiger RNA.

In einer weiteren Studie wurden kleine Moleküle vorgestellt, die in klinischen Studien für die Hemmung von 2-OG-Oxygenasen verwendet werden. Überprüfungen der einzelnen Moleküle deckten weitere FTO-Inhibitoren auf (Aik, *et al.*, 2013). Die inhibitorischen Effekte beruhen ebenfalls auf der Blockierung der Demethylase-Aktivität von FTO.

Die bisherigen Erkenntnisse über die Funktion von FTO deuten auf die Demethylase-Aktivität als Schlüsselfunktion und damit als Angriffspunkt für therapeutische Schritte hin. Weitere molekulare Mechanismen des Proteins sind bisher nicht bekannt, können aber nicht ausgeschlossen werden. Für die Entwicklung einer medikamentösen Behandlung des metabolischen Syndroms, die auf die Funktion von FTO abzielt, ist es zwingend notwendig alle Wirkmechanismen aufzudecken und Nebenwirkungen zu identifizieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das metabolische Syndrom ist ein weltweit immer häufiger auftretendes gesundheitliches Problem, das hauptsächlich von Adipositas ausgelöst wird. FTO-Defizienz führt in Mäusen zu einer Reduktion des Körpergewichts und der Fettmasse. Allerdings wurde gezeigt, dass FTO-Defizienz in Mäusen postnatal nicht nur vor Fettleibigkeit schützt, sondern auch zu einer Wachstumsretardation führt (Fischer, *et al.*, 2009). Die genaue Funktion des FTO-Proteins ist dabei weitgehend unbekannt. Leptin-defiziente ($Lep^{ob/ob}$)-Mäuse sind ein etabliertes Modell zur Untersuchung des metabolischen Syndroms (Lindström, 2007). Zur Analyse der Funktion von FTO in der Entwicklung des metabolischen Syndroms wurden $Lep^{ob/ob}$ -Mäuse verschiedener *Fto*-Genotypen ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$) sowie wildtypische Geschwister untersucht. Die Analysen zeigen, dass, bis auf die Insulinsensitivität, alle analysierten Parameter des metabolischen Syndroms von FTO beeinflusst werden: Nach FTO-Verlust ist die Fettleibigkeit Leptin-negativer Mäuse reduziert und die Tiere sind vor Hyperphagie und Leberverfettung geschützt. Auch die für Leptin-defiziente Mäuse typische Hyperglykämie bzw. Glukoseintoleranz ist in $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen signifikant verbessert. FTO ist demnach ein relevanter Faktor bei der Entstehung des metabolischen Syndroms. Zudem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass FTO-Defizienz in Mäusen auf einem C57BL/6J-Hintergrund zu einer erhöhten Sterblichkeitsrate führt. In männlichen $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen ist diese nochmals erhöht, was auf eine geschlechtsabhängige Wirkungsweise des FTO-Proteins schließen lässt. Auf einem gemischten genetischen Hintergrund aus C57BL/6J und NMRI führt FTO-Defizienz nicht zu erhöhter Sterblichkeit. Demnach hat der genetische Hintergrund der Mäuse einen deutlichen Einfluss auf die Funktion von FTO. Die einzig gezeigte Funktion des Proteins ist bisher die Demethylase-Aktivität (Jia, *et al.*, 2008, Jia, *et al.*, 2012, Hess, *et al.*, 2013). FTO könnte daher die Aktivität von Genen regulieren, die eine entscheidende Rolle im Metabolismus spielen und demnach einen interessanten Therapieansatz für das metabolische Syndrom darstellen.

ABSTRACT

The metabolic syndrome is a worldwide increasing health problem mainly caused by obesity. FTO deficiency in mice results in a significant reduction of body weight and fat mass. However, studies showed that FTO deficiency does not only protect from obesity, but also leads to postnatal growth reduction in mice (Fischer, *et al.*, 2009). Thereby, the precise function of the FTO protein remains largely unclear. Leptin-deficient ($Lep^{ob/ob}$) mice are a well-characterized model for analyzing the metabolic syndrome (Lindström, 2007). To investigate the function of FTO during the development of the metabolic syndrome $Lep^{ob/ob}$ mice with different *Fto* genotypes ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$) as well as wild type littermates have been analyzed. The study shows that all analyzed hallmarks of the metabolic syndrome, except the insulin response, are influenced by FTO: deficiency of the FTO protein reduces obesity in Leptin deficient mice and protects the animals from hyperphagia and ectopic fat accumulation in the liver. Hyperglycemia and impaired glucose tolerance, which is typical for leptin-deficient mice, are significantly corrected in $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ mice. Thus, FTO is a relevant factor in the development of the metabolic syndrome. Additionally, this study shows that FTO-deficiency in mice on a C57BL/6J background leads to increased postnatal lethality. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ male mice show an even higher lethality rate, which suggests a gender-specific function of the FTO protein. FTO-deficient mice on a genetically mixed background (C57BL/6J/NMRI) did not show an increased postnatal lethality. Thus, there seems to be a clear influence of the genetic background of mice on the function of FTO. The only function, which has been shown for FTO is a demethylase activity (Jia, *et al.*, 2008, Jia, *et al.*, 2012, Hess, *et al.*, 2013). According to that, FTO might regulate the activity of genes, which play an important role in metabolic processes and therefore represent an interesting target for therapeutic methods against the metabolic syndrome.

6 ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

6.1 Abkürzungen

3meT	3-Methyl-Thymin
3meU	3-Methyl-Uracil
6meA	N ⁶ -Methyl-Adenosin
A	
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AgRP	Agouti-Related Protein
ARC	<i>Nucleus arcuatus</i>
ATP	Adenosintriphosphat
autoklav.	autoklaviert
B	
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BMP7	<i>bone morphogenetic protein 7</i>
bzw.	beziehungsweise
C	
ca.	circa
CART	Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	
DAG	Deutsche Adipositas-Gesellschaft
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
demin.	demineralisiert
dest.	destilliert
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
E	
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere
epig.	epigonadal
et al.	<i>et alteri</i> , und andere
EtBr	Ethidiumbromid
F	
FFM	fettfreie Körpermasse
FM	Fettmasse
FOXO	<i>Forkhead box class O</i>
<i>Ft</i>	<i>Fused-toes</i> Gen
FTO	<i>Fat mass and obesity associated</i> (Protein)
<i>Fto</i>	<i>Fat mass and obesity associated</i> (Gen)
<i>fwd.</i>	<i>forward</i>
G	
Ges.	gesamt
gg.	gegen
GLUT	Glukosetransporter
gp	<i>guinea pig</i>
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GTT	Glukose-Toleranz-Test
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
H	
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HFD	<i>High fat diet</i>
I	
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
ing.	inguinal
i.p.	intraperitoneal
Irf9	<i>interferon regulatory factor 9</i>
IRS	Insulin Rezeptor Substrat

ITT	Insulin-Toleranz-Test
L	
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
Lep	Leptin
<i>Lep</i>	Leptin-Gen
Lsg.	Lösung
M	
MEFs	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
min	Minute(n)
mTORC1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
N	
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NC	<i>Normal Chow</i>
NPY	Neuropeptid Y
NVZII	Nationale Verzehrstudie 2
O	
O ₂	Sauerstoff
Ob	<i>obese</i> Mutation, Mutation im Leptin Gen
Ob-R	Leptin-Rezeptor
OG	Oxoglutarat
P	
p-Wert	Signifikanzwert
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBST	PBS mit Tween 20
PBT	PBS mit Triton-X-100
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-3,4-Diphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat

PKB	Proteinkinase B
POMC	Proopiomelanocortin
ProtK	Proteinase K
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
R	
rev.	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
S	
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek.	Sekunde(n)
SEM	Standard Error of the Mean
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
T	
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	
Vgl.	Vergleich
W	
W	Woche(n)
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WHR	<i>Waist-Hip Ratio</i>
X	
-X	-fach/-mal
Z	
z.B.	zum Beispiel

6.2 Einheiten

dl	Deziliter
g	Gramm
h	Stunde(n)
kD	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Molar
Mb	Megabase(n)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
sek	Sekunde(n)
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen auf Volumen (engl.: <i>volume per volume</i>)
W	Woche(n)
w/v	Gewicht auf Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)
%	Prozent
°C	Grad Celsius

7 LITERATUR

Aas, P. A., Otterlei, M., Falnes, P. O., Vagbo, C. B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E., Krokan, H. E., 2003. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*. 421, 859-863.

Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., Flier, J. S., 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 382, 250-252.

Aik, W., Demetriades, M., Hamdan, M. K., Bagg, E. A., Yeoh, K. K., Lejeune, C., Zhang, Z., McDonough, M. A., Schofield, C. J., 2013. Structural Basis for Inhibition of the Fat Mass and Obesity Associated Protein (FTO). *J Med Chem*. 56, 3680-3688.

Al-Attar, S. A., Pollex, R. L., Ban, M. R., Young, T. K., Bjerregaard, P., Anand, S. S., Yusuf, S., Zinman, B., Harris, S. B., Hanley, A. J., Connelly, P. W., Huff, M. W., Hegele, R. A., 2008. Association between the FTO rs9939609 polymorphism and the metabolic syndrome in a non-Caucasian multi-ethnic sample. *Cardiovasc Diabetol*. 7, 5.

Alberti, K. G., Zimmet, P., Shaw, J., 2005. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 366, 1059-1062.

Alberti, K. G., Zimmet, P. Z., 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 15, 539-553.

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2001. Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. *Wiley-VCH*. 2. Aufl.

Alonso, L. C., Watanabe, Y., Stefanovski, D., Lee, E. J., Singamsetty, S., Romano, L. C., Zou, B., Garcia-Ocana, A., Bergman, R. N., O'Donnell, C. P., 2012. Simultaneous measurement of insulin sensitivity, insulin secretion, and the disposition index in conscious unhandled mice. *Obesity (Silver Spring)*. 20, 1403-1412.

- Andreasen, C. H., Stender-Petersen, K. L., Mogensen, M. S., Torekov, S. S., Wegner, L., Andersen, G., Nielsen, A. L., Albrechtsen, A., Borch-Johnsen, K., Rasmussen, S. S., Clausen, J. O., Sandbaek, A., Lauritzen, T., Hansen, L., Jorgensen, T., Pedersen, O., Hansen, T., 2008.** Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes*. 57, 95-101.
- Bailey, C. J., 2011.** Renal glucose reabsorption inhibitors to treat diabetes. *Trends Pharmacol Sci*. 32, 63-71.
- Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S. M., Lee, C. E., Tang, V., Kenny, C. D., McGovern, R. A., Chua, S. C., Jr., Elmquist, J. K., Lowell, B. B., 2004.** Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron*. 42, 983-991.
- Bates, S. H., Kulkarni, R. N., Seifert, M., Myers, M. G., Jr., 2005.** Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis. *Cell Metab*. 1, 169-178.
- Bates, S. H., Stearns, W. H., Dundon, T. A., Schubert, M., Tso, A. W., Wang, Y., Banks, A. S., Lavery, H. J., Haq, A. K., Maratos-Flier, E., Neel, B. G., Schwartz, M. W., Myers, M. G., Jr., 2003.** STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*. 421, 856-859.
- Batzoglou, S., Pachter, L., Mesirov, J. P., Berger, B., Lander, E. S., 2000.** Human and mouse gene structure: comparative analysis and application to exon prediction. *Genome Res*. 10, 950-958.
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., Vigneri, R., 2009.** Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev*. 30, 586-623.
- Bell, G. I., Kayano, T., Buse, J. B., Burant, C. F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H., Seino, S., 1990.** Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*. 13, 198-208.

- Best, J. D., Kahn, S. E., Ader, M., Watanabe, R. M., Ni, T. C., Bergman, R. N., 1996.** Role of glucose effectiveness in the determination of glucose tolerance. *Diabetes Care*. 19, 1018-1030.
- Bleisch, V. R., Mayer, J., Dickie, M. M., 1952.** Familial diabetes mellitus in mice, associated with insulin resistance, obesity, and hyperplasia of the islands of langerhans. *Am J Pathol*. 28, 369-385.
- Bonfils, G., Jaquenoud, M., Bontron, S., Ostrowicz, C., Ungermann, C., De Virgilio, C., 2012.** Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Mol Cell*. 46, 105-110.
- Bonner-Weir, S., 2000.** Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab*. 11, 375-378.
- Bouwens, L., Rooman, I., 2005.** Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev*. 85, 1255-1270.
- Brunkwall, L., Ericson, U., Hellstrand, S., Gullberg, B., Orho-Melander, M., Sonestedt, E., 2013.** Genetic variation in the fat mass and obesity-associated gene (FTO) in association with food preferences in healthy adults. *Food Nutr Res*. 57, 20028.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., 2003.** Biologie. *Spektrum* 6. Aufl.
- Cecil, J. E., Tavendale, R., Watt, P., Hetherington, M. M., Palmer, C. N., 2008.** An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med*. 359, 2558-2566.
- Chakraborty, A., Koldobskiy, M. A., Bello, N. T., Maxwell, M., Potter, J. J., Juluri, K. R., Maag, D., Kim, S., Huang, A. S., Dailey, M. J., Saleh, M., Snowman, A. M., Moran, T. H., Mezey, E., Snyder, S. H., 2010.** Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain. *Cell*. 143, 897-910.
- Chen, B., Ye, F., Yu, L., Jia, G., Huang, X., Zhang, X., Peng, S., Chen, K., Wang, M., Gong, S., Zhang, R., Yin, J., Li, H., Yang, Y., Liu, H., Zhang, J., Zhang, H., Zhang, A., Jiang, H., Luo, C., et al., 2012.** Development of cell-active N6-

methyladenosine RNA demethylase FTO inhibitor. *J Am Chem Soc.* 134, 17963-17971.

Cheng, Z., White, M. F., 2011. Targeting Forkhead box O1 from the concept to metabolic diseases: lessons from mouse models. *Antioxid Redox Signal.* 14, 649-661.

Cheung, M. K., Gulati, P., O'Rahilly, S., Yeo, G. S., 2012. FTO expression is regulated by availability of essential amino acids. *Int J Obes (Lond).* 37, 744-747.

Church, C., Lee, S., Bagg, E. A., McTaggart, J. S., Deacon, R., Gerken, T., Lee, A., Moir, L., Mecinovic, J., Quwailid, M. M., Schofield, C. J., Ashcroft, F. M., Cox, R. D., 2009. A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PLoS Genet.* 5, e1000599.

Church, C., Moir, L., McMurray, F., Girard, C., Banks, G. T., Teboul, L., Wells, S., Bruning, J. C., Nolan, P. M., Ashcroft, F. M., Cox, R. D., 2010. Overexpression of *Fto* leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet.* 42, 1086-1092.

Coleman, D. L., Hummel, K. P., 1973. The influence of genetic background on the expression of the obese (*Ob*) gene in the mouse. *Diabetologia.* 9, 287-293.

Cornes, B. K., Lind, P. A., Medland, S. E., Montgomery, G. W., Nyholt, D. R., Martin, N. G., 2009. Replication of the association of common rs9939609 variant of FTO with increased BMI in an Australian adult twin population but no evidence for gene by environment (G x E) interaction. *Int J Obes (Lond).* 33, 75-79.

Cota, D., Proulx, K., Smith, K. A., Kozma, S. C., Thomas, G., Woods, S. C., Seeley, R. J., 2006. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science.* 312, 927-930.

de Luis, D. A., Aller, R., Conde, R., Izaola, O., de la Fuente, B., Sagrado, M. G., 2013. Relation of the rs9939609 gene variant in FTO with metabolic syndrome in obese female patients. *J Diabetes Complications.* 27, 346-350.

Dibble, C. C., Manning, B. D., 2013. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat Cell Biol.* 15, 555-564.

Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Korner, A., Jacobson, P., Carlsson, L. M., Kiess, W., Vatin, V., Lecoeur, C., Delplanque, J., Vaillant, E., Pattou, F., Ruiz, J., Weill, J., Levy-Marchal, C., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Le Stunff, C., *et al.*, 2007. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet.* 39, 724-726.

Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., Rechavi, G., 2012. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature.* 485, 201-206.

Duggirala, R., Stern, M. P., Mitchell, B. D., Reinhart, L. J., Shipman, P. A., Uresandi, O. C., Chung, W. K., Leibel, R. L., Hales, C. N., O'Connell, P., Blangero, J., 1996. Quantitative variation in obesity-related traits and insulin precursors linked to the OB gene region on human chromosome 7. *Am J Hum Genet.* 59, 694-703.

Dwivedi, O. P., Tabassum, R., Chauhan, G., Ghosh, S., Marwaha, R. K., Tandon, N., Bharadwaj, D., 2012. Common variants of FTO are associated with childhood obesity in a cross-sectional study of 3,126 urban Indian children. *PLoS One.* 7, e47772.

Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., 2005. The metabolic syndrome. *Lancet.* 365, 1415-1428.

Erickson, J. C., Hollopeter, G., Palmiter, R. D., 1996. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science.* 274, 1704-1707.

Farooqi, I. S., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S. A., Perna, F., Fontana, S., Lechler, R. I., DePaoli, A. M., O'Rahilly, S., 2002. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest.* 110, 1093-1103.

Fatima, W., Shahid, A., Imran, M., Manzoor, J., Hasnain, S., Rana, S., Mahmood, S., 2011. Leptin deficiency and leptin gene mutations in obese children from Pakistan. *Int J Pediatr Obes.* 6, 419-427.

Fei, H., Okano, H. J., Li, C., Lee, G. H., Zhao, C., Darnell, R., Friedman, J. M., 1997. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 7001-7005.

Fellmann, L., Nascimento, A. R., Tibirica, E., Bousquet, P., 2013. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacol Ther.* 137, 331-340.

Fischer, J., Koch, L., Emmerling, C., Vierkotten, J., Peters, T., Brüning, J. C., Rüther, U., 2009. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature.* 458, 894-898.

Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A. M., Ness, A. R., Ebrahim, S., Lawlor, D. A., *et al.*, 2007. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 316, 889-894.

Friedman, J. M. H., J. L., 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 395, 763-770.

Fu, L., John, L. M., Adams, S. H., Yu, X. X., Tomlinson, E., Renz, M., Williams, P. M., Soriano, R., Corpuz, R., Moffat, B., Vandlen, R., Simmons, L., Foster, J., Stephan, J. P., Tsai, S. P., Stewart, T. A., 2004. Fibroblast growth factor 19 increases metabolic rate and reverses dietary and leptin-deficient diabetes. *Endocrinology.* 145, 2594-2603.

Gao, X., Shin, Y. H., Li, M., Wang, F., Tong, Q., Zhang, P., 2010. The fat mass and obesity associated gene FTO functions in the brain to regulate postnatal growth in mice. *PLoS One.* 5, e14005.

Garg, N., Thakur, S., McMahan, C. A., Adamo, M. L., 2011. High fat diet induced insulin resistance and glucose intolerance are gender-specific in IGF-1R heterozygous mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 413, 476-480.

Gat-Yablonski, G., Ben-Ari, T., Shtauf, B., Potievsky, O., Moran, O., Eshet, R., Maor, G., Segev, Y., Phillip, M., 2004. Leptin reverses the inhibitory effect of caloric restriction on longitudinal growth. *Endocrinology*. 145, 343-350.

Gavin, J. R., 3rd, Roth, J., Neville, D. M., Jr., de Meyts, P., Buell, D. N., 1974. Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 71, 84-88.

Gepts, W., Christophe, J., Mayer, J., 1960. Pancreatic islets in mice with the obese-hyperglycemic syndrome: lack of effect of carbutamide. *Diabetes*. 9, 63-69.

Gerken, T., Girard, C. A., Tung, Y. C., Webby, C. J., Saudek, V., Hewitson, K. S., Yeo, G. S., McDonough, M. A., Cunliffe, S., McNeill, L. A., Galvanovskis, J., Rorsman, P., Robins, P., Prieur, X., Coll, A. P., Ma, M., Jovanovic, Z., Farooqi, I. S., Sedgwick, B., Barroso, I., et al., 2007. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*. 318, 1469-1472.

Glass, C. K., Olefsky, J. M., 2012. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab*. 15, 635-645.

Grundey, S. M., Hansen, B., Smith, S. C., Jr., Cleeman, J. I., Kahn, R. A., 2004. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24, e19-24.

Gulati, P., Cheung, M. K., Antrobus, R., Church, C. D., Harding, H. P., Tung, Y. C., Rimmington, D., Ma, M., Ron, D., Lehner, P. J., Ashcroft, F. M., Cox, R. D., Coll, A. P., O'Rahilly, S., Yeo, G. S., 2013. Role for the obesity-related FTO gene in the cellular sensing of amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110, 2557-2562.

Han, J. M., Jeong, S. J., Park, M. C., Kim, G., Kwon, N. H., Kim, H. K., Ha, S. H., Ryu, S. H., Kim, S., 2012. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell*. 149, 410-424.

He, C., 2010. Grand challenge commentary: RNA epigenetics? *Nat Chem Biol.* 6, 863-865.

Hess, M. E., Hess, S., Meyer, K. D., Verhagen, L. A., Koch, L., Brönneke, H. S., Dietrich, M. O., Jordan, S. D., Saletore, Y., Elemento, O., Belgardt, B. F., Franz, T., Horvath, T. L., Rüther, U., Jaffrey, S. R., Kloppenburg, P., Brüning, J. C., 2013. The fat mass and obesity associated gene (Fto) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nat Neurosci.* 16, 1042-1048.

Higa, M., Zhou, Y. T., Ravazzola, M., Baetens, D., Orci, L., Unger, R. H., 1999. Troglitazone prevents mitochondrial alterations, beta cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 11513-11518.

Hinney, A., Nguyen, T. T., Scherag, A., Friedel, S., BrÖnner, G., Müller, T. D., Grallert, H., Illig, T., Wichmann, H. E., Rief, W., Schäfer, H., Hebebrand, J., 2007. Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One.* 2, e1361.

Hofker, M., Wijmenga, C., 2009. A supersized list of obesity genes. *Nat Genet.* 41, 139-140.

Holt, R. I. G., Hanley, N. A., 2012. Essential Endocrinology and Diabetes. *Wiley-Blackwell.* 6th Edition.

Hotta, K., Nakata, Y., Matsuo, T., Kamohara, S., Kotani, K., Komatsu, R., Itoh, N., Mineo, I., Wada, J., Masuzaki, H., Yoneda, M., Nakajima, A., Miyazaki, S., Tokunaga, K., Kawamoto, M., Funahashi, T., Hamaguchi, K., Yamada, K., Hanafusa, T., Oikawa, S., et al., 2008. Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J Hum Genet.* 53, 546-553.

Ibba, A., Pilia, S., Zavattari, P., Loche, A., Guzzetti, C., Casini, M. R., Minerba, L., Loche, S., 2013. The role of FTO genotype on eating behavior in obese Sardinian children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 26, 539-544.

Ikels, K., 2009. Wirkung von Fto auf Leptin-defiziente Mäuse. *Diplomarbeit.* Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Ingalls, A. M., Dickie, M. M., Snell, G. D., 1950. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered.* 41, 317-318.

Jager, J., Corcelle, V., Gremeaux, T., Laurent, K., Waget, A., Pages, G., Binetruy, B., Le Marchand-Brustel, Y., Burcelin, R., Bost, F., Tanti, J. F., 2010. Deficiency in the extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) protects leptin-deficient mice from insulin resistance without affecting obesity. *Diabetologia.* 54, 180-189.

Jäger, Y., 2013. Der Verlust von Fto in Mäusen führt zu embryonalen und postnatalen Entwicklungsstörungen, sowie zu neonataler Sterblichkeit. *Dissertation.* Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y. G., He, C., 2012. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol.* 7, 885-887.

Jia, G., Yang, C. G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z., He, C., 2008. Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett.* 582, 3313-3319.

Johnson, A. M., Olefsky, J. M., 2013. The origins and drivers of insulin resistance. *Cell.* 152, 673-684.

Karra, E., O'Daly, O. G., Choudhury, A. I., Yousseif, A., Millership, S., Neary, M. T., Scott, W. R., Chandarana, K., Manning, S., Hess, M. E., Iwakura, H., Akamizu, T., Millet, Q., Gelegen, C., Drew, M. E., Rahman, S., Emmanuel, J. J., Williams, S. C., Ruther, U. U., Bruning, J. C., *et al.*, 2013. A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *J Clin Invest.* 123, 3539-3551.

Kirwan, J. P., del Aguila, L. F., 2003. Insulin signalling, exercise and cellular integrity. *Biochem Soc Trans.* 31, 1281-1285.

Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., Mitchell, R. N., 2007. Robbins Basic Pathology. *Saunders Elsevier.* 8th Edition.

- Lalonde, J., Samson, P., Poulin, S., Deshaies, Y., Richard, D., 2004.** Additive effects of leptin and topiramate in reducing fat deposition in lean and obese ob/ob mice. *Physiol Behav.* 80, 415-420.
- Lanner, J. T., Bruton, J. D., Katz, A., Westerblad, H., 2008.** Ca(2+) and insulin-mediated glucose uptake. *Curr Opin Pharmacol.* 8, 339-345.
- Lee, D. F., Kuo, H. P., Chen, C. T., Wei, Y., Chou, C. K., Hung, J. Y., Yen, C. J., Hung, M. C., 2008.** IKKbeta suppression of TSC1 function links the mTOR pathway with insulin resistance. *Int J Mol Med.* 22, 633-638.
- Lee, Y., Hirose, H., Zhou, Y. T., Esser, V., McGarry, J. D., Unger, R. H., 1997.** Increased lipogenic capacity of the islets of obese rats: a role in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes.* 46, 408-413.
- Licinio, J., Caglayan, S., Ozata, M., Yildiz, B. O., de Miranda, P. B., O'Kirwan, F., Whitby, R., Liang, L., Cohen, P., Bhasin, S., Krauss, R. M., Veldhuis, J. D., Wagner, A. J., DePaoli, A. M., McCann, S. M., Wong, M. L., 2004.** Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 4531-4536.
- Lindström, P., 2007.** The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *ScientificWorldJournal.* 7, 666-685.
- Loos, R. J., 2012.** Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 26, 211-226.
- Lopez-Bermejo, A., Petry, C. J., Diaz, M., Sebastiani, G., de Zegher, F., Dunger, D. B., Ibanez, L., 2008.** The association between the FTO gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 1501-1505.
- Luczynski, W., Zalewski, G., Bossowski, A., 2012.** The association of the FTO rs9939609 polymorphism with obesity and metabolic risk factors for cardiovascular diseases in Polish children. *J Physiol Pharmacol.* 63, 241-248.

Ma, X. M., Blenis, J., 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 307-318.

Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., et al., 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1, 1155-1161.

Magnuson, B., Ekim, B., Fingar, D. C., 2012. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J.* 441, 1-21.

Manning, B. D., 2010. Insulin signaling: inositol phosphates get into the Akt. *Cell.* 143, 861-863.

Mayer, J., Barnett, R. J., 1953. Sensitivity to cold in the hereditary obese-hyperglycemic syndrome of mice. *Yale J Biol Med.* 26, 38-45.

McMurray, F., Church, C. D., Larder, R., Nicholson, G., Wells, S., Teboul, L., Tung, Y. C., Rimmington, D., Bosch, F., Jimenez, V., Yeo, G. S., O'Rahilly, S., Ashcroft, F. M., Coll, A. P., Cox, R. D., 2013. Adult onset global loss of the *fto* gene alters body composition and metabolism in the mouse. *PLoS Genet.* 9, e1003166.

Medina-Gomez, G., Gray, S. L., Yetukuri, L., Shimomura, K., Virtue, S., Campbell, M., Curtis, R. K., Jimenez-Linan, M., Blount, M., Yeo, G. S., Lopez, M., Seppanen-Laakso, T., Ashcroft, F. M., Oresic, M., Vidal-Puig, A., 2007. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet.* 3, e64.

Mizuno, T. M., Kelley, K. A., Pasinetti, G. M., Roberts, J. L., Mobbs, C. V., 2003. Transgenic neuronal expression of proopiomelanocortin attenuates hyperphagic response to fasting and reverses metabolic impairments in leptin-deficient obese mice. *Diabetes.* 52, 2675-2683.

Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Digby, J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., Cheetham, C. H., Earley, A. R., Barnett, A. H., Prins, J. B., O'Rahilly, S., 1997. Congenital leptin

deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 387, 903-908.

Morton, G. J., Matsen, M. E., Bracy, D. P., Meek, T. H., Nguyen, H. T., Stefanovski, D., Bergman, R. N., Wasserman, D. H., Schwartz, M. W., 2013. FGF19 action in the brain induces insulin-independent glucose lowering. *J Clin Invest*. [Epub ahead of print].

Naveilhan, P., Svensson, L., Nystrom, S., Ekstrand, A. J., Ernfors, P., 2002. Attenuation of hypercholesterolemia and hyperglycemia in ob/ob mice by NPY Y2 receptor ablation. *Peptides*. 23, 1087-1091.

Newhall, K. J., Cummings, D. E., Nolan, M. A., McKnight, G. S., 2005. Deletion of the RIIbeta-subunit of protein kinase A decreases body weight and increases energy expenditure in the obese, leptin-deficient ob/ob mouse. *Mol Endocrinol*. 19, 982-991.

O'Rahilly, S., 2009. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature*. 462, 307-314.

Ozata, M., Ozdemir, I. C., Licinio, J., 1999. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab*. 84, 3686-3695.

Ozer, A., Bruick, R. K., 2007. Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? *Nat Chem Biol*. 3, 144-153.

Peeters, A., Beckers, S., Verrijken, A., Roevens, P., Peeters, P., Van Gaal, L., Van Hul, W., 2008. Variants in the FTO gene are associated with common obesity in the Belgian population. *Mol Genet Metab*. 93, 481-484.

Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Baker, M. B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., Collins, F., 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269, 540-543.

- Peters, T., Ausmeier, K., Rüther, U., 1999.** Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm Genome*. 10, 983-986.
- Pick, A., Clark, J., Kubstrup, C., Levisetti, M., Pugh, W., Bonner-Weir, S., Polonsky, K. S., 1998.** Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*. 47, 358-364.
- Pluthero, F. G., 1993.** Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 21, 4850-4851.
- Polonsky, K. S., Given, B. D., Hirsch, L., Shapiro, E. T., Tillil, H., Beebe, C., Galloway, J. A., Frank, B. H., Karrison, T., Van Cauter, E., 1988.** Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest*. 81, 435-441.
- Rask-Madsen, C., Kahn, C. R., 2012.** Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32, 2052-2059.
- Ricoult, S. J., Manning, B. D., 2013.** The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep*. 14, 242-251.
- Robbens, S., Rouze, P., Cock, J. M., Spring, J., Worden, A. Z., Van de Peer, Y., 2008.** The FTO gene, implicated in human obesity, is found only in vertebrates and marine algae. *J Mol Evol*. 66, 80-84.
- Rosenbaum, M., Leibel, R. L., 1998.** Leptin: a molecule integrating somatic energy stores, energy expenditure and fertility. *Trends Endocrinol Metab*. 9, 117-124.
- Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B., Auwerx, J., 1995.** Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 377, 527-529.
- Saltiel, A. R., Kahn, C. R., 2001.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414, 799-806.

Sanchez-Pulido, L., Andrade-Navarro, M. A., 2007. The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem.* 8, 23.

Schäfer, K., Fujisawa, K., Konstantinides, S., Loskutoff, D. J., 2001. Disruption of the plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces the adiposity and improves the metabolic profile of genetically obese and diabetic ob/ob mice. *FASEB J.* 15, 1840-1842.

Schaffer, J. E., 2003. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol.* 14, 281-287.

Scheepers, A., Joost, H. G., Schurmann, A., 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 28, 364-371.

Schmidt-Nielsen, K., 1999. Physiologie der Tiere. *Spektum.* 1. Aufl.

Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Campfield, L. A., Burn, P., Baskin, D. G., 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest.* 98, 1101-1106.

Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., Baskin, D. G., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 404, 661-671.

Scott, L. J., Mohlke, K. L., Bonnycastle, L. L., Willer, C. J., Li, Y., Duren, W. L., Erdos, M. R., Stringham, H. M., Chines, P. S., Jackson, A. U., Prokunina-Olsson, L., Ding, C. J., Swift, A. J., Narisu, N., Hu, T., Pruim, R., Xiao, R., Li, X. Y., Conneely, K. N., Riebow, N. L., *et al.*, 2007. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science.* 316, 1341-1345.

Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W. M., Uda, M., Albai, G., Strait, J., Najjar, S., Nagaraja, R., Orru, M., Usala, G., Dei, M., Lai, S., Maschio, A., Busonero, F., Mulas, A., Ehret, G. B., Fink, A. A., Weder, A. B., Cooper, R. S., Galan, P., *et al.*, 2007. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* 3, e115.

Sjögren, M., Lyssenko, V., Jonsson, A., Berglund, G., Nilsson, P., Groop, L., Orho-Melander, M., 2008. The search for putative unifying genetic factors for components of the metabolic syndrome. *Diabetologia*. 51, 2242-2251.

Sodhi, K., Inoue, K., Gotlinger, K. H., Canestraro, M., Vanella, L., Kim, D. H., Manthati, V. L., Koduru, S. R., Falck, J. R., Schwartzman, M. L., Abraham, N. G., 2009. Epoxyeicosatrienoic acid agonist rescues the metabolic syndrome phenotype of HO-2-null mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 331, 906-916.

Spanswick, D., Smith, M. A., Groppi, V. E., Logan, S. D., Ashford, M. L., 1997. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature*. 390, 521-525.

Speliotes, E. K., Willer, C. J., Berndt, S. I., Monda, K. L., Thorleifsson, G., Jackson, A. U., Lango Allen, H., Lindgren, C. M., Luan, J., Magi, R., Randall, J. C., Vedantam, S., Winkler, T. W., Qi, L., Workalemahu, T., Heid, I. M., Steinthorsdottir, V., Stringham, H. M., Weedon, M. N., Wheeler, E., et al., 2010. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet*. 42, 937-948.

Spychala, A., 2012. Analyse von Verhaltensstörungen in Fto-defizienten Mäusen. *Masterarbeit*. Fachbereich Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Stratigopoulos, G., Padilla, S. L., LeDuc, C. A., Watson, E., Hattersley, A. T., McCarthy, M. I., Zeltser, L. M., Chung, W. K., Leibel, R. L., 2008. Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 294, R1185-1196.

Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M., Strosberg, A. D., 1998. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet*. 18, 213-215.

Sun, Y., Asnicar, M., Saha, P. K., Chan, L., Smith, R. G., 2006. Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab*. 3, 379-386.

Taha, C., Klip, A., 1999. The insulin signaling pathway. *J Membr Biol*. 169, 1-12.

Takamura, T., Misu, H., Ota, T., Kaneko, S., 2012. Fatty liver as a consequence and cause of insulin resistance: lessons from type 2 diabetic liver. *Endocr J.* 59, 745-763.

Tan, J. T., Dorajoo, R., Seielstad, M., Sim, X. L., Ong, R. T., Chia, K. S., Wong, T. Y., Saw, S. M., Chew, S. K., Aung, T., Tai, E. S., 2008. FTO variants are associated with obesity in the Chinese and Malay populations in Singapore. *Diabetes.* 57, 2851-2857.

Taylor, R., 1991. Insulin action 1991. *Clin Endocrinol (Oxf).* 34, 159-171.

Tomlinson, E., Fu, L., John, L., Hultgren, B., Huang, X., Renz, M., Stephan, J. P., Tsai, S. P., Powell-Braxton, L., French, D., Stewart, T. A., 2002. Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology.* 143, 1741-1747.

Townsend, K. L., Suzuki, R., Huang, T. L., Jing, E., Schulz, T. J., Lee, K., Taniguchi, C. M., Espinoza, D. O., McDougall, L. E., Zhang, H., He, T. C., Kokkotou, E., Tseng, Y. H., 2012. Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) reverses obesity and regulates appetite through a central mTOR pathway. *FASEB J.* 26, 2187-2196.

Tuorto, F., Liebers, R., Musch, T., Schaefer, M., Hofmann, S., Kellner, S., Frye, M., Helm, M., Stoecklin, G., Lyko, F., 2012. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat Struct Mol Biol.* 19, 900-905.

Unger, R. H., 2003. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology.* 144, 5159-5165.

Unger, R. H., Orci, L., 2001. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J.* 15, 312-321.

Vadlakonda, L., Dash, A., Pasupuleti, M., Anil Kumar, K., Reddanna, P., 2013. The Paradox of Akt-mTOR Interactions. *Front Oncol.* 3, 165.

van der Hoeven, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M. G., Kyewski, B., Rüther, U., 1994. Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (Ft). *Development*. 120, 2601-2607.

van Herpen, N. A., Schrauwen-Hinderling, V. B., 2008. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav*. 94, 231-241.

Vasan, S. K., Fall, T., Job, V., Gu, H. F., Ingelsson, E., Brismar, K., Karpe, F., Thomas, N., 2013. A common variant in the FTO locus is associated with waist-hip ratio in Indian adolescents. *Pediatr Obes*. 8, e45-49.

Villalobos-Comparan, M., Teresa Flores-Dorantes, M., Teresa Villarreal-Molina, M., Rodriguez-Cruz, M., Garcia-Ulloa, A. C., Robles, L., Huertas-Vazquez, A., Saucedo-Villarreal, N., Lopez-Alarcon, M., Sanchez-Munoz, F., Dominguez-Lopez, A., Gutierrez-Aguilar, R., Menjivar, M., Coral-Vazquez, R., Hernandez-Stengele, G., Vital-Reyes, V. S., Acuna-Alonzo, V., Romero-Hidalgo, S., Ruiz-Gomez, D. G., Riano-Barros, D., *et al.*, 2008. The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity (Silver Spring)*. 16, 2296-2301.

von Schnurbein, J., Heni, M., Moss, A., Nagel, S. A., Machann, J., Muehleider, H., Debatin, K. M., Farooqi, S., Wabitsch, M., 2013. Rapid improvement of hepatic steatosis after initiation of leptin substitution in a leptin-deficient girl. *Horm Res Paediatr*. 79, 310-317.

Wang, H., Dong, S., Xu, H., Qian, J., Yang, J., 2012. Genetic variants in FTO associated with metabolic syndrome: a meta- and gene-based analysis. *Mol Biol Rep*. 39, 5691-5698.

Wang, T., Huang, Y., Xiao, X. H., Wang, D. M., Diao, C. M., Zhang, F., Xu, L. L., Zhang, Y. B., Li, W. H., Zhang, L. L., Zhang, Y., Sun, X. F., Zhang, Q., 2010. The association between common genetic variation in the FTO gene and metabolic syndrome in Han Chinese. *Chin Med J (Engl)*. 123, 1852-1858.

Wang, X. A., Zhang, R., Jiang, D., Deng, W., Zhang, S., Deng, S., Zhong, J., Wang, T., Zhu, L. H., Yang, L., Hong, S., Guo, S., Chen, K., Zhang, X. F., She, Z., Chen, Y., Yang, Q., Zhang, X. D., Li, H., 2013. Interferon regulatory factor 9 protects

against hepatic insulin resistance and steatosis in male mice. *Hepatology*. 58, 603-616.

Weir, G. C., Bonner-Weir, S., 2004. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*. 53 Suppl 3, S16-21.

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Ferrante, A. W., Jr., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 112, 1796-1808.

Welsch, U., 2006. Lehrbuch der Histologie. *Urban u. Fischer*. 2. Auflage.

Westman, S., 1968. Development of the obese-hyperglycaemic syndrome in mice. *Diabetologia*. 4, 141-149.

Westman, S., 1970. Pathogenetic aspects of the obese-hyperglycemic syndrome in mice (genotype obob). I. Function of the pancreatic B-cells. *Diabetologia*. 6, 279-283.

White, M. F., 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 283, E413-422.

Wolfer, D. P., Crusio, W. E., Lipp, H. P., 2002. Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci*. 25, 336-340.

Yoshihara, E., Fujimoto, S., Inagaki, N., Okawa, K., Masaki, S., Yodoi, J., Masutani, H., 2010. Disruption of TBP-2 ameliorates insulin sensitivity and secretion without affecting obesity. *Nat Commun*. 1, 127.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J. M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372, 425-432.

Zhou, Y. T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., Orci, L., Unger, R. H., 2000. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 1784-1789.

Internetquellen:

- 1) Brendan D. Manning, „metabolic diseases“. Verfügbar unter: <http://www.hsph.harvard.edu/brendan-manning/manning-lab>. (23.09.2013)
- 2) IDF, „The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome“. Verfügbar unter: http://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf. (15.05.2013)
- 3) WHO, „Obesity and overweight“. Verfügbar unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. (15.05.2013)
- 4) WHO (2009), „Global health risk report 2004“ Verfügbar unter: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/global_health_risks/en/. (20.05.2013)
- 5) Max Rubner-Institut, „Die Nationale Verzehrstudie II“. Verfügbar unter <http://www.mri.bund.de/NationaleVerzehrsstudie>. (20.05.2013)
- 6) DAG, „Die Nationale Verzehrstudie II“. Verfügbar unter: <http://www.adipositas-gesellschaft.de/index.php?id=40>. (20.05.2013)
- 7) WHO, „10 facts on obesity“. Verfügbar unter: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>. (15.05.2013)
- 8) „Adipositas-Ursachen“. Verfügbar unter: http://drugline.info/img/ail/adipositas-ursachen-691_1.jpg. (21.05.2013)

8 ANHANG

8.1 Gewichts- und Größenanalysen der Männchen

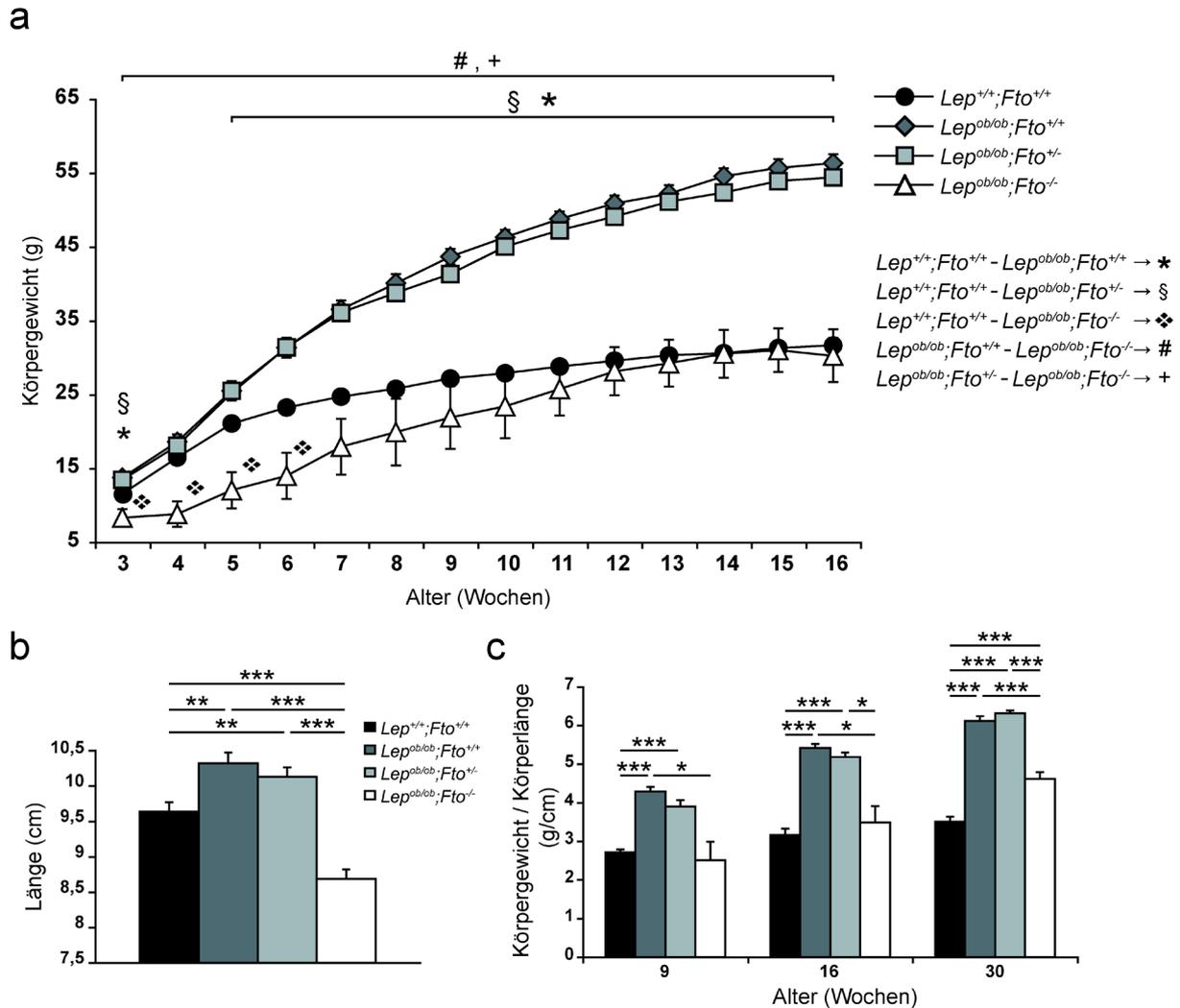


Abb. 8.1: Gewichts- und Größenanalysen männlicher Leptin-defizienter Mäuse mit verschiedenen *Fto*-Genotypen. a) Gewichtsentwicklung zwischen der 3. und 16. Lebenswoche. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse sind von der 3. bis zur 6. Lebenswoche signifikant leichter als wildtypische Geschwister und halten bis zur 16. Woche ein Körpergewicht, das dem von wildtypischen Geschwistern entspricht. Sie sind über den gesamten Messzeitraum leichter als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse. Diese haben erst ab der 5. Lebenswoche ein signifikant höheres Gewicht als die Wildtypen. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen wurden mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet: “*” (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$), “§” (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$), “♦” (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$), “#” ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$), “+” ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$). n = Wildtypen: 19-21, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 14-20, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 23-32, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 4-6. b) Körperlänge der Tiere im Alter von 30 Wochen. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse sind signifikant länger als Wildtypen und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse sind noch kleiner als Wildtypen. n = Wildtypen: 17, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 18, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 28, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 8. c) Körpergewicht bezogen auf die Körperlänge im Alter von 9, 16 und 30 Wochen. n =

Wildtypen: 9,8,17; $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 9,8,17; $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 9,9,28; $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 4,4,8. Im Alter von 9 und 16 Wochen unterscheiden sich $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse nicht von Wildtypen. In 30. Woche haben sie ein höheres Körpergewicht pro Körperlänge als Wildtypen. Die Werte von $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen sind zu allen Zeitpunkten signifikant höher als die der Wildtypen.

8.2 Körpermassezusammensetzung weiblicher Mäuse im Alter von 16 und 30 Wochen

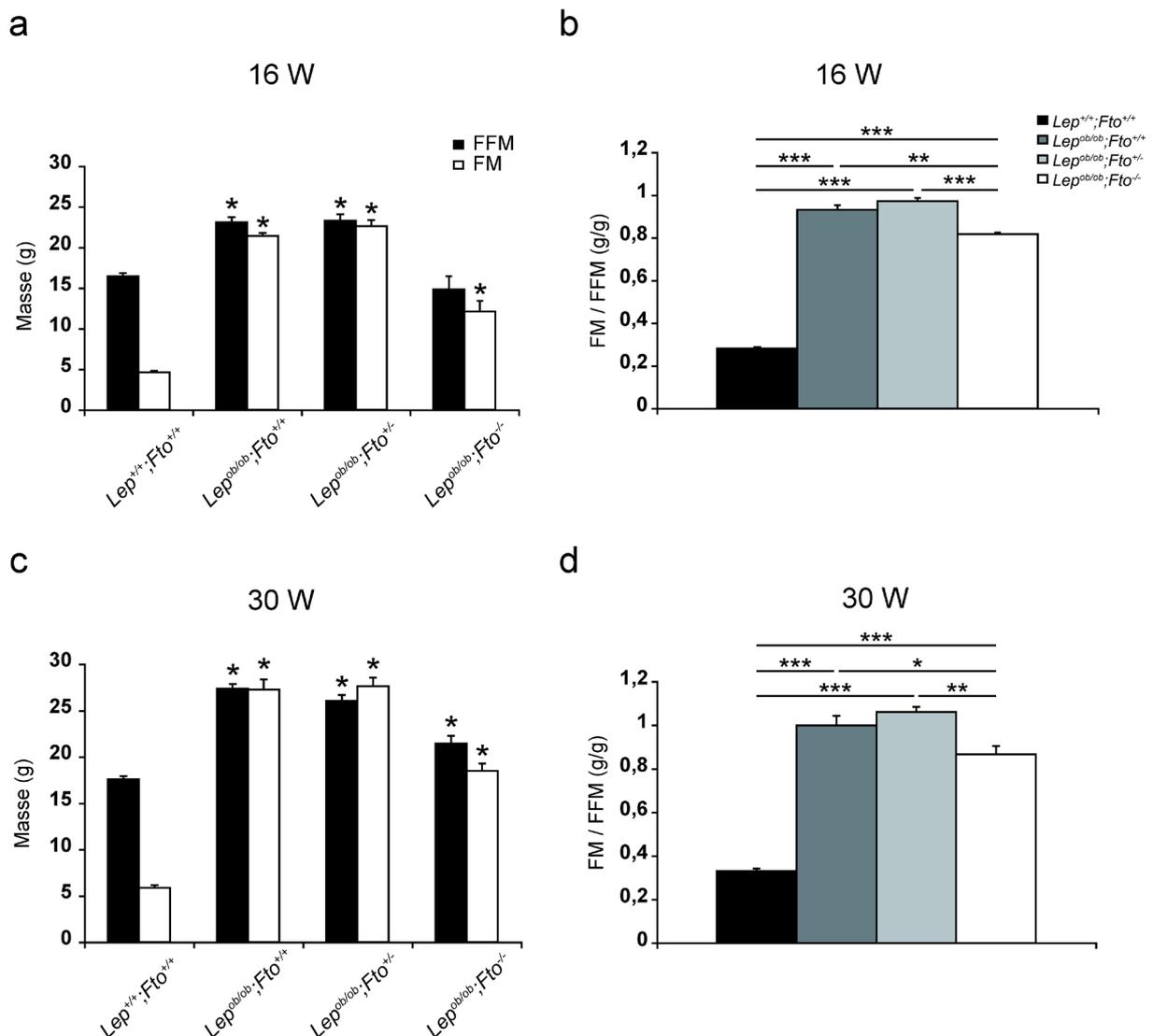


Abb. 8.2: Analyse der Körpermassezusammensetzung weiblicher Mäuse im Alter von 16 und 30 Wochen. a+c) Fettmasse (FM) und fettfreie Masse (FFM) im Alter von 16 und 30 Wochen. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse haben zu beiden Zeitpunkten mehr Fettmasse und mehr fettfreie Masse als Wildtypen. Die Fettmasse der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse ist ebenfalls zu beiden Zeitpunkten erhöht, die fettfreie Masse erst im Alter von 30 Wochen. “**” geben signifikante Unterschiede der jeweiligen Masse zu der von wildtypischen Mäusen

an. b+d) Fettmasse bezogen auf die fettfreie Masse, berechnet aus den in a+c) dargestellten Rohwerten. Leptin-defiziente Mäuse weisen in beiden Alterstufen erhöhte Werte im Vergleich zu den Wildtypen auf. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse haben etwa so viel Fettmasse wie fettfreie Masse. Die Massenanteile der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse sind signifikant geringer als die der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse. n (16W/30W)= Wildtypen: 12/18, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 7/8, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 9/14, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 4/6.

8.3 Körpermassezusammensetzung männlicher Mäuse im Alter von 8 und 30 Wochen

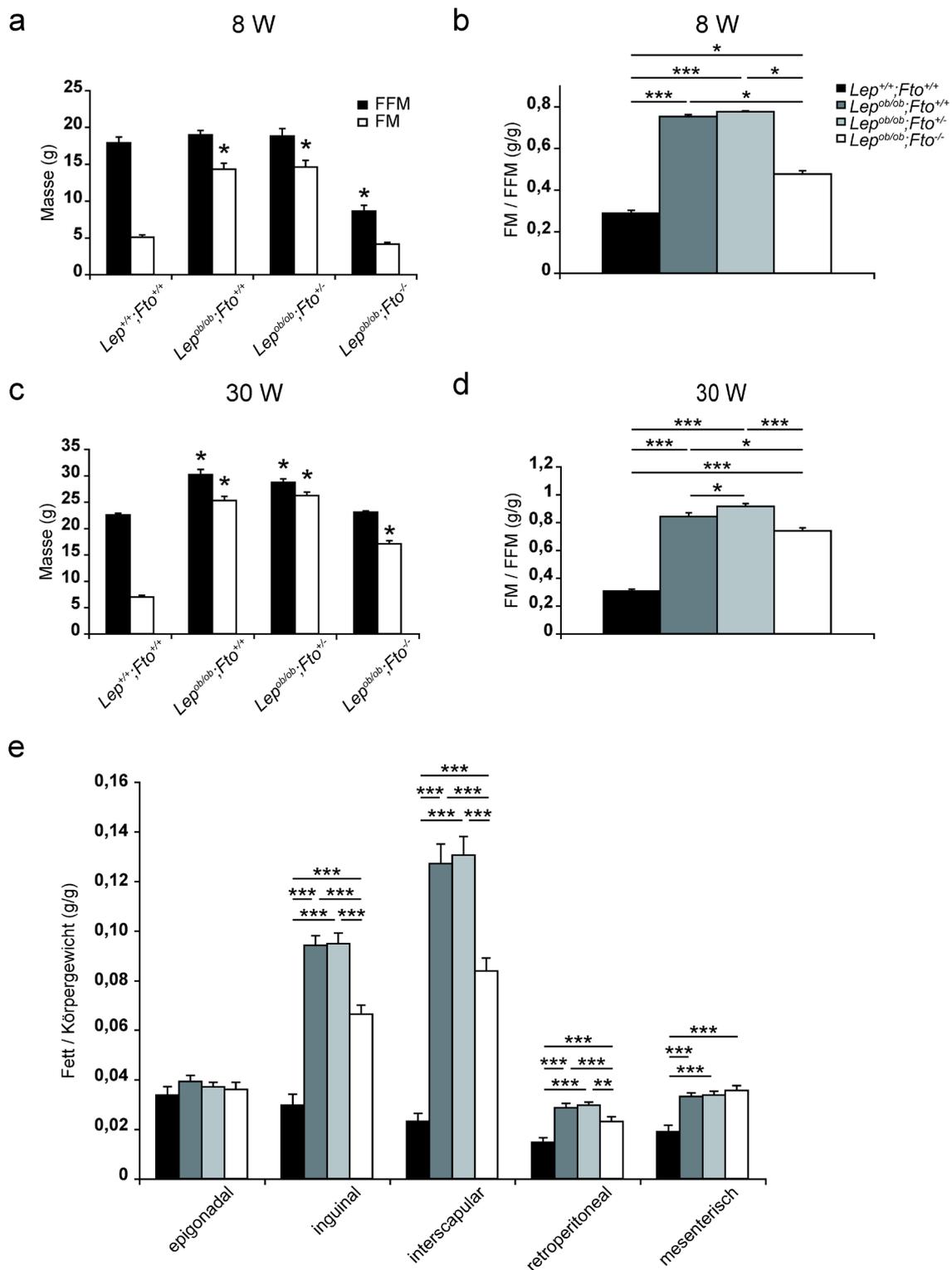


Abb. 8.3: Analyse der Körpermassezusammensetzung männlicher Mäuse im Alter von 8 und 30 Wochen. a+c) Fettmasse (FM) und fettfreie Masse (FFM) im Alter von 8 und 30 Wochen. Im Alter von 8 Wochen haben $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse nicht mehr

fettfreie Masse als Wildtypen. Die Fettmasse ist allerdings bereits erhöht. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben weniger fettfreie Masse als Wildtypen. Im Alter von 30 Wochen sind sowohl fettfreie Masse als auch die Fettmasse in $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen im Vergleich zu Wildtypen erhöht. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben nur mehr Fettmasse. b+d) Fettmasse bezogen auf die fettfreie Masse, berechnet aus den in a+c) dargestellten Rohwerten. Leptin-defiziente Mäuse weisen in beiden Altersstufen erhöhte Werte im Vergleich zu den Wildtypen auf. Die Massenanteile der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse sind signifikant geringer als die der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse. n (16W/30W)= Wildtypen: 7/15, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 7/8, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 9/16, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 2/4. e) Anteile unterschiedlicher Fettdepots im Alter von 30 Wochen. Die Masse des epigonadalen Fettes unterscheidet sich nicht in den 4 verschiedenen Genotypen. Inguinales, interskapuläres, retroperitoneales und mesenterisches Fett ist auf das Körpergewicht bezogen in Leptin-defizienten Mäusen im Vergleich zu wildtypischen erhöht. In all diesen Fettdepots (bis auf das mesenterische Fett) führt der Verlust von FTO zu einer Reduktion der Fettmasse in Leptin defizienten Mäusen. n= Wildtypen: 13, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 17, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 26, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 8.

8.4 Leberanalysen männlicher Mäuse

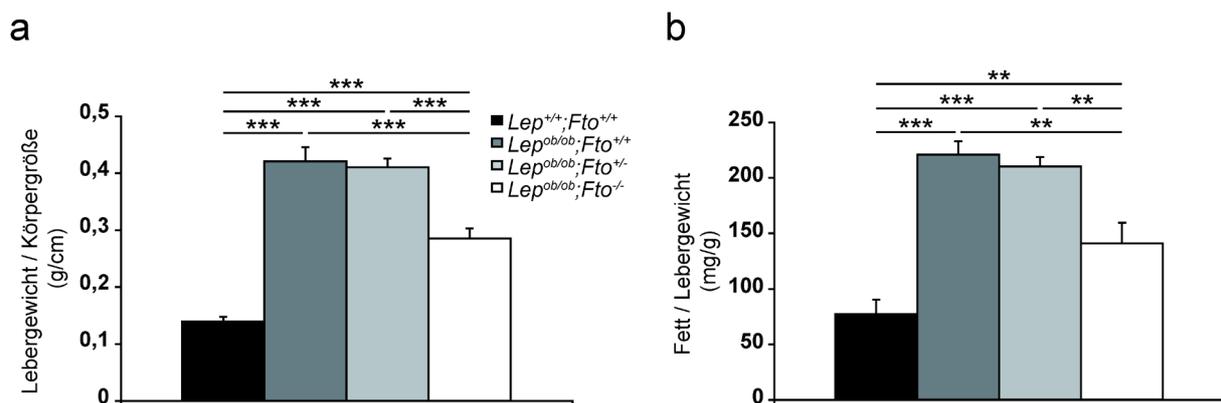


Abb. 8.4: Analysen der Lebern männlicher Mäuse im Alter von 30 Wochen. a) Lebergewicht bezogen auf die Körpergröße. Leptin-defiziente Mäuse weisen ein stark erhöhtes Lebergewicht bezogen auf ihre Körpergröße im Vergleich zu wildtypischen Mäusen auf. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen ein geringeres Lebergewicht pro Körpergröße. n= Wildtypen: 12, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 14, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 23, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 8. b) Aus der Leber isolierte Triglyzeride pro Gramm Leber. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse haben fast 3 mal so viel Fett in der Leber wie Wildtypen. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse haben ebenfalls signifikant mehr Fett in ihrer Leber gespeichert, aber signifikant weniger als die $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse. n=5 für jeden Genotyp.

8.5 Blutglukose-Analysen männlicher Mäuse

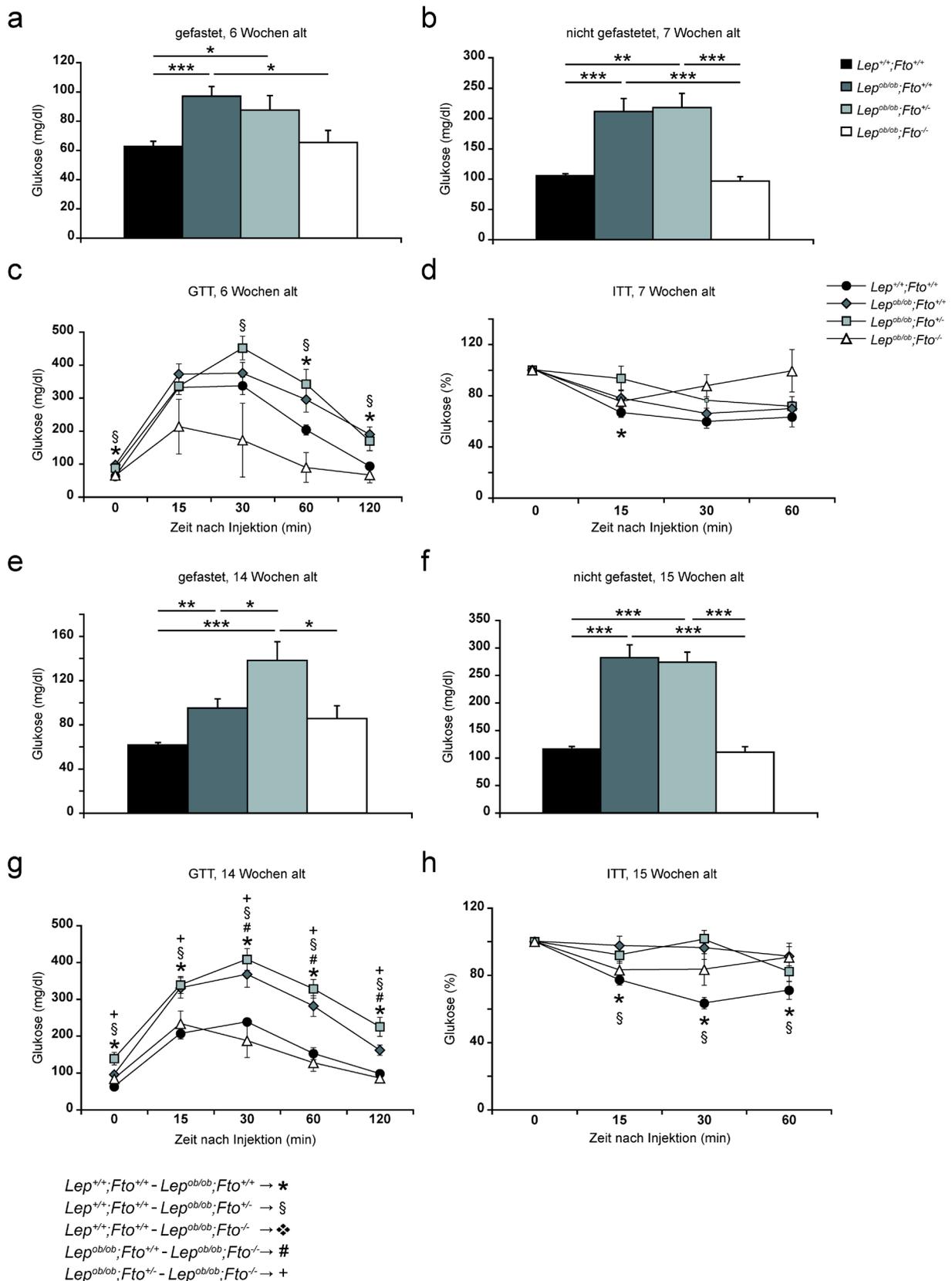


Abb. 8.5: Analysen des Glukosestoffwechsels in männlichen Mäusen. a+e) Blutglukosewerte nach 16stündigem Fasten im Alter von 6 und 14 Wochen. Die Glukosewerte der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse sind im Vergleich zu wildtypischen

signifikant erhöht. Im Alter von 6 Wochen liegen die Werte der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse in etwa auf Höhe der wildtypischen und sind signifikant niedriger als die der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäuse. Im Alter von 14 Wochen sind die Fastenglukosewerte der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse vergleichbar mit denen der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ -Mäuse. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse haben einen höheren Glukosespiegel als diese. b+f) Blutglukosewerte von ungestauten Tieren im Alter von 7 und 14 Wochen. In ungestautem Zustand haben $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse signifikant mehr Glukose im Blut als Wildtypen und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse. Die Werte von $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen sind mit den wildtypischen vergleichbar. c+g) GTTs nach 16stündigem Fasten im Alter von 6 und 14 Wochen. Während $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse einen stärkeren Anstieg und langsameren Abfall der Glukose aufweisen und nach 2 Stunden den Startwert noch nicht wieder erreicht haben, weisen $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse ähnliche Kurven auf wie Wildtypen. d+h) ITT von ungestauten Tieren. Die Werte sind prozentual in Bezug auf den Startwert ($\triangleq 100\%$) berechnet. Im Vergleich zu wildtypischen Tieren reagieren Leptin-defiziente Mäuse unabhängig vom *Fto*-Genotyp kaum auf die Insulininjektion. n(6-7 Wochen)= Wildtypen: 13/13, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 11/11, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 9/9, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 2/3. Aufgrund der geringen Anzahl an Tieren wurde bei die Analysen der jüngeren Tiere kein T-Test im Vergleich zu $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen berechnet. n(14/15 Wochen)= Wildtypen: 12/15, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 11/14, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 17/22, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 4/5. Die statistisch signifikanten Unterschiede in GTTs und ITTs zwischen den einzelnen Genotypen wurden mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet: "*" (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$), "§" (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$), "❖" (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$), "#" ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$), "+" ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$).

8.6 Gewichts- und Längenmessungen männlicher Mäuse mit C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund

Tabelle 8.1: Analysen der Körperzusammensetzung männlicher Mäuse mit C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund im Alter von 30 Wochen. Gemessen wurde das Körpergewicht, die Körperlänge, fettfreie Masse, Fettmasse, epigonadales Fett, inguinales Fett und das Gewicht der Leber. “#” kennzeichnen signifikante Unterschiede zu Wildtypen. “*” kennzeichnen signifikante Unterschiede zu $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen. Im Vergleich zu wildtypischen Tieren sind Körpergewicht, inguinales Fett und das Lebergewicht in $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen erhöht. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse weisen auch ein höheres Körpergewicht sowie mehr inguinales Fett und ein erhöhtes Lebergewicht auf. Die Messung der Körperlänge zeigt im Vergleich zu wildtypischen Mäusen eine Wachstumsretardation. Die Menge des epigonadalen Fettes ist nur in $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäusen erhöht. Zusätzlich wird deutlich, dass $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse in fast allen gemessenen Parametern signifikant geringere Werte aufweisen als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse. Für die Anteile der Fettmasse und der fettfreien Masse wurden aufgrund sehr geringer Tierzahlen keine t-Tests berechnet.

Männchen (30 Wochen)	$Lep^{+/-};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$
Körpergewicht (g)	37,4 ± 1,7 (n=4) *	66,0 ± 2,6 (n=5) * #	60,9 ± 3,2 (n=7) * #	43,3 ± 1,1 (n=10)
Länge (cm)	10,1 ± 0,2 (n=4) *	10,6 ± 0,3 (n=5) *	10,6 ± 0,1 (n=7) *	9,3 ± 0,1 (n=10)
FFM (g)	25,9 ± 1,9 (n=2)	31,6 ± 0,7 (n=2)	26,7 ± 2,6 (n=4)	26,2 ± 0,4 (n=3)
FM (g)	8,2 ± 2,0 (n=2)	21,3 ± 1,6 (n=2)	19,1 ± 1,4 (n=4)	15,3 ± 0,5 (n=3)
epig. Fett (mg)	1,1 ± 0,2 (n=4)	2,7 ± 0,4 (n=5) * #	1,9 ± 0,3 (n=7)	1,2 ± 0,2 (n=10)
ing. Fett (mg)	1,0 ± 0,2 (n=4) *	5,7 ± 0,6 (n=5) * #	5,0 ± 0,6 (n=7) * #	2,7 ± 0,4 (n=10)
Leber (g)	1,5 ± 0,1 (n=4) *	5,7 ± 0,3 (n=5) * #	5,5 ± 0,8 (n=7) * #	2,8 ± 0,3 (n=10)

8.7 Blutglukosewerte männlicher Mäuse mit C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund

Tabelle 8.2: Blutglukosewerte männlicher Mäuse (C57BL/6J/NMRI) im Alter von 6-7 und 14-15 Wochen. Dargestellt sind die Werte von gefasteten und ungefasteten Tieren. “#” kennzeichnen signifikante Unterschiede zu Wildtypen. “*” kennzeichnen signifikante Unterschiede zu $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäusen. Junge gefastete Tiere zeigen keine Unterschiede in der Glukosemenge im Blut. Ungefastet kann in allen Leptin-defizienten Tieren ein erhöhter Blutzuckerspiegel im Vergleich zu Wildtypen festgestellt werden. Allerdings sind die Werte der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse signifikant niedriger als die der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse. In älteren Leptin-defizienten Tieren ist der Glukosespiegel nach dem Fasten erhöht, wobei $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse einen signifikant niedrigeren Wert aufweisen als $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse. Ungefastet haben ältere Leptin-defiziente Tiere im Vergleich zu Wildtypen ebenfalls alle erhöhte Blutglukosewerte. Auch hier sind die Werte der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse aber signifikant niedriger als die der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse.

	Männchen	$Lep^{+/-};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$	$Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$
Glukose gefastet (mg/dl)	6 Wochen	56,6 ± 8,6 (n=7)	70,8 ± 4,7 (n=10)	75,7 ± 6,9 (n=11)	80,3 ± 10,8 (n=12)
	14 Wochen	56,9 ± 2,2 (n=7)	110,3 ± 14,7 (n=9) #	141,3 ± 25,4 (n=9) * #	80,2 ± 4,7 (n=10) #
Glukose nicht gefastet (mg/dl)	7 Wochen	106 ± 11,0 (n=7)	294,7 ± 38,4 (n=10) * #	251,9 ± 37,1 (n=11) * #	147,7 ± 12,1 (n=12) #
	15 Wochen	100,7 ± 4,3 (n=7)	351,2 ± 39,7 (n=10) * #	331,4 ± 59,0 (n=9) * #	150,6 ± 14,0 (n=10) #

8.8 GTTs und ITTs männlicher Mäuse mit C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund

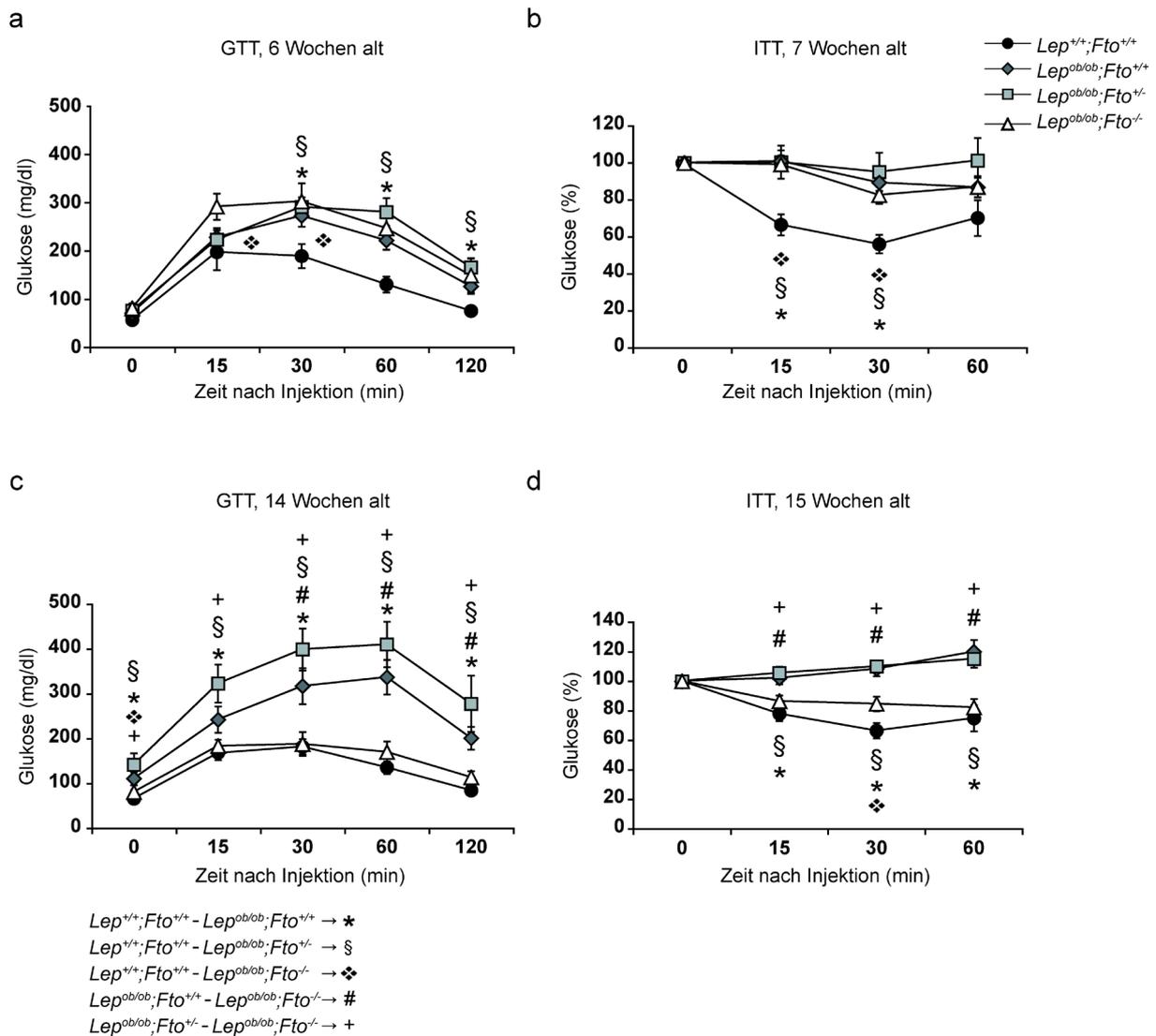


Abb. 8.6: GTTs und ITTs männlicher Mäuse mit C57BL/6J/NMRI-Mischhintergrund. a+c) GTTs im Alter von 6 und 14 Wochen. Im Alter von 6 Wochen gibt es keine Unterschiede in der Reaktion von Leptin-defizienten Mäusen auf Glukoseinjektion. Ihre Kurven liegen leicht oberhalb der der wildtypischen Tiere. Im Alter von 14 Wochen weisen nur $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse nach Glukoseinjektion einen stärkeren Anstieg der Blutglukose auf als Wildtypen. Die Kurve der $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse ist mit der der Wildtypen praktisch identisch. b+d) ITTs im Alter von 7 und 15 Wochen. Die Werte sind prozentual in Bezug auf den Startwert ($\pm 100\%$) berechnet. Im Vergleich zu wildtypischen Tieren reagieren 7 Wochen alte Leptin-defiziente Mäuse unabhängig vom *Fto*-Genotyp nicht auf die Insulininjektion. Im Alter von 15 Wochen reagieren $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$ -Mäuse mit einer leichten Senkung des Glukosespiegels. Der Glukosespiegel der $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ - und $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ -Mäuse steigt stattdessen an. Die statistisch signifikanten Unterschiede in GTTs und ITTs zwischen den einzelnen Genotypen wurden mit unterschiedlichen Symbolen gekennzeichnet: "*" (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$), "\S" ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$), "\diamond" (Wildtyp gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$), "\#" ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$), "+" ($Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$ gg. $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$). n = Wildtypen: 7, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/+}$: 9-10, $Lep^{ob/ob};Fto^{+/-}$: 9-11, $Lep^{ob/ob};Fto^{-/-}$: 10-12.

9 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüter für das interessante Thema, viele hilfreiche Diskussionen und die Möglichkeit der selbstständigen Forschung.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für Übernahme des Korreferates bedanken.

Allerherzlichen Dank an meine liebsten Kollegen und ehemaligen Kollegen: Stefanie Kuschel, Stephan Burmühl, Christoph Gerhardt, Yvonne Jäger, Johanna Lier, André Spychala und Martin Stock! Danke für Eure Unterstützung, hilfreichen Anregungen, Diskussionen und natürlich das wundervolle Arbeitsklima! Wir hatten immer viel Spaß zusammen und das „Labor der kleinen Menschen“ wird mir ewig in guter Erinnerung bleiben. Ihr seid die Allerbesten!

Julia Fischer danke ich für die tolle Betreuung, auch nach ihrem Abschied aus dem EMT!

Meinen lieben Kommilitonen Steffi, Patrick, Herrn Odd und vielen mehr danke ich für eine unvergessliche und spaßige Studien-Zeit.

Ein besonders großes Dankeschön gilt meiner Familie, insbesondere der besten Mum der Welt, und meinen lieben Freunden für die unendliche Unterstützung, die Ermutigungen und die Kraft, die mir vieles erleichtert haben. Ich liebe Euch!

10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit „Der Einfluss von FTO auf die Entstehung des metabolischen Syndroms“ selbstständig und ohne fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Außerdem erkläre ich, dass diese Dissertation bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Fakultät vorgelegt wurde. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

(Kathrin Ikels)