

**Der Verlust von FTO in der Maus führt zu einer
erhöhten Glomerulidichte und beeinflusst die
Nierenfunktion**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Rebecca Dorothea Zingsem
aus Mönchengladbach

Düsseldorf, November 2016

**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: Univ.-Prof. Dr. U. Rüter

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. T. Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2017

1.	Einleitung	1
1.1	Entwicklungsbiologie	1
1.2	Modellorganismen	1
1.3	Die Niere.....	3
1.3.1	Vaskularisierung der Niere.....	4
1.3.2	Das Nephron.....	5
1.3.3	Aufgaben der Niere	6
1.4	Die Embryonalentwicklung der Maus	7
1.4.1	Die murine Nephrogenese.....	8
1.4.2	Signalmoleküle während der Nierenentwicklung	10
1.4.2.1	<i>Hox</i> -Gene	11
1.4.2.2	Die TGF- β -Superfamilie.....	11
1.4.2.3	Hedgehog-Proteine	13
1.4.2.4	WNT-Moleküle.....	14
1.4.2.5	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren	15
1.5	Das „ <i>fat mass and obesity associated</i> “ (<i>Fto</i>) Gen	16
1.5.1	Das humane <i>FTO</i>	16
1.5.2	Das murine <i>Fto</i>	17
1.5.3	Die <i>Fto</i> -Mausmutante	17
1.5.4	Untersuchungen von <i>Fto</i> -defizientem Gewebe.....	19
1.5.5	Funktionen von FTO	19
1.6	Ziel dieser Arbeit	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Arbeiten mit Mäusen	22
2.1.1	Tierhaltung	22
2.1.2	Präparation von embryonalen Nieren.....	23
2.1.3	Präparation der Nieren von adulten Tieren	23

2.1.4	Nicht-invasive Blutdruckmessung	24
2.1.5	Blutentnahme	24
2.1.6	Sammeln von Urin in metabolischen Käfigen	25
2.1.7	Kreatinin-Bestimmungen	25
2.1.8	Bestimmung weiterer Parameter im Urin.....	26
2.1.8.1	Messung verschiedener Metabolite.....	26
2.1.8.2	Untersuchung des Proteingehalts	26
2.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	28
2.2.1	DNA-Isolation aus Schwanzspitzen.....	28
2.2.2	Genotypisierung	28
2.2.3	RNA-Isolation aus embryonalen Nieren	29
2.2.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	30
2.2.5	Reverse Transkription (RT-PCR).....	31
2.2.6	Semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.8	Quantitative Real-Time-PCR	35
2.3	Histologische Verfahren	37
2.3.1	Anfertigung von transversalen Paraffindünnschnitten.....	37
2.3.2	Hämalaun/Eosin-Färbung auf Paraffindünnschnitten	38
2.4	Fotodokumentation.....	39
2.5	Datenverarbeitung	39
2.6	Statistik.....	39
3.	Ergebnisse	41
3.1	<i>Fto</i> ^{-/-} -Mäuse weisen eine erhöhte Glomerulidichte sowie Flächenveränderungen von Kortex und Medulla auf	41
3.2	Männliche <i>Fto</i> ^{-/-} -Mäuse mit NMRI-Hintergrund zeigen eine gesteigerte Urinabgabe ...	44
3.3	Der Verlust von FTO führt bei Mäusen im Alter von sieben Wochen zu verringerten Kreatininwerten im Urin	46

3.4	<i>Fto</i> ^{-/-} -Mäuse mit BN-Hintergrund weisen eine erhöhte Herzfrequenz auf.....	49
3.5	<i>Fto</i> ^{-/-} -Mäuse zeigen Abweichungen in der Glomerulientwicklung.....	52
3.5.1	Unterschiede auf histologischer Ebene	52
3.5.2	Unterschiede auf mRNA-Ebene.....	54
4.	Diskussion.....	60
4.1	FTO spielt eine Rolle während der Nephrogenese.....	60
4.1.1	Die Geschwindigkeit der Nierenentwicklung ist abhängig vom genetischen Hintergrund	61
4.1.2	Regulation des ziliär vermittelten SHH-Signalwegs durch FTO.....	62
4.2	Auswirkungen der strukturellen Veränderungen auf die Nierenfunktion	65
4.2.1	Eine Kombination aus genetischem Hintergrund und Geschlecht bedingt die Kompensation von Variationen in der Wasseraufnahme.....	65
4.2.2	Unterschiedlichkeiten im Urin deuten auf eine veränderte Nierenfunktion hin	68
4.2.2.1	Veränderungen in der Nierenfunktion in <i>Fto</i> ^{-/-} -Mäusen beeinflussen den Glukose-Metabolismus.....	68
4.2.2.2	Eine <i>Fto</i> -Defizienz scheint den Abbau von Kreatin zu beeinflussen	69
4.2.2.3	FTO hat möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf den Proteinstoffwechsel.....	70
4.2.3	Erhöhte Adrenalin- und Corticosteronwerte im Plasma <i>Fto</i> -defizienter Mäuse bedingen eine erhöhte Herzfrequenz bei unverändertem Blutdruck.....	73
5.	Ausblick	76
5.1	Vergleichbarkeit der Nieren von Mäusen beider genetischer Hintergründe.....	76
5.2	Klärung der Rolle von FTO innerhalb des Proteinstoffwechsels und als Regulator des SHH-Signals.....	77
5.3	Weitere Analysen der Niere und ihrer Funktionen.....	78
6.	Zusammenfassung.....	80
	Abstract	81
7.	Abkürzungsverzeichnis	82

7.1	Abkürzungen	82
7.2	Einheiten	89
8.	Literatur	91
9.	Anhang	107
10.	Danksagung	114
11.	Eidesstattliche Erklärung.....	115

1. Einleitung

1.1 Entwicklungsbiologie

Die Ontogenese eines multizellulären Organismus beginnt mit der Befruchtung der Eizelle und endet mit dem Tod (Haeckel, 1866). Dazwischen findet eine stetige Entwicklung statt, welche in der frühen, pränatalen Phase als Embryologie bezeichnet wird. Zu diesem Zeitpunkt werden die Grundlagen für jegliche spätere Entwicklungen und Funktionen von Zellen, Geweben und Organen gelegt. Nach der Befruchtung beginnt die Embryonalentwicklung mit den Furchungsteilungen der Zygote, bis die Zellen schließlich zu Geweben differenziert und letztendlich zu Organen spezialisiert werden. Diese Entwicklungsprozesse werden durch diverse genetische und molekulare Ereignisse gesteuert, deren Analyse und Verständnis das Ziel der Entwicklungsbiologie darstellen. Spezifizierung bedeutet, dass bestimmte Zellen ihre Funktion, in vielen Fällen auch ihre Morphologie stark verändern müssen. Dabei ist allerdings zu beachten, dass jede Zelle bei der mitotischen Teilung, durch die sie entsteht, das identische genetische Material erhält. Realisiert wird diese Änderung von Funktion und/oder Morphologie in erster Linie durch einen Vorgang, der als differentielle Genexpression bezeichnet wird. Diese kann auf unterschiedlichen Ebenen wirken. Beispiele hierfür sind die Transkriptionskontrolle, durch welche die Transkription bestimmter Gene überwacht wird, sowie die RNA-Prozessierungskontrolle, wobei das Transkript unterschiedlich modifiziert wird (Gilbert, 2006).

Eine der weiteren Möglichkeiten, das Expressionsmuster zu verändern, ist die Reaktion einer Zelle auf äußere Einflüsse. Diese können juxtakriner oder parakriner Art sein. Die Interaktion von Membranproteinen der einen Zelle mit Rezeptorproteinen einer benachbarten Zelle wird als juxtakrin bezeichnet. Parakrine Signalmoleküle sind solche, die von einer Zelle sezerniert werden und über eine bestimmte Distanz auf eine andere Zelle einwirken. Dadurch wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst, durch welche letztendlich die Expression anderer Gene beeinflusst wird (Rodbell, 1980).

1.2 Modellorganismen

Um einen besseren Einblick in die Entwicklung zu erhalten, bedient sich die Forschung mehrerer Modellorganismen. Durch eine kurze Generationsdauer ist es möglich, kostengünstig und relativ unkompliziert bestimmte Organismen zu züchten und beispielsweise den Einfluss genetischer

Veränderungen oder die Heilungschancen induzierter Krankheiten zu untersuchen und später auf den Menschen zu übertragen. Zu diesen Modellorganismen gehören neben Bakteriophagen, Bakterien und Pilzen sowohl Pflanzen, wie die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), als auch wirbellose Tiere, wie die Taufliege (*Drosophila melanogaster*) und der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*). Aber auch Wirbeltiere sind vertreten, darunter Fische, wie der Zebraquarienfisch (*Danio rerio*), Amphibien, wie der Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), Vögel, wie das Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*), und Säugetiere, wie die Hausmaus (*Mus musculus*) oder die Ratte (*Rattus norvegicus*). Das Genom dieser Modellorganismen weist hohe Homologien zum Genom des Menschen auf. Je näher die evolutionäre Verwandtschaft, desto mehr Homologien können gefunden werden. Dies stellt die Grundlage für die Untersuchung molekularer Mechanismen und das Ziehen von Rückschlüssen auf derartige Mechanismen beim Menschen dar. Betrachtet man die sehr ähnlichen genetischen Voraussetzungen, kann davon ausgegangen werden, dass auch ablaufende Prozesse und molekulare Mechanismen zwischen einem Modell wie der Maus und dem Menschen weitgehend kongruieren (Judd und Hill, 2001).

Um nun die Funktion eines bestimmten Gens zu untersuchen, ist es möglich, dieses Gen innerhalb des gesamten Modellorganismus oder auch nur innerhalb spezifischer Gewebe oder Organe oder zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung (konditional) zu mutieren, zu überexprimieren oder gänzlich auszuschalten. Oft erfolgt dies über gezielte Genmodifikation, welche sich die homologe Rekombination zu Nutze macht, indem das mutierte Gen in embryonale Zellen eingeschleust und dort gegen das intakte Gen ausgetauscht wird. Wichtig ist, dass das mutierte Gen in Zellen der Keimbahn gelangt, damit die Mutation später an die Nachkommen weiter gegeben werden kann. So werden bestimmte Mutationen erzeugt, deren Auswirkungen am Embryo oder am erwachsenen Organismus untersucht werden können (Capecchi, 1989).

Welche Modellorganismen Anwendung finden, hängt stark von der aktuellen Fragestellung ab. Um Rückschlüsse auf mögliche Veränderungen oder Funktionsverluste einer Mutation auf innere Organe ziehen zu können, ist beispielsweise ein Organismus erforderlich, der solche Organe ebenfalls und in möglichst ähnlicher Form entwickelt. Bei der Untersuchung der Niere eignen sich daher in erster Linie Säugetiere wie Hausmaus oder Ratte. Da die Ratte eine vergleichsweise lange Generationszeit und nur wenige Nachkommen hat, hat sich hier für die Untersuchung möglichst vieler Proben die Maus als Modellorganismus durchgesetzt. In dieser Doktorarbeit liegt der Fokus auf der Analyse von Nieren und deren Funktionen unterschiedlicher embryonaler Stadien und adulter Mäuse, bei welchen das *Fto*-Gen inaktiviert wurde. So sollen Rückschlüsse auf den Einfluss des FTO-Proteins auf die Nierenentwicklung und die Funktionsfähigkeit der Niere im adulten Stadium analysiert werden.

1.3 Die Niere

Durch die Filtration des Blutes auf größtmöglicher Fläche wird in der Niere der Urin produziert. Dieser wird über den Harnleiter (*Ureter*) von der Niere zur Harnblase transportiert und schließlich über die Harnröhre (*Urethra*) ausgeschieden. Die Niere selbst ist paarig angelegt und befindet sich dorsal gelegen hinter dem Zwerchfell im Abdomen. Sie ist von einer Hülle, der Nierenkapsel, umgeben, welche auf der konvexen Nierenseite direkt an die äußere Parenchymschicht, die Nierenrinde (*Cortex renalis*), angrenzt (Abb. 1.1).

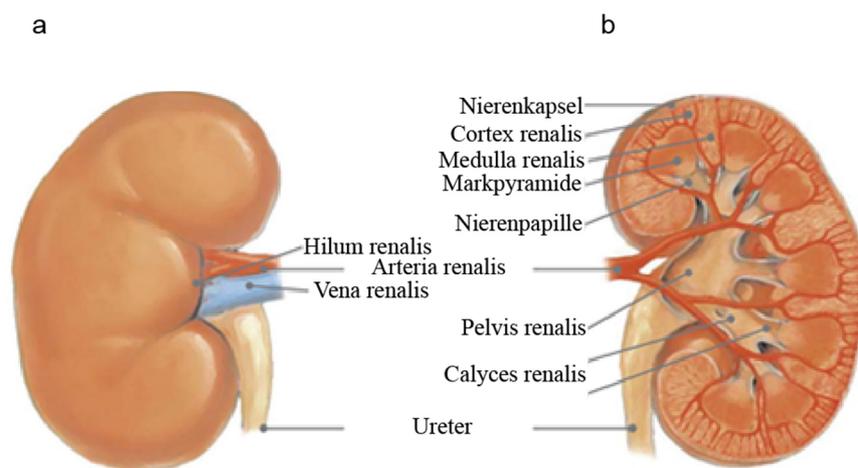


Abbildung 1.1: Die Niere.

Diese schematische Darstellung zeigt (a) eine Niere, an deren Hilum die Blutgefäße und der Ureter ein- bzw.- austreten, und (b) einen Längsschnitt durch die Niere. Zu sehen sind der Kortex und die Markpyramiden der Medulla sowie die Urin-führenden Strukturen (modifiziert nach FET e.V., 2011).

Weiter innenliegend befindet sich das Nierenmark (*Medulla renalis*) in Form mehrerer Markpyramiden. Diese werden jeweils von Teilen des Kortex, den Bertini-Säulen (*Columnae renales*), umschlossen. Die Spitzen der Markpyramiden werden als Papillen bezeichnet. Sie ragen in die Nierenkelche (*Calyces renalis*) hinein, in welche sie den Urin abgeben. Die Nierenkelche wiederum schließen sich in ihrer Gesamtheit zum Nierenbecken (*Pelvis renalis*) zusammen, das schließlich in den Ureter übergeht. Dieser verlässt die Niere auf ihrer konkaven Seite an der Nierenpforte (*Hilum renalis*) (Hauch, 1903; Stevens und Lowe, 1992; Tanner, 2008).

1.3.1 Vaskularisierung der Niere

Am Hilum zieht auch die zweigeteilte Nierenarterie (*Arteria renalis*) in die Niere ein bzw. die Nierenvene (*Vena renalis*) heraus. Die Nierenarterie verzweigt sich nach ihrem Eintritt erneut in mehrere Segmentarterien. Diese teilen sich zur Versorgung der Markpyramiden (*Arteriae interlobaris*) und der dazugehörigen kortikalen Bereiche (*Arteriae arcuata*) weiter auf (Abb. 1.2).

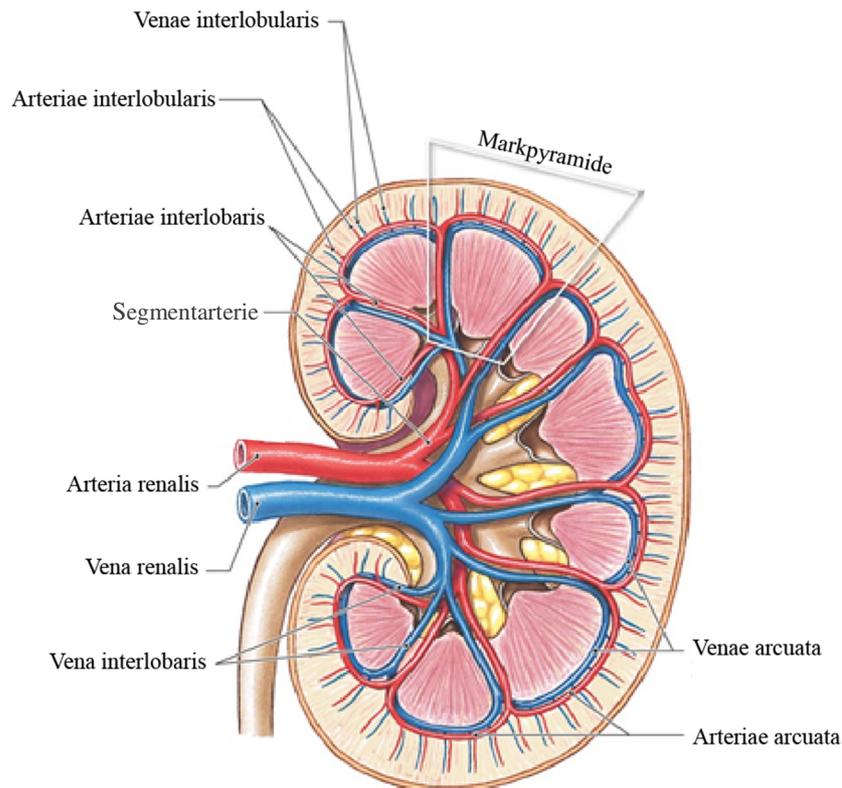


Abbildung 1.2: Vaskularisierung der Niere.

Hier ist die Blutversorgung der Niere schematisch dargestellt. Zu sehen sind die am Hilum zweigeteilte zuführende *Arteria renalis* sowie die abführende *Vena renalis*. Auch sind die Segmentarterien und deren Äste, die *Arteriae interlobularis*, gezeigt. Die weiteren Verzweigungen der Gefäße innerhalb des Kortex sind nur angedeutet, die Gefäßknäuel der Glomeruli sind nicht abgebildet (modifiziert nach Benjamin Cummings, 2004).

Aus anderen Verzweigungen (*Arteriae interlobularis*) gehen schließlich kleinste Gefäße, die *Arteriola afferentes*, hervor, welche sich im Kortexbereich nochmals in Kapillarknäuel, die Glomeruli, verzweigen. Hier findet die Filtration des Blutes statt, wodurch zunächst der Primärharn entsteht (Kriz und Bankir, 1988; Stevens und Lowe, 1992; Tanner, 2008). Das gefilterte, aber immer noch sauerstoffreiche Blut wird dann über eine *Arteriola efferens* aus dem Glomerulus hinausgeleitet (Bowman, 1842; Vimtrup, 1928; Wilmer, 1941). Die *Arteriola efferens* weiter nach außen

hin liegender Glomeruli verzweigt sich erneut und bildet so das peritubuläre Kapillarnetz. Dieses umgibt die kortikalen Tubuli und reabsorbiert aus diesen Wasser, Elektrolyte, Kohlenhydrate und niedermolekulare Proteine, so dass letztendlich der Endharn entsteht, welcher ausgeschieden wird. Die Arteriola efferens der juxtamedullären Glomeruli hingegen teilt sich in die sogenannten Vasa recta. Diese verlaufen durch das Nierenmark und versorgen dieses mit Wasser, Ionen und Sauerstoff, so dass die Vasa recta schließlich in Venolen übergehen. Arteriell und venös weisen, die Kapillarnetzwerke der Glomeruli ausgenommen, in ihrem Aufbau eine grundlegende Analogie auf, so dass die venösen Gefäße schließlich in die Vena renalis münden, welche die Niere am Hilum verlässt (Kriz und Bankir, 1988; Stevens und Lowe, 1992; Tanner, 2008).

1.3.2 Das Nephron

Das Nephron besteht aus dem Nieren- oder Malpighi-Körperchen (*Corpusculum renale*, Abb. 1.3 a) und dem daran angeschlossenen Tubulussystem (Abb. 1.3 b). Es schließt den Glomerulus sowie den proximalen Tubulus mit ein, welcher über die Henle-Schleife mit dem distalen Teil des Tubulus verbunden ist (Abb. 1.3 b). Die Nephrone stellen den Ort der Ultrafiltration des Blutes dar und bilden damit die Blut-Harn-Schranke, und somit die Funktionseinheit der Niere. In den Nephronen wird die grundlegende Aufgabe des Organs ausgeführt, indem das Blut filtriert und der Harn produziert wird. Die winzigen Kapillaren der Glomeruli sind von einem fenestrierten Endothel umgeben. Durch Abfiltrieren des Blutplasmas entsteht das Ultrafiltrat, welches auch als Primärharn bezeichnet wird. Hierbei spielt die glomeruläre Filtrationsbarriere eine zentrale Rolle. Diese setzt sich aus eben diesen fenestrierten Endothelzellen, einer stark verdickten Basalmembran, dem Mesangium sowie den Zellen des visceralen Blattes der Bowmanschen Kapsel, den Podozyten, zusammen. Diese liegen den Kapillaren auf und bilden zwischen zwei Fußfortsätzen einen Filtrationsschlitz, der von einer Filtrationsschlitzmembran bedeckt wird und eine Barriere für größere Moleküle, wie hochmolekulare Proteine, darstellt.

Am Gefäßpol tritt die zuführende Arteriole (*Arteriola afferens*) in das Nierenkörperchen ein, verzweigt sich und bildet so die feinen Kapillaren des Glomerulus. Diese Kapillaren werden wieder zusammengeführt und verlassen das Nierenkörperchen als abführende Arteriole (*Arteriola efferens*; Abb. 1.3 a) wiederum am Gefäßpol.

Das Nierenkörperchen wird im Inneren von einem einschichtigen Plattenepithel, dem parietalen Blatt der Bowmanschen Kapsel, umgeben. Dieses geht am Gefäßpol in das viscerale Blatt über, welches auch die Kapillaren des Glomerulus umschließt.

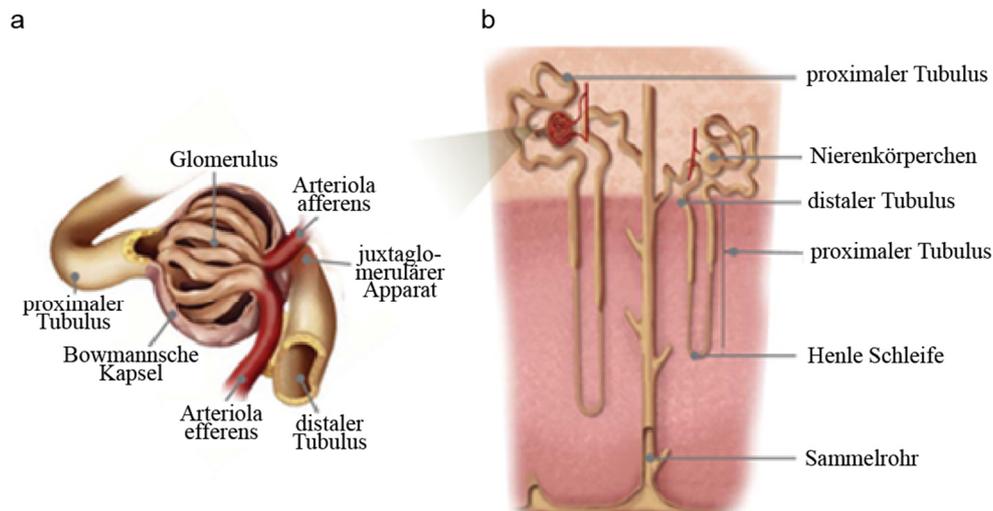


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines Nephrons.

Als funktionelle Einheit der Niere besteht das Nephron aus dem Nierenkörperchen und dem angeschlossenen Tubulussystem. (a) Das Nierenkörperchen wiederum besteht aus einem Glomerulus, welcher von der Bowmanschen Kapsel umhüllt wird. Am Harnpol verlässt der proximale Tubulus das Nierenkörperchen. Am Gefäßpol befinden sich Ein- bzw. Ausgang der Arteriolen afferens und efferens. Außerdem bildet die Arteriola afferens hier zusammen mit dem distalen Tubulus den juxtaglomerulären Apparat (vgl. 1.3.3). (b) Der Urin wird durch den proximalen Tubulus, die Henle Schleife und den distalen Tubulus in das Sammelrohr geleitet (modifiziert nach FET e.V., 2011).

Die Filtration des Blutes findet durch den Glomerulus statt. Das entstehende Ultrafiltrat wird zunächst in den Hohlraum der Bowmanschen Kapsel gepresst. Dann verlässt es das Nierenkörperchen am Harnpol, welcher dem Gefäßpol direkt gegenüber gelegen ist, in den proximalen Tubulus (Abb. 1.3 a). Dieser weist zunächst eine gewundene Form auf, die Pars convoluta. Als gerader Tubulusabschnitt schließt sich die Pars recta an. Die Weiterleitung erfolgt dann durch die Henle-Schleife in den distalen Tubulus, welcher zunächst aus einer Pars recta und dann aus einer Pars convoluta zusammengesetzt ist (Abb. 1.3 b). Hier wird durch Konzentrierung und Rückresorption bestimmter Substanzen (vgl. 1.3.1) der Endharn gebildet (Kriz und Bankir, 1988; Stevens und Lowe, 1992; Fox, 2006; Tanner, 2008).

1.3.3 Aufgaben der Niere

Die bedeutendste Aufgabe der Niere besteht unumstritten in der Filtration des Blutes, was eng mit der Produktion des Urins sowie der Regulation des Wasserhaushaltes in Verbindung steht. Die Filtration des Blutes wird innerhalb der Nierenkörperchen sowie den an äußere Bedingungen ausnehmend anpassungsfähigen Reabsorptionsmechanismus des Tubulussystems verwirklicht.

Zusätzlich zu diesen offensichtlichen Aufgaben ist die Niere außerdem für die Feinregulation des Blutdrucks verantwortlich. Dies erfolgt am Gefäßpol des Nierenkörperchen, wo sich eine Kontaktstelle von Arteriola afferens und Pars convoluta des distalen Tubulus befindet, welche als juxtaglomerulärer Apparat bezeichnet wird. Barorezeptoren der Arteriola afferens messen hier den aktuellen Blutdruck, während Zellen eines Chemorezeptors namens Macula densa den Konzentrationsgradienten der Ionen zwischen Blut und Urin ermitteln. So können beispielsweise ein verminderter Blutdruck, eine verringerte Flüssigkeitsmenge innerhalb der Nierenkörperchen sowie eine zu niedrige Chloridionen-Konzentration im Urin dazu führen, dass der sympathische Teil des vegetativen Nervensystems angesprochen wird. Zum sympathischen Nervensystem gehört unter anderem das Nebennierenmark. Dieses spielt eine große Rolle bei der Ausschüttung von Stresshormonen wie Adrenalin. Über diesen Botenstoff werden schließlich spezifische Zellen des juxtaglomerulären Apparats zur Freisetzung von Renin angeregt, so dass beispielsweise eine unzureichende Durchblutung der Niere erkannt und ausgeglichen werden kann. Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), durch die Freisetzung von Renin gestartet, katalysiert die Umwandlung von inaktivem Angiotensinogen zu Angiotensin I. Dieses wird in Angiotensin II umgewandelt und induziert die Produktion von Aldosteron in der Nebennierenrinde, was eine Vasokonstriktion sowie eine reduzierte Salzausscheidung zur Folge hat. In manchen Situationen kann es auch notwendig sein, dass Natriumionen und Wasser aus dem Primärharn reabsorbiert werden. Auch darüber werden letztendlich das Plasmavolumen und der Blutdruck reguliert. Eine Erhöhung der Adrenalin- oder Noradrenalin-Konzentration führt überdies zu Beeinträchtigungen der Nierenfunktion (Vander, 1965; Wathen et al., 1965; Gordon et al., 1967; de Champlain und van Ameringen, 1972; Axelrod und Reisine, 1984; Hackenthal et al., 1990; Stevens und Lowe, 1992; Koeners et al., 2008).

1.4 Die Embryonalentwicklung der Maus

Die Befruchtung der Eizelle stellt den Startpunkt der Embryonalentwicklung dar. Die entstandene Zygote beginnt nun mit den so genannten Furchungsteilungen. Dabei bleibt die Größe der Gesamtstruktur gleich, während immer mehr Zellen entstehen. Während der Teilung der Zellen des 8-Zell-Stadiums kommt es zur Kompaktion dieser Zellen. Das kompaktierte 16-Zell-Stadium wird demnach auch als Morula bezeichnet. Durch weitere Zellteilungen und die Bildung eines Blastocoels entwickelt sich daraus schließlich die Blastozyste. Die außen liegenden Zellen dieser Struktur werden als Trophoblast bezeichnet und bilden später extraembryonale Strukturen, wie

das Chorion, den embryonalen Teil der Plazenta. Aus den inneren Zellen der Blastozyste, welche als innere Zellmasse (ICM = *engl.: inner cell mass*) bezeichnet werden, entwickelt sich der Embryo. Während der folgenden Gastrulation werden durch das Einwandern von Zellen die drei Keimblätter Ekto-, Endo- und Mesoderm gebildet. Aus ihnen entstehen die verschiedenen Strukturen und Organe des Embryos. Ein weiterer wichtiger Schritt ist die Neurulation. Durch Auffaltungen des Neuroektoderms entwickelt sich anterior das Gehirn, während sich auf der dorsalen Seite des Embryos axial die Neuralfalten zu einem Neuralrohr schließen, welches letztendlich das Rückenmark bildet (Gilbert, 2006). Die Entwicklung der Organe aus dem jeweiligen Keimblatt ist sehr komplex. Im Folgenden soll hier die Nierenentwicklung in der Maus näher beschrieben werden.

1.4.1 Die murine Nephrogenese

Sowohl die Nieren als auch die Gonaden entstehen aus dem Urogenitalsystem, welches sich aus einem Teil des intermediären Mesoderms entwickelt. Die Nierenentwicklung ist paarig angelegt und wird dadurch induziert, dass ein Vorläufer des Wolffschen Ganges, der Vornierengang, auf eben dieses intermediäre Mesoderm trifft, welches dann als nephrogenes Mesenchym bezeichnet wird. Am Tag acht der murinen Embryonalentwicklung (E8.0) induziert das nephrogene Mesenchym die anterioren Zellen dieses Ganges zur Bildung mehrerer tubulusartiger Strukturen, welche in ihrer Gesamtheit als Pronephros (Vorniere) bezeichnet werden (Abb. 1.4 a). Hierbei handelt es sich um eine transiente Struktur, welche kurz darauf wieder zurückgebildet wird. Weiter caudal gelegene Strukturen des Vornierenganges hingegen bleiben erhalten. Dieser Teil wird nun als Wolffscher Gang bezeichnet und bildet später einen wichtigen Bestandteil des exkretorischen Systems. Während die Tubuli des Pronephros degenerieren, wird auf mittlerer Höhe des Wolffschen Ganges die Entstehung weiterer tubulusartiger Strukturen induziert. Diese ebenfalls transiente Form der Niere wird als Mesonephros (Urnier) bezeichnet (Abb. 1.4 b). Bei der Maus sind sowohl Pro- als auch Mesonephros zu keiner Zeit funktionsfähig. Ein Teil der mesonephrischen Tubuli ist allerdings an der Entwicklung der Gonaden beteiligt, der andere Teil degeneriert wieder.

Schließlich bildet sich ganz in der Nähe des caudalen Ursprungs des Wolffschen Ganges ein pronephrisches epitheliales Divertikel, die Ureterknospe. Diese induziert die Kondensation des umliegenden Mesenchyms, welches das metanephrogene Blastem bildet. Durch reziproke Inter-

aktion mit der Ureterknospe kommt es zu dichotomen Verzweigungen der Knospe, wodurch sich der Metanephros (Nachniere; Abb. 1.4 c), die endgültige Niere, entwickelt (Grobstein, 1955).

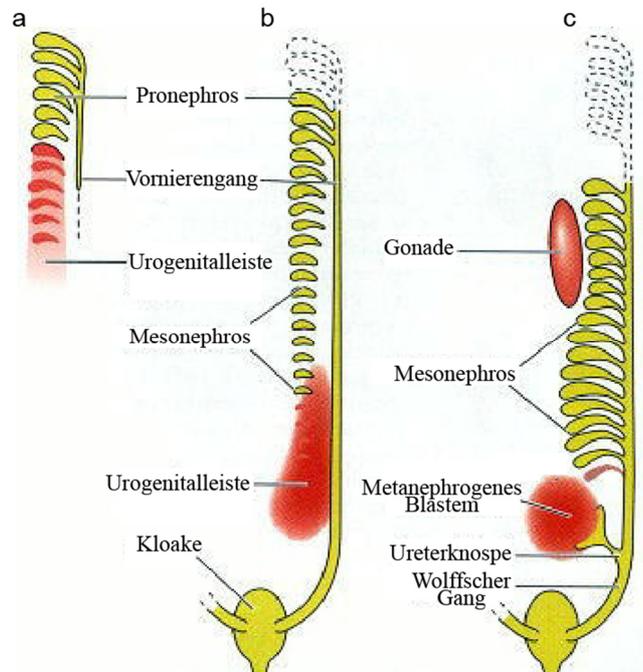


Abbildung 1.4: Nierenentwicklung.

Schematische Darstellung der verschiedenen Entwicklungsstadien der Niere. (a) Das nephrogene Mesenchym induziert die Entstehung des Pronephros. (b) Während dieser degeneriert, bildet sich weiter caudal der Mesonephros aus. (c) Nach dessen Degeneration entwickelt sich schließlich der Metanephros (modifiziert nach Gilbert, 2006).

Das metanephrogene Mesenchym induziert dabei das Auswachsen und Verzweigen der Ureterknospe (Abb. 1.5 a bis c). Die entwickelten Knospen hingegen induzieren ihrerseits das Mesenchym dazu, epitheliale Strukturen, die renalen Vesikel, zu bilden. Diese formen durch Proliferation und Differenzierung der Zellen zunächst Komma-förmige und später S-förmige rohrähnliche Glomeruli-Vorläufer (Abb. 1.5 d und e). Durch weitere Differenzierungsvorgänge in Zellen der Bowmanschen Kapsel, Podozyten und Tubuluszellen, entsteht aus einem solchen Rohr das Nierenkörperchen, welches zusammen mit dem angeschlossenen Tubulus das Nephron als Funktionseinheit der Niere bildet (Abb. 1.5 f). Jedes Nephron besteht demnach aus dem Glomerulus sowie den proximalen und distalen Tubuli, welche über die Henle-Schleife miteinander verbunden sind (Saxén et al., 1986; Saxén und Sariola, 1987; Vize et al., 1997; Dressler, 2006). Hier wird auch die Zahl der Nephrone und damit der Glomeruli festgelegt. Sie ist abhängig von der Anzahl der Verzweigungen der Ureterknospe und deren induktiver Kapazität (Cain et al., 2009).

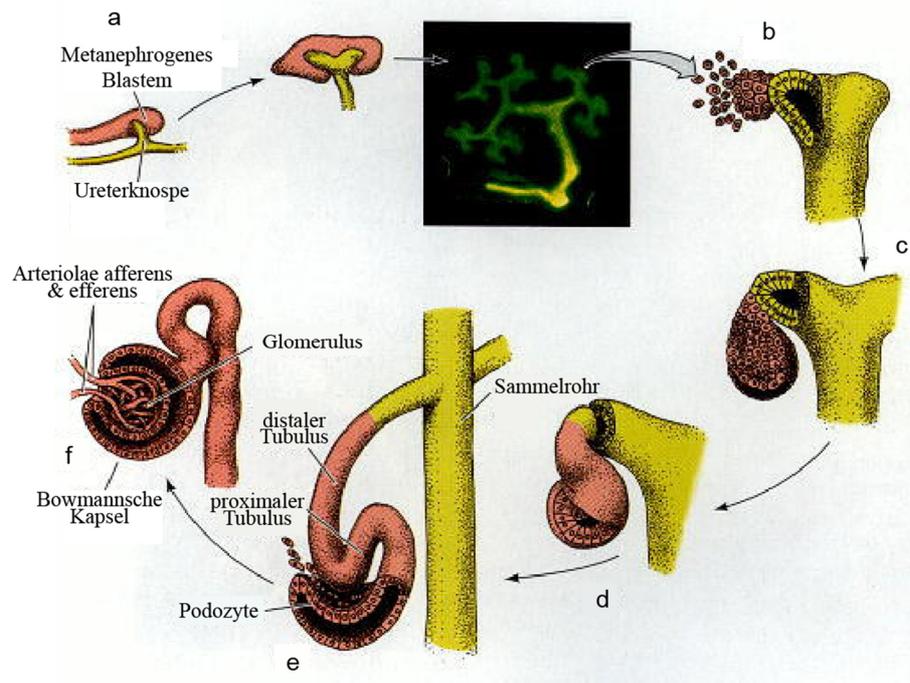


Abbildung 1.5: Entwicklung eines Glomerulus.

Schematische Darstellung der Glomerulumentwicklung. (a) Durch reziproke Interaktion von metanephrogenem Mesenchym und Ureterknospe kommt es zur Verzweigung derselben. (b, c) An der Spitze einer jeden Verzweigung kondensiert zunächst das Mesenchym zum sogenannten metanephrogenen Blastem. Aus diesem wird durch Kavitation zunächst ein renales Vesikel gebildet. Dieses entwickelt sich dann (d) zu einem Komma-förmigen und schließlich (e) zu einem S-förmigen Rohr, aus welchem (f) der Glomerulus mit seinem angeschlossenen Tubulussystem hervorgeht (modifiziert nach Gilbert, 2006).

Wenn die Maus (Hausmaus) nach etwa 20 Tagen geboren wird, ist die Entwicklung der Niere keineswegs abgeschlossen. Bis zum zehnten Tag nach der Geburt können immer noch Entwicklungsvorgänge die Niere betreffend stattfinden (Guron und Friberg, 2000; Dickinson et al., 2005).

1.4.2 Signalmoleküle während der Nierenentwicklung

Wichtig für Wachstums- und Musterbildungsprozesse während der Embryogenese sind entwicklungsbedingte Vorgänge innerhalb einer Zelle, aber auch die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen. Dies wird über die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren sowie die Sekretion von Signalmolekülen und damit zusammenhängender Transduktionskaskaden verifiziert. Es gibt einige allgemein bekannte Faktoren, welche während der Embryonalentwicklung eine zentrale Rolle spielen. Diese können in mehrere Gruppen untergliedert werden, von denen einzelne im Folgenden detaillierter beschrieben werden. Außerdem wird die Aufgabe spezifischer Faktoren dieser Gruppen bezüglich der Nierenentwicklung dargestellt.

1.4.2.1 *Hox*-Gene

Während der Embryonalentwicklung der Taufliege *Drosophila melanogaster* kommt es zur Ausbildung bestimmter Strukturen in ausgewählten Segmenten. Hierfür werden Transkriptionsfaktoren verantwortlich gemacht, welche von homöotischen Selektorgenen (*Hom-C*) codiert werden. Diese Art von Genen ist evolutionär hoch konserviert. So können im Mausembryo Homologe dieser Gene, die sogenannten *Hox*-Gene, gefunden werden. *Hom-C*- und *Hox*-Gene besitzen die für sie charakteristische Homöobox, welche für die Homöodomäne des Proteins kodiert. Bei der Maus gibt es vier Kopien des *Hox*-Komplexes (*Hoxa* bis *Hoxd*) auf vier verschiedenen Chromosomen. Diese werden jeweils durchnummeriert (*Hoxa-1* bis *Hoxd-13*) und aufgrund ihrer kollinearen Anordnung auf dem Chromosom nach eben dieser Reihenfolge exprimiert. Auf diese Weise strukturieren sie die anterior-posteriore Achsenbildung (Lewis, 1978; Martin et al., 1987; Duboule et al., 1990; Kessel und Gruss, 1990; Krumlauf, 1994).

Während der Nierenentwicklung in der Maus spielt die Expression der Paralogen des *Hox-11*-Komplexes (insbesondere *Hoxa-11*, *Hoxc-11* und *Hoxd-11*) ab dem Embryonalstadium (E)10.5 in Zellen des metanephrogenen Mesenchyms eine entscheidende Rolle. Die Expression dieser Gene führt letztendlich zur Differenzierung der mesenchymalen Zellen sowie zur Induktion der Verzweigungen der Ureterknospe (Patterson et al., 2001; Wellik et al., 2002).

1.4.2.2 Die TGF- β -Superfamilie

Zu einer Superfamilie gehören Gene, die sich in ihrer Struktur ähneln, aber für Proteine unterschiedlicher Funktionen codieren. Dennoch weisen die Proteine einer Superfamilie strukturelle Homologien auf. Die größte Untergruppe der TGF- β -Superfamilie (engl.: *transforming growth factor*) stellen die knochenmorphogenetischen Proteine (BMP = engl.: *bone morphogenetic protein*) dar. Proteine dieser Superfamilie bilden stets Homodimere und regulieren wichtige Interaktionsprozesse während der Embryonalentwicklung. Es gehören unter anderem die TGF- β -Familie, die Activine und Inhibine, aber auch GDNF (engl.: *glial cell derived neurotrophic factor*) dazu (Kingsley, 1994; Hogan, 1996; Eigenbrot und Gerber, 1997; Saarma, 2000; Waite und Eng, 2003). Der Großteil der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie bindet an Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren. Die Weiterleitung der Signale kann dabei sowohl über SMAD-Proteine (SMAD-abhängig) als auch über SMAD-unabhängige Mechanismen (ERK-, JNK- bzw. den p38 MAP-Kinase-Signalweg) verlaufen (SMAD = Portmanteauwort aus engl.: *small body size & mothers against decapentaplegic*). Ziel ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche

die Expression von Zielgenen induzieren (Massague et al., 1992; Lin und Lodish, 1993; Kingsley, 1994; Heldin et al., 1997; Kretzschmar und Massague, 1998; Derynck et al., 2001; Miyazawa et al., 2002; Shi und Massague, 2003; Miyazono et al., 2005; Anderson und Darshan, 2008). Eine Ausnahme bildet hier GDNF. Es bindet an eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) namens RET. Vermittelt wird die Bindung an RET durch den GDNF family receptor factor alpha 1 (GFR α 1), welcher sich auf der Oberfläche der Zielzelle befindet (Durbec et al., 1996; Jing et al., 1996; Treanor et al., 1996). In beiden Fällen kommt es zunächst zu Phosphorylierungsschritten (vgl. 1.4.2.5), welche schließlich eine Signaltransduktionskaskade in Gang setzen (Heldin, 1995; Josso und di Clemente, 1997).

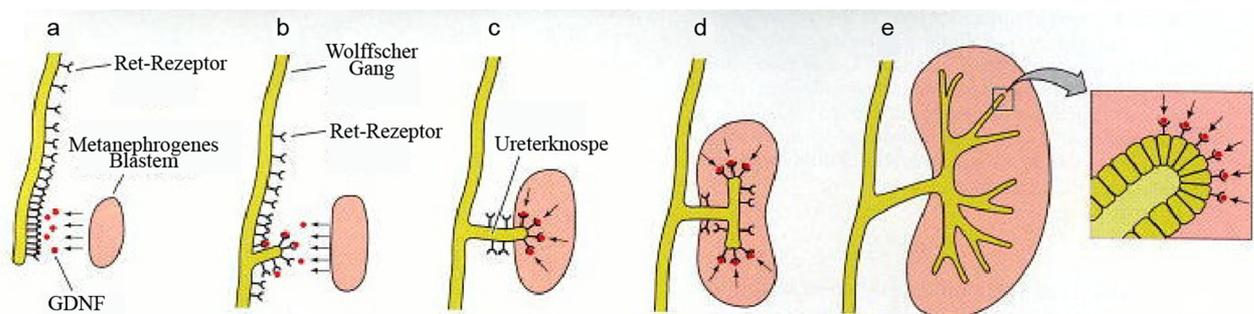


Abbildung 1.6: Induktion des Auswachsens der Ureterknospe über GDNF und RET.

Schematische Darstellung der Induktion der Ureterknospenbildung durch das metanephrogene Blastem. (a) RET-Rezeptoren werden von Zellen des Wolffschen Ganges exprimiert, sind allerdings in konzentrierter Form im caudalen Bereich zu finden. Zellen des nephrogenen Mesenchyms exprimieren GDNF, welches besonders dort an RET-Rezeptoren bindet. (b, c) Dies induziert das Auswachsen der Ureterknospe, auf welcher dann ausschließlich Rezeptoren exprimiert werden. (d, e) Die fortgesetzte Expression von GDNF führt zur weiteren Verzweigung der Knospe (modifiziert nach Gilbert, 2006).

GDNF wird in der sich entwickelnden Niere von Zellen des metanephrogenen Mesenchyms exprimiert, welche sich in der Nähe des auswachsenden Ureters befinden (Abb. 1.6 a). Über die Bindung an GFR α 1 und RET entfaltet es seine Wirkung als Ramogen, indem es die dichotomen Verzweigungen der Ureterknospe induziert (Abb. 1.6 b-e). Die GDNF/RET-Signalkaskade ist der initiale Schritt für die Bildung dieser Ausknospungen (Vega et al., 1996; Sainio et al., 1997; Tang et al., 1998; Davies und Davey, 1999). Da GDNF seine Funktion über die Bindung an RET verwirklicht, kommt es ausschließlich zur Mitose RET-exprimierender Zellen. Ein Fehlen von RET führt daher zur Ausbildung asymmetrischer Verzweigungen (Shakya et al., 2005). Diese Kaskade hat zur Folge, dass Zellen der Ureterknospe Faktoren exprimieren, welche das Mesenchym zur Bildung renaler Vesikel veranlassen. Da sich jedes Vesikel zu einem Nephron weiterentwickelt,

ist also die Expression von *Gdnf* und *Ret* maßgeblich für die Anzahl der entstehenden Glomeruli (Durbec et al., 1996; Hellmich et al., 1996; Pichel et al., 1996; Pepicelli et al., 1997; Dressler, 2006).

1.4.2.3 Hedgehog-Proteine

Für Wachstums- und Musterbildungsprozesse während der Embryonalentwicklung sind Moleküle der Hedgehog (Hh)-Familie in besonderem Maße wichtig. In Säugetieren sind drei Homologe des in *Drosophila* gefundenen *Hedgehog*-Gens bekannt: *Desert hedgehog* (*Dhh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*) und *Sonic hedgehog* (*Shh*) (Echelard et al., 1993; Ingham und McMahon, 2001; Hooper und Scott, 2005). DHH spielt beispielsweise in der Spermatogenese eine wichtige Rolle, während IHH insbesondere beim Knochenwachstum benötigt wird (Bitgood und McMahon, 1995; Bitgood et al., 1996). SHH hat als Morphogen zahlreiche Aufgaben bei der pränatalen Entwicklung inne. Unter anderem ist es bei der Musterbildung von Neuralrohr, Somiten und Gliedmaßen von elementarer Bedeutung (Riddle et al., 1993; Yamada et al., 1993; Fan und Tessier-Lavigne, 1994). Eine Besonderheit des SHH-Proteins ist die posttranslationale Modifikation, wodurch es erst zu einer Aktivierung des Moleküls kommt. Diese Aktivierung erfolgt nach autokatalytischer Spaltung des Moleküls durch das Anhängen eines Cholesterolrestes am C-Terminus und eines Palmitats am N-Terminus des entstandenen N-terminalen Restes. Der Cholesterolrest spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit dem Rezeptormolekül (Porter et al., 1995; 1996; Pepinsky et al., 1998; Lewis et al., 2001). Bindet SHH an den Transmembranrezeptor Patched1 (PTCH1), lässt dieser das Transmembranprotein Smoothed (SMO), dessen Aktivität er bis dahin inhibiert hat, frei. Durch die Aktivierung von SMO kann das SHH-Signal über GLI-Transkriptionsfaktoren (GLI1, GLI2 und GLI3; GLI = engl.: *glioma-associated oncogene homolog*) weitergeleitet werden. GLI2 und GLI3 können posttranslational in eine Aktivator- oder eine Repressorform modifiziert werden (Marigo et al., 1996a; 1996b; Denef, 2000; Ingham und McMahon, 2001; Hooper und Scott, 2005). GLI1 und GLI2 fungieren in der Regel als Transkriptionsaktivatoren, während GLI3 vorwiegend als Repressor (GLI3^R) auftritt. Die Weiterleitung des SHH-Signals erfolgt indes über die Aktivatorformen von GLI2 und GLI3, welche zunächst die Expression von GLI1 induzieren. Dieses wiederum wirkt als Aktivator der Expression von SHH-Zielgenen (Dai et al., 1999; Sasaki et al., 1999; Bai et al., 2002; Pan et al., 2006; Stecca et al., 2010). In Vertebraten ist der SHH-Signalweg an Zilien gekoppelt. Daher können Ziliendefekte oder Fehler im ziliären Transport schwerwiegende Folgen haben, welche nicht selten in einem

völligen Verlust der Signalkaskade resultieren (Haycraft et al., 2005; Huangfu und Anderson, 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005).

In der Nephrogenese spielt der SHH-Signalweg eine zentrale Rolle. Als parakriner Faktor, der vom Urothel des distalen, sich nicht-verzweigenden Sammelrohrs exprimiert wird, bildet SHH in Richtung Kortex einen Konzentrationsgradienten innerhalb der sich entwickelnden Nierenstrukturen aus, welcher außerordentlich wichtig für die Bildung von Nephronen ist. An Orten hoher SHH-Konzentration ist außerdem eine Hochregulierung der Expression von PTCH1 und GLI1 zu erkennen. In kortikalen Bereichen hingegen, wo die SHH-Konzentration geringer ist, wird GLI3 in seine Repressorform prozessiert und beeinflusst die Anzahl der Nephronen über die Regulation der Expression von *Ret* und *Wnt11* in den Spitzen der Ureterknospe (Grindley et al., 1997; Hynes et al., 1997; Lee et al., 1997; Yu et al., 2002; Cain et al. 2009).

1.4.2.4 WNT-Moleküle

Ein weiteres Beispiel für Morphogene, welche durch die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten an verschiedenen Entwicklungsprozessen im Embryo beteiligt sind, sind die WNT-Moleküle. Die Bezeichnung *Wnt* stellt eine Zusammensetzung des in *Drosophila* gefundenen Gens *wingless* und des in Vertebraten entdeckten Homologs *int* dar (Rijsewijk et al., 1987; Nusse et al., 1991). Bisher sind 19 verschiedene *Wnt*-Gene bekannt, welche unterschiedliche Prozesse während der Embryonalentwicklung kontrollieren, bei denen es auch zu Zell-Zell-Interaktionen kommen kann. Das WNT-Signal kann entweder über einen Frizzled (Fz)-Transmembranrezeptor oder einen Low Density Lipoprotein Related Receptor (LDLR) an ein Dishevelled-Protein (DSH) im Zytoplasma übermittelt werden. Dieses wird phosphoryliert und kann so Signalweg-abhängige Ereignisse in der Zelle auslösen. Dabei können zwei unterschiedliche WNT-Signalwege, der nicht-kanonische und der β -Catenin-abhängige kanonische Signalweg, charakterisiert werden.

Der nicht-kanonische WNT-Signalweg kann außerdem in mehrere Arten der Signaltransduktion unterschieden werden. Beim WNT/PCP-Signalweg können über PCP-Proteine (*engl.: planar cell polarity*) Änderungen der planaren Zellpolarität vermittelt werden. Dies hat schließlich eine Aktivierung der kleinen G-Proteine Rac und Rho zur Folge, wodurch letztendlich das Aktin-Zytoskelett modifiziert werden kann. Überdies sei noch der WNT/ Ca^{2+} -Signalweg zu erwähnen. Hier führt die Bindung eines WNT-Moleküls an den Liganden zu einem Phospholipase C-vermittelten intrazellulären Calcium-Anstieg. Bei diesem Signalweg kommt es zur Inhibierung von β -Catenin (De, 2011).

Beim kanonischen WNT-Signalweg hingegen bewirkt DSH durch die Inhibierung von Gsk3 β (Glykogen-Synthase-Kinase 3 β) zunächst die Stabilisierung von β -Catenin, wodurch dieses in den Zellkern transportiert wird und dort über die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie die Expression spezifischer Zielgene induziert (Croce und McClay, 2008; Angers und Moon, 2009). Dieser Signalweg spielt bei der Induktion des metanephrogenen Mesenchyms eine entscheidende Rolle (Perantoni, 2003). Die GDNF/RET-Signalkaskade (vgl. 1.4.2.2) induziert unter anderem die Expression von *Wnt11* in den Spitzen der Ureterknospen. WNT11 wiederum reguliert die Expression von *Gdnf* im metanephrogenen Mesenchym, so dass es hier zu einer positiven autoregulatorischen Rückkopplungsschleife kommt, welche für eine normale Nierenentwicklung unentbehrlich ist, da hierdurch die dichotome Verzweigung der Ureterknospe kontrolliert wird (Kispert et al., 1996; Pepicelli et al., 1997; Sainio et al., 1997; Majumdar et al., 2003).

1.4.2.5 Fibroblasten-Wachstumsfaktoren

Eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Differenzierung von Zellen spielen auch Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF = engl.: *fibroblast growth factor*). Hierbei handelt es sich um parakrine Moleküle, welche an spezifische Rezeptoren (FGFR = FGF-Rezeptor) binden und so eine Signalkaskade auslösen. Diese Rezeptoren befinden sich in der Zellmembran und besitzen an ihrer zytoplasmatischen Domäne eine Tyrosin-Kinase-Funktion. Daher werden sie allgemein hin als RTKs (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen) bezeichnet. Bindet nun ein FGF-Molekül an seinen Rezeptor, kommt es zur Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle, was eine Aktivierung der Kinase zur Folge hat. Es folgt zunächst eine Autophosphorylierung der Rezeptormoleküle. Außerdem kommt es zur Transduktion des Signals, beispielsweise über eine mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), so dass bestimmte Proteine innerhalb der Zelle ebenfalls phosphoryliert werden, darunter auch andere FGF-Rezeptoren. Das aktivierte Protein seinerseits kann weitere Funktionen in der Zelle auslösen, beispielsweise die Transkription bestimmter Zielgene (Klagsbrun, 1989; Coleman et al., 2014).

Während der murinen Nierenentwicklung kommt es zur Expression verschiedener FGF-Proteine. Als Beispiel sei hier FGF8 genannt. Es konnte gezeigt werden, dass *Fgf8* vom Zeitpunkt E12.0 bis E18.5 innerhalb des Kortex zunächst von Zellen der renalen Vesikel, welche an die entstandenen Ureterknospen angrenzen, später von epithelialen Zellen und tubulären Vorläufern der sich entwickelnden Nephrone exprimiert wird. Es wird dort während der frühen Nephrogenese für das

Überleben der Nephron-Progenitorzellen und so letztendlich für die Entstehung S-förmiger Glomeruli-Vorläufer sowie für die vollständige Ausbildung der Tubuli benötigt. Somit ist die Expression von *Fgf8* wie die von *Gdnf/Ret* und *Wnt11* maßgeblich an der Entstehung der Nephrone beteiligt und hat letztendlich ebenfalls Einfluss auf deren Anzahl (Grieshammer et al., 2005; Chi et al., 2013).

1.5 Das „*fat mass and obesity associated*“ (*Fto*) Gen

Zum ersten Mal wurde *Fto* im Jahr 1999 als Teil der Deletion in der *Fused toes (Ft)* Maus-Mutante beschrieben (Peters et al., 1999). Durch eine Insertionsmutagenese entstand dabei auf Chromosom 8 eine 1,6 Megabasen große Deletion, welche neben fünf weiteren Genen auch *Fto* mit einschließt. *Fto* ist dabei das größte der Gene dieser Deletion. Es wird ubiquitär exprimiert und kodiert für ein 58 kDa großes Protein mit einer Länge von 502 Aminosäuren, welches über eine N-terminale Zellkernlokalisationssequenz (NLS = engl.: *nuclear localisation signal*) im Zellkern lokalisiert ist. Außerdem ist FTO sowohl in Vertebraten als auch in Algen hoch konserviert (van der Hoeven et al., 1994; Lesche et al., 1997; Peters et al., 1999 und 2002; Frayling et al., 2007; Gerken et al., 2007; Sanchez-Pulido und Andrade-Navarro, 2007; Robbens et al., 2008).

1.5.1 Das humane *FTO*

Beim Menschen ist das *FTO*-Gen auf Chromosom 16 lokalisiert. In verschiedenen unabhängigen genomweiten Assoziationsstudien (GWAS = engl.: *genome-wide association studies*) konnte ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen (SNPs = engl.: *single nucleotide polymorphisms*) des ersten Introns und einem erhöhten BMI sowie einer gesteigerten Anfälligkeit für Adipositas gezeigt werden. Für das Risikoallel homozygote Individuen wiegen demnach durchschnittlich drei Kilogramm mehr und besitzen ein 1,67-fach erhöhtes Risiko, an Adipositas zu erkranken, als Individuen, die das Risikoallel nicht tragen. Außerdem konnten diese Polymorphismen mit Symptomen von Adipositas, wie einem erhöhten Leptinspiegel, Diabetes mellitus Typ 2, einem gesteigerten Körperfettanteil und Blutdruck sowie einem erhöhten Verhältnis von Taille zu Hüfte (WHR = engl.: *waist-hip ratio*), in Verbindung gebracht werden (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007; Scott et al., 2007; Scuteri et al., 2007; Andreasen et al., 2008; Olza et al., 2013; Vasan et al., 2013).

Bereits im Alter von zwei Wochen weisen Säuglinge, die ein Risikoallel tragen, ein erhöhtes Körpergewicht auf. Auch führt der Besitz eines Risikoallels im Kindesalter zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme (López-Bermejo et al., 2008; Wardle et al., 2009).

Ferner wird vermutet, dass Hunger- und Sättigungsgefühl mit der Expression von *FTO* in engem Zusammenhang stehen (Wardle et al., 2009). Daneben ist außerdem das Auftreten von Adipositas und Herz-Kreislaufkrankungen, wie Bluthochdruck, eng mit dem Vorhandensein bestimmter *FTO*-Risikoallele verbunden (Pausova et al., 2009; Hubacek et al., 2010; Lappalainen et al., 2010). Auch chronisches Nierenversagen wird mit dem Auftreten verschiedener Risikoallele in Verbindung gebracht (Hubacek et al., 2012; Spoto et al., 2012).

Weitere Studien mit Bevölkerungsgruppen verschiedener ethnischer Herkunft konnten einige dieser Befunde bestätigen (Hotta et al., 2008; Peeters et al., 2008; Tan et al., 2008; Villalobos-Comparán et al., 2008; Cornes et al., 2009).

1.5.2 Das murine *Fto*

In der Maus konnte nach dem Fressen eine erhöhte *Fto*-Expression im Nucleus arcuatus (ARC) des Hypothalamus nachgewiesen werden, welcher bei der Regulierung des Sättigungsgefühls eine große Rolle spielt. Bekamen die Mäuse über einen längeren Zeitraum kein Futter, kam es hingegen zu einer Reduktion der *Fto*-Expression (Gerken et al., 2007; Stratigopoulos et al., 2008). Analysen an Ratten wiesen konträre Ergebnisse auf (Fredriksson et al., 2008). Ganz allgemein liegt hier allerdings ebenfalls ein Zusammenhang zwischen *Fto* und Hunger- bzw. Sättigungsgefühl vor.

Über die Generierung und Analyse einer *Fto*^{-/-}-Mausmutante, welche im nächsten Abschnitt (1.5.3) näher beschrieben wird, konnte außerdem festgestellt werden, dass FTO eine Rolle in der Wachstumsregulierung und im Energiehaushalt spielt und dass die Inaktivierung von *Fto* vor Fettleibigkeit schützt (Fischer et al., 2009). Auch Analysen von *Fto*-überexprimierenden Mäusen deuten darauf hin, dass die Expression von *Fto* eng mit Nahrungsaufnahme und Energieumsatz verknüpft ist (Church et al., 2010).

1.5.3 Die *Fto*-Mausmutante

Um Rückschlüsse auf die Funktion von FTO ziehen zu können, wurde am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch die

Inaktivierung von *Fto* eine *Fto*^{-/-}-Maus generiert (Fischer et al., 2009). Dies geschah über gezielte Genmodifikation (vgl. Capecchi, 1989). Dabei wurden die Exons zwei und drei über homologe Rekombination gegen eine Neomycin-Resistenzkassette ausgetauscht (Fischer et al., 2009).

Bereits ab dem zweiten Tag nach der Geburt sind *Fto*^{-/-}-Mäuse aufgrund einer Größen- und Gewichtsreduktion von ihren wildtypischen (*Fto*^{+/+}) Geschwistern unterscheidbar. Diese Retardation des Wachstums fundiert auf einer Reduktion sowohl der Fett- als auch der fettfreien Körpermasse sowie einer Verkleinerung der Adipozyten. Außerdem konnte eine damit zusammenhängende Reduktion der Leptinkonzentration im Blut nachgewiesen werden. Die Wachstumsretardation prägt sich während der Entwicklung weiter aus und ist so im adulten Tier noch intensiver zu erkennen. Männliche Mäuse weisen dabei in der Regel deutlichere Unterschiede auf als weibliche. Für *Fto* heterozygot mutante Mäuse (*Fto*^{+/-}) zeigen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern keine signifikanten Unterschiede (Fischer et al., 2009).

Bezogen auf Körpergröße und -gewicht ist bei *Fto*^{-/-}-Mäusen eine relative Hyperphagie zu erkennen. Außerdem konnten neben einem verminderten Aktivitätsmuster ein gesteigerter Energieumsatz sowie eine gesteigerte Aktivierung des sympathischen Nervensystems dokumentiert werden. Diese geht einher mit einer erhöhten Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentration im Plasma dieser Mäuse (Fischer et al., 2009). Bei Verhaltensanalysen konnten auch eine gesteigerte Nervosität und Stressanfälligkeit nachgewiesen werden, die von einer erhöhten Corticosteron-Konzentration im Blut untermauert wird (Spsychala, 2012).

Bestimmte phänotypische Auswirkungen von Mutationen sind auf unterschiedliche genetische Hintergründe zurückzuführen (Gerlai, 2001; Wolfer et al., 2002). Dies gilt auch in Bezug auf das Fehlen von FTO. Besonders eine erhöhte neonatale Sterblichkeit der *Fto*^{-/-}-Tiere zeigt eine große Abhängigkeit vom Mausstamm. *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI-Hintergrund (NMRI = *Naval Medical Research Institute*) verstarben öfter kurz nach der Geburt als *Fto*^{-/-}-Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund. Hierfür werden besonders Entwicklungsdefekte der Lunge verantwortlich gemacht. Aber auch das Skelett der *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI-Hintergrund weist Veränderungen im Bereich der Hintergliedmaßen und des Brustkorbs auf (Jäger, 2012). Auch wurde beschrieben, dass das Einkreuzen des NMRI-Hintergrundes, welches zu einem genetischen Mischhintergrund (C57BL/6/NMRI) führte, bei *Fto*^{+/-}-Mäusen mit Leptin-Defizienz eine Glukosurie zur Folge hat (Ikels, 2013).

Molekulare Analysen haben in Rumpfen von *Fto*^{-/-}-Mäusen des Embryonalstadiums 11.5 eine verringerte GLI3^R-Menge gezeigt (Jäger, 2012). Im Stadium E14.5 dagegen wurde beobachtet, dass in Nieren von *Fto*^{-/-}-Embryonen mehr GLI3 in die Repressorform prozessiert wird als bei deren wildtypischen Geschwistern (Samper Agrelo, 2012).

Des Weiteren ist die Expression von Nephrin in Nieren adulter weiblicher *Fto*^{-/-}-Mäuse erhöht (Samper Agrelo, 2012). Nephrin wird ausschließlich von Podozyten der renalen Glomeruli exprimiert und ist essentiell für Aufbau und Funktion der Filtrationsschlitzmembran (Kestilä et al., 1998; Holzman et al., 1999; Lenkkeri et al., 1999). Fluoreszenzanalysen von Nephrin deuten außerdem darauf hin, dass die Fläche der einzelnen Glomeruli in *Fto*^{-/-}-Mäusen verkleinert ist (Samper Agrelo, 2012). Demgegenüber konnte sowohl eine verstärkte Vaskularisierung der Niere als auch eine erhöhte Glomerulidichte bei weiblichen *Fto*^{-/-}-Mäusen in anterioren und posterioren sowie mittleren Nierenbereichen einer transversal geschnittenen Niere gezeigt werden, womit auch die Gesamtfläche der Glomeruli, und damit die Filtrationsfläche, bezogen auf die Gesamtfläche der Nieren von *Fto*^{-/-}-Mäusen größer ist (Zingsem, 2010). Die aufgrund des Zusammenhangs zwischen Nephronzahl und Blutdruck (Brenner et al., 1988; Keller et al., 2003; Koeners et al., 2008) durchgeführten Puls- und Blutdruckmessungen ergaben für eine recht kleine Anzahl an weiblichen Versuchstieren einen erhöhten Puls bei *Fto*^{-/-}-Mäusen und wiesen auf einen erniedrigten Blutdruck hin. Auch waren die pH-Werte des 24h-Urins dieser Tiere niedriger als bei wildtypischen Mäusen (Zingsem, 2010).

1.5.4 Untersuchungen von *Fto*-defizientem Gewebe

Nachdem veränderte GLI3-Mengen in unterschiedlichen embryonalen Geweben gefunden wurden (Samper Agrelo, 2012; Jäger, 2012), konnten zusätzlich durchgeführte Untersuchungen an *Fto*^{-/-}-MEFs (*engl.: mouse embryonic fibroblasts*) zudem darauf hinweisen, dass die Aktivierung des Shh-Signalwegs beim Fehlen von FTO wesentlich sensitiver verläuft (Jäger, 2012).

Microarray-Analysen mit MEFs zeigen außerdem Veränderungen in der Expression von Genen, die mit der Angiogenese in engem Zusammenhang stehen.

Ferner liefern Daten von Microarray-Analysen für weißes Fettgewebe (WAT = *engl.: white adipose tissue*) Hinweise auf eine veränderte Expression von Genen, die mit beiden WNT-Signalwegen assoziiert sind (unveröffentlichte Daten von J. Fischer).

1.5.5 Funktionen von FTO

Eine grundlegende Funktion von FTO ist noch nicht bekannt. Es konnten allerdings Ähnlichkeiten mit Sequenzmotiven von Eisen-II- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Oxygenasen gefunden werden. Von FTO oxidativ katalysierte Demethylierungen von 3-Methyl-Thymin und 3-Methyl-

Uracil in einzelsträngigen DNA- und RNA-Molekülen konnte eine Zugehörigkeit zur nicht-Häm-Eisen-II- und α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenase-Superfamilie bestätigen. Auch konnte eine Funktion als N6-Methyladenosin-RNA-Demethylase nachgewiesen werden (Gerken et al., 2007; Sanchez-Pulido und Andrade-Navarro, 2007; Jia et al., 2008 und 2011). Eine Aufgabe der Mitglieder dieser Superfamilie ist die Genregulation durch die Reparatur der DNA sowie epigenetische und posttranslationale Modifikationen (Ozer und Bruick, 2007). Die Lokalisation von FTO im Kern beschränkt sich in manchen Fällen auf sogenannte Kernflecken (*nuclear speckles*), mit denen es vermutlich zu einer dynamischen Interaktion kommt. In diesen Kernflecken wird auch eine N6-Methyladenosin-RNA-Methyltransferase vermutet. Es wird angenommen, dass der Methylierungsstatus der mRNA koordinativ von FTO und ebenjener Methyltransferase reguliert wird (Sanchez-Pulido und Andrade-Navarro, 2007; Jia et al., 2011; Berulava et al., 2013).

Jüngste Studien führen überdies zu der Annahme, dass FTO an der Messung des zellulären Aminosäuregehalts beteiligt ist, was Rückschlüsse auf eine Beteiligung an der Proteinbiosynthese zulässt (Cheung et al., 2013; Gulati et al., 2013). Auch eine Rolle im mTORC1-Signalweg (*engl.: mammalian target of rapamycin complex 1*), welcher in die Kontrolle der Nahrungsaufnahme involviert ist, wird FTO zugeschrieben (Cota et al., 2006; Gulati et al., 2013).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Bisherige Analysen konnten zeigen, dass das Fehlen von FTO Auswirkungen auf die Entwicklung einzelner Organe und Strukturen hat. Dies scheint mit der Regulation der Expression einiger Gene einherzugehen. Hier sind beispielsweise Erbfaktoren, die mit der Angiogenese in engem Zusammenhang stehen, betroffen. Die Niere ist ein sehr stark vaskularisiertes Organ. Während der Nephrogenese bilden die kleinsten Kapillaren die Glomeruli als Teil der Nephrone. Deren Anzahl und Funktion ist entscheidend für die Filtration des Blutes, die Produktion und Zusammensetzung des Urins und die Regulation des Blutdrucks. Zudem wird der Verlust von FTO mit einem veränderten Metabolismus assoziiert, während die Niere für Stoffwechselprozesse von ausschlaggebender Bedeutung ist. Auch besteht ein Zusammenhang zwischen FTO und Fettleibigkeit sowie zwischen gewissen Nierenerkrankungen und Adipositas. In dieser Arbeit sollen daher mögliche histologische Veränderungen und funktionelle Abweichungen der Nieren von *Fto*^{-/-}-Mäusen analysiert werden. Da der genetische Hintergrund einen Einfluss auf die Auswirkungen des FTO-Defizits haben kann, wurden diese Untersuchungen an Mäusen zweier unterschiedlicher Linien durchgeführt.

2. Material und Methoden

Die für die Methoden dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Applichem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Promega (Heidelberg, Deutschland), Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

Soweit erforderlich, erfolgte eine Sterilisierung der verwendeten Lösungen, Gefäße und Verbrauchsmaterialien durch Autoklavieren bei 121°C und 2 bar für 30 Minuten.

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit hochreinem Wasser aus der Millipore-MilliQ-Anlage nach Sambrock et al. (1989) angesetzt.

Nicht gesondert erwähnte Verbrauchsmaterialien und Geräte gehören zur standardmäßigen Grundausstattung eines molekularbiologischen Labors.

2.1 Arbeiten mit Mäusen

2.1.1 Tierhaltung

Die Mäuse, welche in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden in der Tierversuchsanlage der medizinischen Einrichtung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet und gehalten. Es wurden sowohl Mäuse auf NMRI-Hintergrund als auch Tiere aus Kreuzungen von Mäusen auf C57BL/6- mit Mäusen auf NMRI-Hintergrund (sogenannte BN-Mäuse) analysiert. Dabei wurden jeweils $Fto^{+/-}$ -Männchen mit $Fto^{+/-}$ -Weibchen verpaart. Die $Fto^{+/-}$ -Mäuse wurden im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf generiert (Fischer et al., 2009).

Die hier beschriebenen Untersuchungen an adulten Mäusen wurden zunächst auch mit einer geringen Anzahl an $Fto^{+/-}$ -Tieren durchgeführt. Da hier jedoch eine große Ähnlichkeit zu wildtypischen Mäusen zu erkennen war, wurde der Fokus auf Unterschiede zwischen den beiden anderen Genotypen gelegt. Als Konsequenz sind diese Daten in der vorliegenden Arbeit nicht mit aufgeführt.

2.1.2 Präparation von embryonalen Nieren

Nach erfolgreicher Verpaarung, welche durch einen Vaginalpfropf am Embryonaltag (E) 0.5 versichert wurde, wurde das Muttertier am Tag des gewünschten Embryonalstadiums durch zervikale Dislokation getötet. Die Embryonen wurden aus dem Uterus frei präpariert und in eiskaltes PBS überführt. Die Präparation der Nieren erfolgte unter einem Durchlichtmikroskop (Axioskop, Zeiss). Für die Isolation genomischer DNA wurde, um später eine Genotypisierung durchführen zu können, hierbei zunächst die Schwanzspitze abgetrennt. Die Nieren von Embryonen der Stadien E14.5, E15.5, E16.5 und E18.5 wurden einzeln entnommen. Alle rechten Nieren wurden für die Einbettung in Paraffin (siehe 2.3.1) in 4%iges PFA überführt und über Nacht bei 4°C fixiert. Die linken Nieren wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3; autoklaviert	Prolabo #27810.295
4% PFA	4% Paraformaldehyd (w/v) in PBS	Grüssing #13203

2.1.3 Präparation der Nieren von adulten Tieren

Männliche und weibliche Mäuse mit NMRI- und BN-Hintergrund wurden im Alter von drei bis vier Monaten durch zervikale Dislokation getötet. Die Nieren wurden entnommen, von umliegendem Fett frei präpariert, gewogen und in PBS überführt. Unter einem Stereomikroskop mit Kamera (AxioCam MRc, Zeiss) wurden die Nieren jeweils so positioniert, dass sowohl die breite (zur Messung von Länge und Breite der Niere) als auch die schmale Seite (zur Messung der Tiefe der Niere) fotografiert werden konnte. Anhand dieser Fotos konnte annähernd das Volumen der Nieren berechnet werden (siehe 2.4). Auch hier wurden die rechten Nieren für die Paraffineinbettung (siehe 2.3.1) in PFA überführt und über Nacht bei 4°C fixiert, während die linken Nieren in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden.

Verwendete Lösungen:

PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O 150 mM NaCl pH 7,3; autoklaviert
4% PFA	4% Paraformaldehyd (w/v) in PBS

2.1.4 Nicht-invasive Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung erfolgte nicht-invasiv mit Hilfe einer Schwanzmanschette. Hierzu wurde ein Blutdruckmessgerät von Visitech Systems verwendet, welches freundlicherweise vom Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf bereitgestellt wurde.

Es wurden Blutdruck und Pulsfrequenz von $Fto^{+/-}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäusen mit NMRI- und BN-Hintergrund im Alter von sechs, 16 und 30 Wochen gemessen. Die Messung erfolgte im Dunkeln. Die Mäuse wurden dazu auf ein 32-36°C warmes Podest gesetzt und mit einer nach vorne hin offenen Box bedeckt, welche am hinteren Ende eine kleinere Öffnung aufweist, durch welche der Schwanz hindurchgesteckt wurde. Die Manschette wurde an der Schwanzwurzel platziert. Der Schwanz selbst wurde durch einen Infrarotsensor gelegt, wodurch der Puls gemessen werden konnte, und am Ende mit Klebeband fixiert. Zunächst fand an fünf aufeinanderfolgenden Tagen eine Übungsphase statt, wobei täglich zur gleichen Zeit drei Mal hintereinander jeweils zehn Messungen durchgeführt wurden. Nach zwei Tagen Pause wurde auf die gleiche Weise erneut an fünf aufeinanderfolgenden Tagen gemessen.

2.1.5 Blutentnahme

Im Alter von sieben, 17 und 31 Wochen wurde den Mäusen Blut abgenommen. Dies erfolgte in Form einer Punktion des retrobulbären Venenplexus unter Isofluran-Betäubung. Um eine Gerinnung des Blutes zu vermeiden, wurde die Innenfläche der Pasteur-Pipette (Brand, #747720) zunächst mit Heparin in 0,9%iger Kochsalzlösung benetzt. Das Blut wurde innerhalb von zwei Stunden nach Entnahme für 20 Minuten bei 2000 x g abzentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415D). Vom abgenommenen Plasma wurde die Kreatininkonzentration bestimmt (siehe 2.1.7). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Verwendete Lösungen:

Isofluran	Isofluran-Actavis	
Heparin	1 I.E. pro 100 µl Vollblut	Rotexmedica GmbH #70449
0,9% NaCl	0,9% NaCl in PBS	

2.1.6 Sammeln von Urin in metabolischen Käfigen

Nach der Blutentnahme wurden die Mäuse einzeln für 24h in metabolischen Käfigen (Einzelmauskäfige, Techniplast #3600M021) gehalten, um den Urin dieser Mäuse zu sammeln. Ein feuchtes Tuch im unteren Bereich des Käfigs sollte dabei ein Austrocknen der Urinsammelgefäße vermeiden und für eine möglichst konstante Luftfeuchtigkeit sorgen. Zunächst wurde das Urinvolumen festgestellt. Auch wurden weitere Parameter bestimmt (siehe 2.1.8). Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

Zusätzlich konnten hier noch verbrauchte Wasser- und Futtermengen bestimmt werden. Hierfür wurde jeweils vorher und nachher das Wasser in einem Messzylinder abgemessen, das Futter dementsprechend gewogen.

2.1.7 Kreatinin-Bestimmungen

Die Muskulatur von Säugetieren nimmt das in Leber, Niere, Gehirn, Pankreas oder Milz synthetisierte Kreatin auf. Dieses speichert Energie in Form von Phosphatgruppen. Unter Belastung wird diese Energie abgegeben, wobei das Abbauprodukt Kreatinin entsteht, welches ausschließlich über die Nieren ausgeschieden wird (DocCheck Medical Services GmbH, 2015).

Um die Nierenfunktion der Mäuse vergleichen zu können, wurden die Kreatininkonzentrationen von Plasma- und Urinproben gemessen. Der Kreatininwert des 24h-Urins stellt dabei die Menge Kreatinin dar, welche innerhalb von 24 Stunden von der Niere ausgeschieden wird. Aus dem Verhältnis der Kreatininkonzentrationen im Urin und im Blutplasma kann in Abhängigkeit zu Zeit und Körpergewicht die Kreatinin-Clearance ermittelt werden. Dabei gilt: Je größer der Wert der Kreatinin-Clearance, desto besser ist die Funktion der Niere.

Die Messung der Kreatininwerte im Urin erfolgte mittels Arkray AUTION Sticks 10PA (Axonlab, #73621). Das Ergebnis wurde hier per Auge abgelesen. Die Messung der Kreatininwerte im Plasma erfolgte mit Hilfe des Arkray AUTION Screen (Axonlab, #77177) an einem klinisch-chemischen Trockenchemie-Analyser (Spotchem EZ SP-4430).

Aus den gemessenen Werten sollte schließlich die Kreatinin-Clearance errechnet werden:

$$C = 1000 * ((K_U * V_U) / (K_P * T)) / KG$$

Dabei ist C die Kreatinin-Clearance in $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ Körpergewicht, K_U die Kreatininkonzentration im Urin in mg/dl , V_U das Urinvolumen in ml , K_P die Kreatininkonzentration im Plasma in mg/dl , T die Sammelzeit in Minuten und KG das Körpergewicht der Maus in Gramm.

2.1.8 Bestimmung weiterer Parameter im Urin

Neben Kreatinin wurden im Urin noch weitere Parameter bestimmt, deren Abweichungen auf eine Funktionsveränderung der Niere hindeuten können.

2.1.8.1 Messung verschiedener Metabolite

Mit Hilfe der Arkray AUTION Sticks 10PA wurden pH-Wert, Protein-Konzentration sowie der Gehalt an Glukose, Urobilinogen, Bilirubin, Blut, Ketonen, Nitriten und Leukocyten im Urin bestimmt. Die Ergebnisse wurden hier wiederum per Auge abgelesen. Die pH-Werte der Urinproben wurden mit Hilfe von pH-Indikatorstäbchen (Neutralit pH5-10, Merck #1.095.0001; Alkalit pH7,5-14, Merck #1.09532.0001; Acilit pH0-6, Merck #1.09531.0001) noch genauer bestimmt. Außerdem wurden die Proben für eine Proteindetektion mittels eines SDS-Polyacrylamid-Gels verwendet (siehe 2.1.8.2). Die Proben wurden die ganze Zeit über weitgehend im Dunkeln gehalten.

2.1.8.2 Untersuchung des Proteingehalts

Um Proteine ihrem Molekulargewicht nach aufzutrennen, wird die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) genutzt. Die Auftrennung erfolgt in einem elektrischen Feld, wobei zu beachten ist, dass die Konzentration des Polyacrylamidgels abhängig von der Molekülmasse der zu untersuchenden Proteine gewählt wird. Da hier möglichst alle im Urin der Mäuse enthaltenen Proteine aufgetrennt werden sollten, wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel hergestellt (Tab. 2.1).

	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
ddH ₂ O	1,9 ml	3,5 ml
1 M Tris-HCl	5,6 ml pH 8,8	0,6 ml pH 6,8
20% SDS	60 µl	25 µl
Acrylamid	3,8 ml	0,8 ml
TEMED	7,5 µl	5 µl
10% APS	60 µl	25 µl

Tabelle 2.1: Zusammensetzung für jeweils 2 SDS-Polyacrylamidgele.

Im Gegensatz zur gängigen Methode der Auftrennung von Proteinen aus einem Proteinlysate wurde hier weder 4x SDS-Probenpuffer zur Probe gegeben noch wurden die Proben zur Denaturierung der Proteine aufgeköcht. Es wurden lediglich unbehandelte Proben des 24h-Sammelurins aufgetragen.

Das Sammelgel ist aufgrund seiner geringeren Acrylamid-Konzentration weitporiger, so dass hier eine Aufkonzentrierung der Proteine stattfinden kann. Außerdem wird durch den pH-Wert von 6,8 bewirkt, dass alle Proteine mit gleicher Geschwindigkeit durch das Gel wandern. Erst beim Übergang in das darunter liegende Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8 beginnt die Auftrennung der Proteine. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard aufgetragen, welcher auch als Größenreferenz diente, in erster Linie aber die Lauffront anzeigte, welche bei Verlassen der Unterkante des Gels das Abschalten der Energiequelle (Consort E831) signalisierte. Nach der Überschichtung der Gele mit 1x-SDS-Laufpuffer und dem Auftragen der Proben erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 200 Volt demnach so lange, bis die unterste Bande des Proteinstandards beinahe den unteren Rand des Gels erreicht hatte (ca. ein bis zwei Stunden).

Anschließend wurden die Proteinbanden durch eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht und die Gele dann entfärbt, bis die Banden sich möglichst gut vom Hintergrund abgrenzten, aber immer noch deutlich zu sehen waren. Die Gele wurden eingescannt und die Bandenintensitäten mit dem Programm ImageJ ausgewertet.

Verwendete Lösungen:

1 M Tris-HCl	Tris (1 M) in ddH ₂ O pH 6,8 bzw. pH 8,8 eingestellt mit HCl	
20% SDS	20% SDS in ddH ₂ O	Serva Electrophoresis #20760
Acrylamid		AppliChem #A0856
TEMED		Merck #UN2372
10% APS	10% Ammoniumpersulfat in ddH ₂ O	Serva #13375
10x Laufpuffer	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS in 1l ddH ₂ O	Prolabo #103156 AppliChem #A1377,1000
High Molecular Weight Standard Mixture		Sigma #SDS6H2
Coomassie-Lösung	2,5 g Coomassie Brilliant Blue 450 ml Methanol 100 ml Essigsäure 100% 450 ml ddH ₂ O	Serva #35051 Sigma #32213 Prolabo #20104.334
Entfärberlösung	450 ml Methanol 100 ml Essigsäure 450 ml ddH ₂ O	

2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1 DNA-Isolation aus Schwanzspitzen

Die Schwanzspitzen der Embryonen wurden über Nacht in 750 µl Dottersackpuffer und 30 µl Proteinase K (40 µl/ml) bei 56°C inkubiert. Danach wurden 250 µl gesättigte Natriumchloridlösung hinzu gegeben, gut geschüttelt und für zehn Minuten bei 13000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415) zentrifugiert. Um die freigesetzten Nukleinsäuren zu fällen, wurden dann 750 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt, invertiert und wiederum zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet (*engl.: deoxyribonucleic acid*) mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter zehn-minütiger Zentrifugation wurde das Pellet etwa eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet und dann in 100 ml TE-Puffer resuspendiert.

Verwendete Lösungen:

Dottersackpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM EDTA 100 mM CaCl 1% SDS (w/v)	
Proteinase K	10 mg/ml	Roche #1000144
NaCl-Lösung gesättigt	> 6 M	
Isopropanol	abs.	AppliChem #A1091
70% Ethanol	70% (v/v) Ethanol in ddH ₂ O	Prolabo #20821.330
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0	

2.2.2 Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Embryonen mittels Standard-PCR (*engl.: polymerase chain reaction*) wurden Oligonukleotide (Primer) verwendet, deren komplementäre Sequenz anhand vorhandener Sequenzangaben ermittelt wurde (Tab. 2.2).

Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Die PCR-Reaktion (Tab. 2.3) fand in standardisierter Form statt (siehe 2.2.6).

Bei dieser Genotypisierungs-PCR weist eine Amplifizierung von DNA durch die Fto-KO-Primer auf mindestens ein intaktes *Fto*-Gen hin (*Fto*^{+/+}- oder *Fto*^{+/-}-Mäuse).

Primer-Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')
Fto-KO for	ACCCCTCTCCCCATCTAAATCCT
Fto-KO rev	AAGCCAAGAACAAGTCCATACCTG
Neo for	CTGTGCTCGACGTTGTCCTG
Neo rev	GATCCCCTCAGAAGAAGTCTCGT

Tabelle 2.2: Für die Genotypisierung verwendete Primersequenzen.

Eine Amplifizierung von DNA mittels der Neo-Primer hingegen deutet auf mindestens ein durch eine Neomycin-Resistenzkassette ausgetauschtes, und damit nicht mehr intaktes *Fto*-Gen hin (*Fto*^{+/-}- oder *Fto*^{-/-}-Mäuse).

Schritt	Zyklenzahl	Zeit	Temperatur [°C]
1) Initiale Denaturierung	1x	5 min	94
2) Denaturierung	35x	30 s	94
3) Primer-Hybridisierung		30 s	56
4) Polymerisation		30 s	72
5) Abschließende Polymerisation	1x	5 min	72

Tabelle 2.3: PCR-Programm für die Genotypisierung.

Es erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarosegel (siehe 2.2.7).

2.2.3 RNA-Isolation aus embryonalen Nieren

Zur Isolation von RNA (*engl.: ribonucleic acid*) aus schockgefrorenen embryonalen Nieren wurden diese zunächst in ein Lysegefäß (Precellys Keramik Kit 1.4/2.8 mm, 2 ml Tube, Peqlab #91-PCS-CKM) überführt und mit RLT-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit von Qiagen, welcher mit β -Mercaptoethanol (10 μ l pro ml RLT-Puffer) versetzt wurde, überschichtet und für 20 Sekunden bei 5000 rpm homogenisiert (PrecellysTM Control Device, Precellys24, Peqlab). Danach wurden 250 μ l RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol (10 μ l pro ml RLT-Puffer) hinzugegeben und für wei-

tere 15 Sekunden gevortext (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). Die übrigen Schritte wurden streng nach Protokoll des RNeasy-Kits durchgeführt. Die Zentrifugationsschritte (Eppendorf Centrifuge 5415D) erfolgten immer bei 13000 rpm. Nach Zugabe eines Volumens 70% Ethanol und guter Durchmischung der Probe wurde alles auf eine RNeasy-Spin-Säule gegeben und für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die RNA in der Säulenmembran wurde mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Es folgte ein DNase-Verdau unter Anwendung des RNase-free DNase Set von Qiagen. Dazu wurden 10 µl DNase I mit 70 µl RDD-Puffer versetzt, gut vermischt und auf die Säule gegeben. Diese wurde dann für 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der Verdau durch die Zugabe von 350 µl RW1-Puffer gestoppt und für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde abermals verworfen und die RNA durch Zugabe von 500 µl RPE-Puffer gewaschen und für zwei Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein neues 2 ml-Eppendorfgesäß überführt und erneut zum Trocknen für eine Minute zentrifugiert. Schließlich wurde die Säule in ein 1,5 ml-Eppendorfgesäß überführt und zum Eluieren der RNA wurden 30 µl RNase freies Wasser auf die Säule gegeben. Nach einer einminütigen Inkubationszeit erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt für zwei Minuten. Es wurde RNA aus Nieren von Embryonen der Stadien E14.5, E15.5, E16.5 und E18.5 isoliert und bei -80°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

RNeasy Mini Kit		Qiagen #74104
β-Mercaptoethanol		Sigma #M7522
70% Ethanol	70% Ethanol in ddH ₂ O	
RNase-free DNase Set		Qiagen #79254

2.2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (Eppendorf, BioPhotometer) unter Anwendung des Programms ssRNA (*engl.: single-stranded*) in einer LabelGuard MesszelleTM mit einem Deckel mit Faktor 50 bestimmt. Die Verdünnung wurde daher mit 1+49 µl angegeben. Als Leerwert diente das RNase freie Wasser aus dem zuvor verwendeten Qiagen RNeasy Kit, in welchem die RNA gelöst wurde.

2.2.5 Reverse Transkription (RT-PCR)

Um sich später mittels PCR einen Überblick über die Transkriptionsrate einzelner Gene zu verschaffen, wurde die mRNA (*engl.: messenger RNA*) zunächst in cDNA (*engl.: complementary DNA*) umgeschrieben. Hierzu wurde eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase aus dem „Expand Reverse Transkriptase“-Kit (Roche # 1785834), benutzt.

	Menge [μ l]
RNA	0,5-1
Oligo-(dT)	2-5
DEPC-H ₂ O	ad 10,5

Tabelle 2.4: Mastermix 1 für die reverse Transkription.

Die reverse Transkription erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Um eine Anlagerung der Oligonukleotide an die RNA zu gewährleisten, wurde Mastermix 1 (Tab. 2.4) für zehn Minuten bei 65°C inkubiert.

	Menge [μ l]
Transkriptase-Puffer	4
DTT 100 mM	2
dNTP-Mix	2
RNase-Block	0,5
Reverse Transkriptase	1

Tabelle 2.5: Mastermix 2 für die reverse Transkription.

Nach Zugabe von Mastermix 2 (Tab. 2.5) wurde das Gemisch für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Die cDNA wurde über kurze Zeitspannen bei 4°C, sonst bei -20°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

Oligo(dT)-Mix	10 mM	Qiagen #79237
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat	Sigma #D5758

	in ddH ₂ O; autoklaviert	
dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP	Roche #1969064
DTT	Dithiothreitol-Lösung 100 mM	Roche #10197777001
RNase-Block	40 U/μl	Stratagene #300151
Expand-Reverse Transkriptase	1 U/μl	Roche #11785826001

2.2.6 Semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die Transkriptionsrate spezifischer Gene in den Nieren der verschiedenen Embryonalstadien zu ermitteln, wurden in Form der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die DNA-Sequenzen dieser Gene amplifiziert (vgl. Saiki et al., 1988).

Primer-Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')	Referenz
Gdnf for	GTTATGGGATGTCGTGGCTGTC	
Gdnf rev	GAAGCGCTGCCGCTTGTATTATC	
Ret for	CTGCATCCCAGAGACAGCCGTG	
Ret rev	GTTGGCACCAGGGCCTGCCAC	
Wnt11 for	GAGGATGTGCGGACAACCTCAG	
Wnt11 rev	GTGTACCACCTTCGTGGCTGAC	
Fgf8 for	TCTCCAGCACGATCTCTGTGAA	Grieshammer et al., 2005
Fgf8 rev	GGAAGCTAATTGCCAAGAGCAA	Grieshammer et al., 2005
Fto for	GGGACATCGAGACACCAGGA	
Fto rev	GCCACTCAAACCTCCACCTCAT	
mHprt F	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	Stefanie Kuschel*
mHprt R	CACAGGACTAGAACACCTGC	Stefanie Kuschel*

Tabelle 2.6: Die für die semiquantitative PCR verwendeten Primer. Die Primer für die zu amplifizierenden Bereiche wurden anhand verfügbarer genomischer Sequenzdaten kreiert und von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Eine Ausnahme bilden die Sequenzen der *Fgf8*- sowie *Hprt*-Primer, welche der jeweils angegebenen Referenz entnommen wurden. *Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Die Spezifität wurde durch die Anwendung individueller Oligonukleotide (Primer) gesichert. Durch Hybridisierung der beiden Primer an den jeweiligen 3'-Enden eines ausgewählten Bereiches und den Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase wurden bestimmte Abschnitte der zuvor synthetisierten cDNA amplifiziert (Tab. 2.6). Bei der hier verwendeten Polymerase handelt es sich in allen Fällen um die sogenannte *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*, welche am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere nach dem Protokoll von Pluthero (1993) hergestellt wurde.

Schritt	Zyklenzahl	Zeit	Temperatur [°C]
1) Initiale Denaturierung	1x	5 min	94
2) Denaturierung	25-31x	30 s - 1 min	94
3) Primer-Hybridisierung		30 s - 1 min	$\sim T_m^{\text{Primer}} - 5$
4) Polymerisation		30 s - 1 min	72
5) Abschließende Polymerisation	1x	5 min	72

Tabelle 2.7: Standard-PCR-Reaktion. Anzahl und Dauer der Zyklen sind abhängig von der Ausgangskonzentration und der Länge des zu synthetisierenden DNA-Fragments. T_m^{Primer} bezeichnet die Schmelztemperatur des jeweiligen Primers.

Die standardisierte PCR-Reaktion (Tab. 2.7) beginnt zunächst mit der Denaturierung der DNA durch Erhitzen. Dies macht eine Hybridisierung der spezifischen Primer an den komplementären Bereichen während des Abkühlens möglich.

Primer	Zeit von Denaturierung, Hybridisierung bzw. Polymerisation	Zyklenzahl
Gdnf	1 min	28
Ret	1 min	25
Wnt11	1 min	31
Fgf8	30 s	2 μ l E14.5; 29
Fto	30 s	E14.5: 30 andere Stadien: 28
Hprt	30 s	25

Tabelle 2.8: Zeiten und Zyklenzahlen der einzelnen Primer. Aufgrund der geringen DNA-Konzentration der Proben des Stadiums E14.5 wurden hier anstatt 1 μ l jeweils 2 μ l Probe und dementsprechend weniger Wasser eingesetzt.

Es folgt die Polymerisation der zu amplifizierenden Sequenz durch die Elongation der Primer mittels einer Polymerase. Diese Schritte werden unterschiedlich oft wiederholt. Dauer und Anzahl der Zyklen sind dabei sowohl von der Länge des zu amplifizierenden Bereiches als auch von der anfänglichen DNA-Konzentration abhängig. Neu synthetisierte Fragmente dienen dabei genauso als Matrize wie die ursprünglich verwendete DNA.

Alle PCR-Reaktionen fanden in dünnwandigen 0,2-ml-Reaktionsgefäßen statt und wurden mit unterschiedlichen Zeiten und unter Einhaltung konzentrationsabhängiger Zyklenzahlen (Tab. 2.8) in der MWG-(Primus 25)- oder der Eppendorf-Mastercycle-Gradient-Maschine durchgeführt.

Die *Taq*-Polymerase wurde zusammen mit einem adäquaten Puffersystem von Roche (Roche #1146165) in einem 20 µl-Ansatz (Tab. 2.9) angewendet. Beim Ansatz der *Fgf8*-PCR mit cDNA von Nieren 14.5 Tage alter Embryonen wurden jeweils 2 µl Template (und dementsprechend weniger Wasser) eingesetzt.

	Menge [µl]
cDNA (Template)	1
PCR-Puffer (5X)	4
dNTP-Mix	0,4
Primer for (10 pmol/µl)	1
Primer rev (10 pmol/µl)	1
<i>Taq</i> -Polymerase	0,1
H ₂ O (autoklaviert)	12,5

Tabelle 2.9: 20 µl-Standard-PCR-Ansatz.

Als Haushaltsgen, welches als Abgleich diente, wurde *Hprt* parallel amplifiziert. Die Produkte der PCR-Reaktionen wurden bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei 4°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

PCR-Puffer	5 x Green GoTaq Reaction Buffer	Promega, #M7911
dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGPT 10 mM dTTP	

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über ein Agarosegel. Die Methode macht sich die negative Ladung des Zucker-Phosphatrückgrats der DNA zu Nutze, indem diese über ein elektrisches Feld aufgetrennt wird. Die DNA wandert dabei innerhalb des Agarosegels in Richtung Anode. Je kleiner das DNA-Molekül, desto schneller ist die Wanderungsgeschwindigkeit. Auf diese Weise können die DNA-Fragmente größenabhängig aufgetrennt werden. Für die Auftrennung der PCR-Produkte aus der Genotypisierungs-PCR (siehe 2.2.2) wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Um kleinere Moleküle besser detektieren zu können, wurden für die Produkte der semiquantitativen PCR (siehe 2.2.6) 2%ige (*Gdnf*, *Ret*, *Wnt11*, *Fto*, *Hprt*) bzw. 3%ige (*Fgf8*) Agarosegele hergestellt. Das TAE-Puffersystem wurde sowohl als Gel als auch als Laufpuffer verwendet. Nach dem Aufkochen der Agaroselösung in der Mikrowelle wurde der Fluoreszenzfarbstoff GelRed (6 µl/100 ml) hinzugegeben. Dieser interkaliert in die doppelsträngige DNA und macht sie so unter UV-Bestrahlung sichtbar.

Nachdem sich die DNA-Fragmente möglichst weit aufgetrennt hatten, wurde ein Foto des Agarosegels gemacht und die Bandenintensitäten mit Hilfe des Programms ImageJ quantifiziert.

Verwendete Lösungen:

Agarose	1; 2; oder 3% (w/v) in TAE-Puffer	PeqGOLD #35-1020
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl 2 mM EDTA pH8,2	
GelRed	0,06 µl/ml	Biotium #41003
1-Kb-Plus-DNA-Leiter	12000; 5000; 2000; 1650;1000; 850; 650; 500; 400; 300; 200; 100 Bp	Invitrogen #10787-018

2.2.8 Quantitative Real-Time-PCR

Bei der Real-Time- (Echtzeit-)PCR handelt es sich um eine weitere Methode zur Ermittlung von mRNA-Mengen ausgewählter Gene. Sie basiert auf dem Ansatz einer standardisierten PCR (vgl. 2.2.6), wobei hier nach jedem Zyklus eine Quantifizierung möglich ist. Ausschlaggebend dafür ist die Möglichkeit der Messung der Fluoreszenz, welche proportional zur neu synthetisierten DNA-Menge ansteigt. Um die DNA zu markieren, wurden in dieser Arbeit so genannte „TaqMan“-Sonden verwendet. Diese beruhen auf der Technik der FRET (*engl.: fluorescence resonance energy transfer*)-Analyse. Die TaqMan-Sonden tragen an ihrem 3'-Ende den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM (Donor), während sich an ihrem 5'-Ende ein Quencher (Akzeptor)

befindet. Durch Lichtanregung des Donors wird Energie freigesetzt und auf den Akzeptor übertragen; somit unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters. Kann die TaqMan-Sonde an einen komplementären DNA-Strang binden, kommt es zur Polymerisation des neuen DNA-Stranges und aufgrund der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zum Abbau des Quenchers am 5'-Ende. Durch das Fehlen des Akzeptors kann nun die freigegebene Energie als fluoreszierende Strahlung gemessen werden.

	Menge [μ l]
cDNA (Template)	3
H ₂ O (RNase frei)	6
TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems #A1091)	10
	Gapdh: 10,7
TaqMan Assay (Gen-spezifischer Primer und Sonde)	1
	Gapdh: 0,3

Tabelle 2.10: 20 μ l-Standard-Ansatz für eine Real-Time-PCR. Die verwendeten Gen-spezifischen Primer lagen in 20-facher, der Primer für das Haushaltsgen *GapDH* in 60-facher Konzentration vor.

Als Template diente auch hier die cDNA, welche aus der RNA embryonaler Nieren (vgl. 2.2.5) durch reverse Transkription hergestellt wurde. Als Abgleich wurde das Haushaltsgen *GapDH* parallel amplifiziert. Für jede cDNA wurde ein 20 μ l-Ansatz mit jedem Gen-spezifischen Primer hergestellt (Tab. 2.10). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.11 aufgelistet.

Die Real-Time-PCR erfolgte im „StepOne Real-Time PCR System Thermal Cycling Block“ (Applied Biosystems #4376357).

Name des Gens	Bestellnummer des TaqMan Assays
<i>Gapdh</i>	#Mm99999915_g1
<i>Gdnf</i>	#Mm00599849_m1
<i>Gli1</i>	#Mm00494645_m1
<i>Ptch1</i>	#Mm00970977_m1

Tabelle 2.11: Verwendete TaqMan Assays und deren Bestellnummern bei Applied Biosystems.

Zur relativen Quantifizierung wurden die Ct-Werte verwendet (*engl.: cycle threshold*, Schwellenwert-Zyklus). Diese Werte bestimmen den Punkt der Messung, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant stärker ist als die Hintergrund-Fluoreszenz. Mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurde die Berechnung realisiert.

2.3 Histologische Verfahren

2.3.1 Anfertigung von transversalen Paraffindünnschnitten

Die rechten Nieren sowohl der adulten Mäuse als auch der Embryonen der Stadien E14.5, E15.5, E16.5 und E18.5, welche über Nacht bei 4°C in PFA fixiert worden waren (siehe 2.1.3 bzw. 2.1.2), wurden am Folgetag einer Entwässerung durch eine Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 100%) für jeweils 1,5 Stunden und einer Inkubation in 1-Butanol über Nacht unterzogen. Es folgte eine zweistündige Inkubation in einem 60°C heißen Paraffinbad (Paraffintopf: Medax 47511) und weitere zwei Stunden unter Vakuum (Vakuumpumpe: Vacuubrand BVC21). Danach wurden die Nieren in Paraffin eingebettet, dabei erfolgte die Ausrichtung so, dass die Nieren jeweils auf einer breiten Seite zum Liegen kamen. Nach dem vollständigen Aushärten des Paraffins wurden die Blöcke in ein Mikrotom (Leica, RM 2035) eingespannt und längs mit einer Schichtdicke von 8 µm geschnitten. Jeweils drei Schnitte wurden zum Glätten in ein etwa 40°C warmes Wasserbad (GFL 1052) überführt. Nach der Aufnahme auf einen Objektträger (Superfrost Plus, Menzel GmbH) wurden diese zum Trocknen und zur vollständigen Glättung der Schnitte für etwa 30 bis 60 Minuten auf eine 40-45°C warme Heizplatte (OMNILAB Jürgens) gelegt. Nach der vollständigen Trocknung der Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur wurden diese bei 4°C gelagert.

Verwendete Lösungen:

70% Ethanol	70% Ethanol (v/v) in ddH ₂ O	
80% Ethanol	80% Ethanol (v/v) in ddH ₂ O	
90% Ethanol	90% Ethanol (v/v) in ddH ₂ O	
100% Ethanol	abs.	
1-Butanol		Prolabo, #20810.323
Paraffin	Paraplast Plus	Roth #X881.2

2.3.2 Hämalaun/Eosin-Färbung auf Paraffindünnschnitten

Die Hämalaun/Eosin (HE)-Färbung macht sich die unterschiedlichen Ladungen der verschiedenen Zellkompartimente zu Nutze. DNA, die aufgrund ihres Phosphatrückgrats eine negative Ladung aufweist, wird vom positiv geladenen Farbstoff Hämalaun so angefärbt, dass sie in einem Blauviolett-Ton erscheint. Die positiven Zellbestandteile färbt das negativ geladene Eosin rötlich an. Auf diese Weise kann die Histologie eines Gewebes deutlicher sichtbar gemacht werden.

Es wurden jeweils zehn Objektträger pro Niere (adult bzw. embryonal) ausgewählt und der Färbung unterzogen. Der erste Schritt dabei war die Entparaffinierung zwei Mal für je zehn Minuten in Xylol. Es folgte die Rehydrierung durch eine absteigende Ethanolreihe (zwei Mal fünf Minuten 100%, je zwei Minuten 95% bzw. 70%). Ein kurzer Waschschrift in destilliertem Wasser bereitete das Gewebe auf den ersten Färbeschritt vor. Dafür wurde der Objektträger für acht Minuten in der Hämalaunlösung belassen. Um die dadurch angefärbten Strukturen schließlich im für diese Färbung charakteristischen Blau erscheinen zu lassen, musste ein Farbumschlag erzielt werden. Dies wurde durch eine Erhöhung des pH-Wertes mittels zehnmütigen Spülens mit Leitungswasser vollbracht. Als Vorbereitung auf den nächsten Färbeschritt wurde dann zunächst kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und der Objektträger danach zehn Mal in 95%iges Ethanol getaucht. Im Folgenden wurden die Schnitte für 30 bis 60 Sekunden in einer Eosin-Phloxin B-Lösung gefärbt. Zuletzt erfolgte eine Dehydrierung für je fünf Minuten in 95% und zwei Mal in 100% Ethanol und eine Klärung der entwässerten Schnitte in zwei fünfminütigen Xylolschritten. Schließlich wurden die gefärbten Schnitte unter Deckgläsern (Roth #878) mit Entellan eingedeckelt.

Verwendete Lösungen:

Xylol		Prolabo #28975.291
100% Ethanol	abs.	
95% Ethanol	95% Ethanol in ddH ₂ O	
70% Ethanol	70% Ethanol in ddH ₂ O	
Hämalaun	50 ml Mayers Hämalaun-Lösung 150 ml ddH ₂ O	Merck #1.09249.2500
Eosin-Phloxin B-Lösung:		
Eosin Stock-Lösung	0,5 g Eosin G in 50 ml ddH ₂ O	Merck #1.15935.0100
Phloxin Stock-Lösung	0,5 g Phloxin B in 50 ml ddH ₂ O	Merck #1.15926.0025
→ Gebrauchslösung	50 ml Eosin Stock-Lösung 5 ml Phloxin Stock-Lösung 390 ml 95% Ethanol 2 ml Essigsäure 100%	
Entellan		Merck #1.07961.0500

2.4 Fotodokumentation

Die gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops betrachtet und von jedem Objektträger wurde jeweils ein Schnitt ausgewählt. Auf den Schnitten der embryonalen Nieren wurden sowohl Vorläufer als auch bereits ausgebildete Glomeruli ausgezählt. Auf den Schnitten der adulten Nieren befanden sich selbstverständlich keine Vorläufer mehr, demnach wurden hier ausschließlich fertig entwickelte Glomeruli gezählt.

Um einen Bezug herstellen zu können, wurden die Schnitte dann fotografiert und die Schnittfläche ermittelt. Die Fotodokumentation und auch das Ausmessen von Längen und Flächen erfolgten stets unter Zuhilfenahme des Programms Axio Vision. Das Volumen einer Niere wurde mit Hilfe der Formel für das Volumen eines Ellipsoids näherungsweise bestimmt:

$$V_N = 4/3 * \pi abc$$

Dabei ist V_N das Volumen in mm^3 , a die Länge, b die Breite und c die Tiefe der Niere, jeweils in mm.

2.5 Datenverarbeitung

Die Quantifizierung der Bandenintensitäten der durch SDS-PAGE und Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine (siehe 2.1.8.2) und DNA-Fragmente (siehe 2.2.7) erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ.

Die Bearbeitungen von Fotografien und das Erstellen von Kollagen erfolgte mit der Software Adobe Illustrator CC.Ink.

Alle Berechnungen und die dazugehörigen Diagramme wurden mit dem Programm Microsoft Office Excel 2013 durchgeführt bzw. erstellt.

2.6 Statistik

Für jeden der beiden Genotypen ($Fto^{+/+}$, $Fto^{-/-}$) wurden aus den ermittelten bzw. gemessenen Werten mit Hilfe von Office Excel 2013 Anzahl, Mittelwert, Median, Standardabweichung und SEM (engl.: *standard error of the mean*) errechnet. Die erstellten Diagramme zeigen jeweils den Mittelwert und als Fehlerindikator den dazugehörigen SEM. Mit Hilfe des Studentschen T-Tests wurde überprüft, ob die beiden zu vergleichenden Matrizen aus zwei verschiedenen Gruppen ($Fto^{+/+}$ vs. $Fto^{-/-}$) systematisch unterschieden werden können. Dabei wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$

als statistisch signifikant (*), ein p-Wert von $\leq 0,01$ als statistisch hoch signifikant (**) und ein p-Wert von $\leq 0,001$ als statistisch höchst signifikant (***) erachtet.

3. Ergebnisse

Die Hauptaufgabe der Niere ist die Filtration des Blutes, wobei als Abfallprodukt der Urin entsteht. Zu diesem Zweck besitzt sie eine sehr stark verästelte Mikrovaskulatur. Die Verzweigungen in winzigste Kapillaren in Form von Glomeruli innerhalb der Nierenkörperchen spielen beim Filtrationsprozess eine besonders große Rolle. Hier werden auf größtmöglicher Fläche Wasser, Elektrolyte, Kohlenhydrate und niedermolekulare Proteine aus dem Blut herausgefiltert und als Primärharn in das Tubulussystem der Niere weitergeleitet. Eine Funktionsstörung innerhalb der Glomeruli kann gravierende Folgen für den gesamten Körper haben. Außerdem ist die Glomerulizahl ein entscheidender Faktor bei der Regulation des Blutdrucks (Brenner et al., 1988; Keller et al., 2003; Koeners et al., 2008).

Erste Analysen haben gezeigt, dass die durchschnittliche Glomerulidichte im anterioren sowie posterioren Bereich der Nieren von adulten *Fto*^{-/-}-Mäusen signifikant erhöht sind. Auch im mittleren Nierenbereich konnte eine gesteigerte Dichte an Glomeruli festgestellt werden (Zingsem, 2010). Um diese Daten, welche auf der Auszählung von Transversalschnitten eines Kortextbereiches von vier mal vier aneinanderliegenden Feldern beruhen, für die gesamte Niere zu verifizieren, wurden für diese Arbeit zunächst Längsschnitte der Nieren sowohl adulter als auch verschiedener embryonaler Stadien angefertigt. Außerdem wurden hier alle Glomeruli pro Schnitt gezählt und die Dichte (Anzahl pro Fläche) berechnet.

Da bereits bekannt ist, dass der Verlust von FTO zu unterschiedlichen Phänotypen, in Abhängigkeit zum genetischen Hintergrund der Maus, führen kann (Jäger, 2012), wurden hier zwei Mausstämme mit verschiedenen Hintergründen (NMRI und ein C57BL/6/NMRI-Mischhintergrund (BN), vgl. 2.1.1) untersucht.

3.1 *Fto*^{-/-}-Mäuse weisen eine erhöhte Glomerulidichte sowie Flächenveränderungen von Kortex und Medulla auf

Fto^{-/-}-Mäuse sind insgesamt kleiner und leichter als ihre wildtypischen Geschwister (Fischer et al., 2009). Auch die Nieren weiblicher *Fto*^{-/-}-Tiere mit NMRI-Hintergrund weisen ein niedrigeres Gewicht und ein geringeres Volumen auf (Zingsem, 2010). Abbildung 3.1 b zeigt beispielhaft die verkleinerte Nierenfläche in Höhe der gleichen Schnittebene im Vergleich zur wildtypischen Niere (Abb. 3.1 a). Hierbei handelt es sich um die Nieren männlicher Mäuse, da bei weiblichen Mäusen kein signifikanter Größenunterschied zu erfassen war (vgl. Abb. 9.1). Ferner erkennt

man, dass in Nieren männlicher Wildtyp-Mäuse pro Ausschnitt weniger Glomeruli zu finden sind als in Nieren ihrer *Fto*^{-/-}-Geschwister (Abb. 3.1 c und d). Während die absolute Zahl der Glomeruli pro Nierenschnitt bei männlichen Mäusen keine Variationen zwischen den Genotypen zeigt, weisen Nierenschnitte weiblicher *Fto*^{-/-}-Mäuse hier bereits signifikant mehr Glomeruli auf (Abb. 3.1 e). Sie entwickeln in etwa 20% mehr Glomeruli als ihre wildtypischen Geschwister. Sowohl die Nieren männlicher als auch weiblicher *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI-Hintergrund zeigen eine signifikant höhere Glomerulidichte (Abb. 3.1 f).

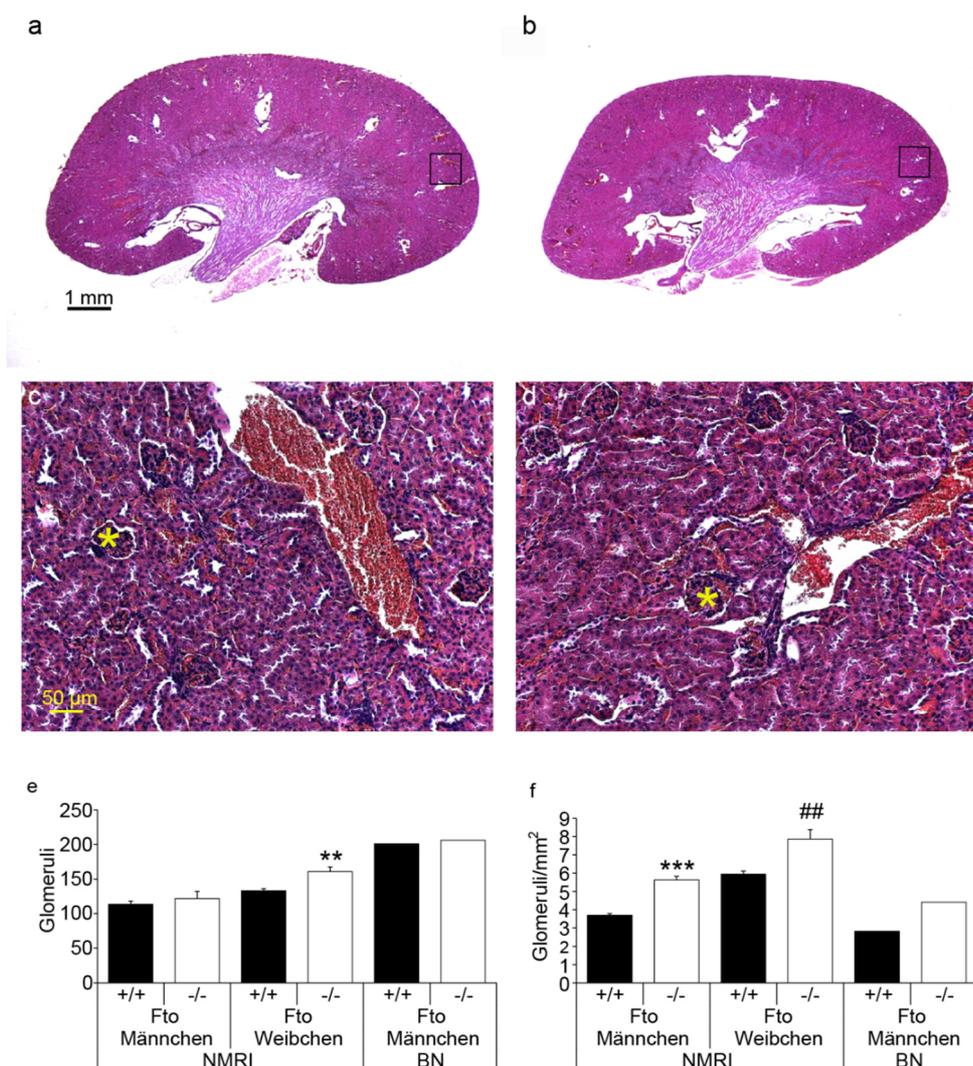


Abbildung 3.1: Glomeruli in den Nieren adulter Mäuse.

Zu sehen sind Nierenschnitte (a, b) und Details ausgewählter Kortextbereiche (c, d) von Nieren einer wildtypischen (a, c) und einer *Fto*^{-/-}-Maus (b, d). Die Sterne markieren jeweils einen Glomerulus. In (e) sind die absoluten Glomeruli-Zahlen pro Nierenschnitt von männlichen Mäusen mit NMRI- (n=3/4) und BN-Hintergrund (n=1/1) sowie von weiblichen Tieren mit NMRI-Hintergrund (n=6/3; **p=0,006) dargestellt. (f) zeigt die Dichte der Glomeruli in Nieren von männlichen Mäusen mit NMRI- (n=3/4; ***p=0,0004) und BN-Hintergrund (n=1/1) sowie von weiblichen Tieren mit NMRI-Hintergrund (n=6/3; ##p=0,006). Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Für männliche Mäuse mit BN-Hintergrund wurde das Ergebnis mit jeweils einer Maus pro Genotyp überprüft und konnte mit einer um das 1,3-Fache erhöhten Glomerulidichte bestätigt werden (Abb. 3.1 f).

Da sich Glomeruli ausschließlich im Kortex der Niere befinden, wurde zunächst die Vermutung aufgestellt, dass sich bei höherer Dichte der Glomeruli die Kortexfläche ausgedehnt haben könnte. Daher wurden zusätzlich die Flächen von Kortex und Medulla bestimmt und auf die jeweilige Nierenfläche bezogen. Außerdem wurde das Verhältnis von Kortex zu Medulla berechnet, da die Vermutung nahe liegt, dass dieses eine große Rolle in der Urin-Konzentrationsfähigkeit der Niere spielt (Schmidt-Nielsen and O'Dell, 1961; Beuchat, 1990; Dickinson et al., 2005).

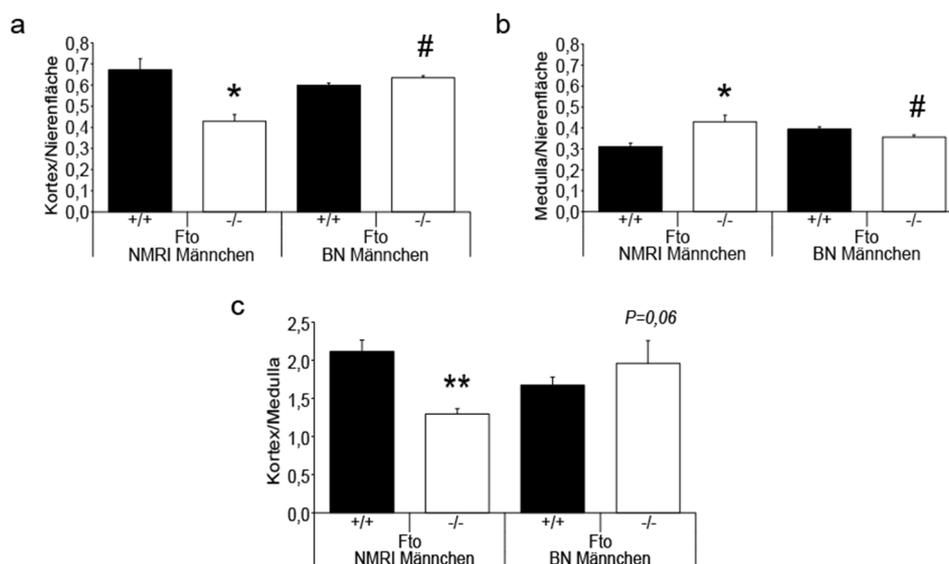


Abbildung 3.2: Fläche von Kortex und Medulla in den Nieren männlicher adulter Mäuse.

Die Flächen von (a) Kortex (NMRI: *p=0,03; BN: #p=0,05) und (b) Medulla (NMRI: *p=0,03; BN: #p=0,05) männlicher Mäuse mit NMRI- (n=4/3) und BN-Hintergrund (n=5/5) wurden auf die Gesamtfläche des jeweiligen Nierenschnittes bezogen. In (c) wurde das Verhältnis von Kortex- zu Medulla-Fläche berechnet (NMRI: **p=0,01). Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Bei männlichen Mäusen mit NMRI-Hintergrund ist der Kortex von *Fto*^{-/-} im Vergleich zu wildtypischen Mäusen signifikant verkleinert, die Medulla jedoch signifikant vergrößert (Abb. 3.2 a und b). Männliche Mäuse mit BN-Hintergrund zeigen das umgekehrte, zuvor vermutete Ergebnis. Hier weist der Kortex im Verhältnis zur Gesamtfläche eine signifikant größere Fläche auf, während die Medulla signifikant kleiner ist (Abb. 3.2 a und b). Beide Resultate führen aber auch zu einem veränderten Verhältnis der Kortex- zur Medullafläche. So ist das Verhältnis bei männlichen *Fto*^{-/-}-Mäusen mit NMRI-Hintergrund signifikant um 40% reduziert, während es bei männ-

lichen $Fto^{-/-}$ -Mäusen mit BN-Hintergrund beinahe signifikant ($p=0,06$) um 20% erhöht ist (Abb. 3.2 c).

3.2 Männliche $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit NMRI-Hintergrund zeigen eine gesteigerte Urinabgabe

Da renale Glomeruli für die Produktion des Primärharns verantwortlich sind (Stevens und Lowe, 1992) und aufgrund der erhöhten Glomerulidichte und der veränderten Kortex- und Medullaflächen, wurde nun die Frage aufgeworfen, ob die Urinproduktion adulter $Fto^{-/-}$ -Mäuse bezüglich der Menge verändert ist. Um dies zu überprüfen, wurde in metabolischen Einzelmauskäfigen der 24h-Urin von $Fto^{-/-}$ -Mäusen und deren wildtypischen Geschwistern im Alter von sieben, 17 und 31 Wochen gesammelt. Zusätzlich wurde das Trink- sowie das Fressverhalten dieser Mäuse während ihres Aufenthalts in diesen Käfigen analysiert.

Die innerhalb von 24 Stunden aufgenommene Menge Wasser und ausgeschiedene Menge Urin zeigt für beide Geschlechter und auch für beide genetischen Hintergründe in den meisten Fällen nicht-signifikante Tendenzen zu einer Veränderung bei $Fto^{-/-}$ -Tieren (Abb. 3.3 a und b). Die Wasseraufnahme von $Fto^{-/-}$ -Männchen (Abb. 3.3 a) und -Weibchen (Abb. 3.3 b) mit BN-Hintergrund ist beinahe signifikant reduziert ($p=0,06$ bzw. $p=0,08$). Außerdem ist die Urinproduktion von $Fto^{-/-}$ -Weibchen mit NMRI-Hintergrund fast signifikant erhöht ($p=0,06$; Abb. 3.3 b). Das Verhältnis von Urinabgabe zu Wasseraufnahme zeigt im Umkehrschluss für weibliche Mäuse keine Unterschiede (Abb. 3.3 d). Allerdings ist dieses Verhältnis bei männlichen $Fto^{-/-}$ -Mäusen mit NMRI-Hintergrund signifikant um fast das Vierfache erhöht, während die Werte der männlichen Mäuse mit BN-Hintergrund keine Unterschiede aufweisen (Abb. 3.3 c).

Bezogen auf das Körpergewicht konnte gezeigt werden, dass sowohl Wasseraufnahme als auch Urinabgabe weiblicher $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit NMRI-Hintergrund innerhalb von 24 Stunden signifikant erhöht sind. Diese Tiere nehmen fast das Doppelte mehr an Wasser auf und produzieren mehr als das Dreifache an Urin (Abb. 3.3 e). Weibliche $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit BN-Hintergrund dagegen tendieren zu einer um knapp die Hälfte reduzierten Wasseraufnahme und produzieren, mit nur einem Drittel im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern, signifikant weniger Urin bezogen auf ihr Körpergewicht (Abb. 3.3 f). Männliche Mäuse zeigen auch bezogen auf das Körpergewicht keine Unterschiede in Wasseraufnahme oder Urinproduktion (vgl. Abb. 9.2).

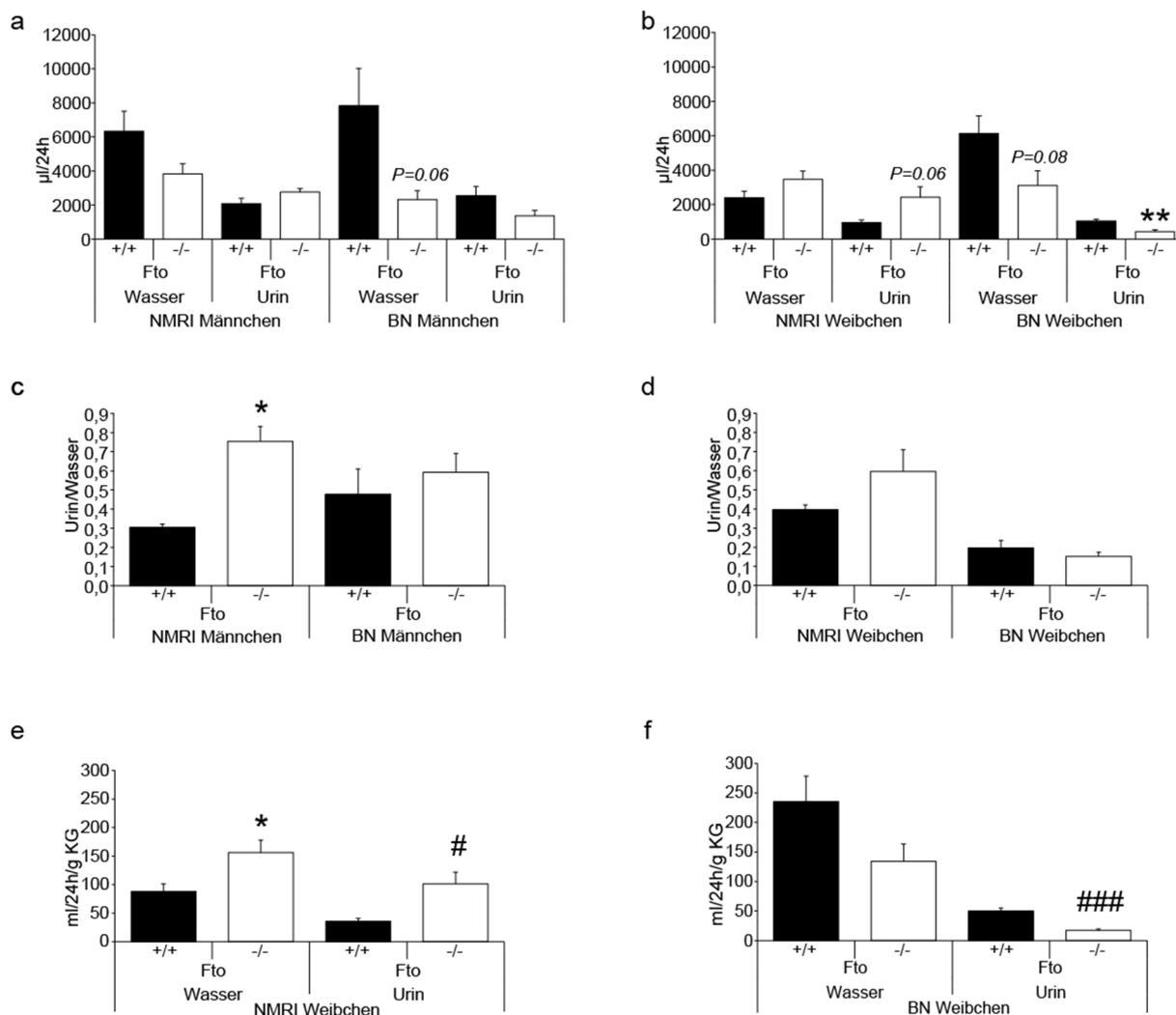


Abbildung 3.3: Trinkverhalten und Urinproduktion.

Gezeigt sind die Mengen an aufgenommenem Wasser und ausgeschiedenem Urin innerhalb eines Tages von (a) männlichen Mäusen mit NMRI- ($n=3/3$) und BN-Hintergrund ($n=5/5$) sowie (b) weiblichen Mäusen mit NMRI- ($n=5/5$) und BN-Hintergrund ($n=4/5$; $**p=0,01$). In (c) ist das Verhältnis von Urin- zu Wassermenge für männliche Mäuse mit NMRI- ($*p=0,04$) und BN-Hintergrund dargestellt. In (d) ist dieses Verhältnis für weibliche Mäuse präsentiert. (e) Bezogen auf das Körpergewicht (KG) in Gramm weisen Weibchen mit NMRI-Hintergrund sowohl im Trinkverhalten ($*p=0,05$) als auch in der Urinproduktion ($\#p=0,02$) signifikante Unterschiede auf. (f) Weibchen mit BN-Hintergrund zeigen ebenfalls signifikante Unterschiede in der Urinproduktion ($###p=0,0009$). Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Bezug nehmend auf das Fressverhalten konnte für männliche $Fto^{-/-}$ -Mäuse gezeigt werden, dass solche mit NMRI-Hintergrund signifikant weniger fressen als ihre wildtypischen Geschwister (Abb. 3.4 a). Weibliche Mäuse nehmen innerhalb von 24 Stunden insgesamt weniger Nahrung zu sich als männliche. Allerdings zeigt die Auswertung des Fressverhaltens für weibliche Mäuse keine Unterschiede (Abb. 3.4 b). Bezogen auf das jeweilige Körpergewicht, welches bei $Fto^{-/-}$ -

Mäusen geringer ist, relativiert sich bei männlichen Mäusen mit NMRI-Hintergrund die vorherige Signifikanz auf einen nur noch fast signifikanten Wert von 0,07 (Abb. 3.4 c).

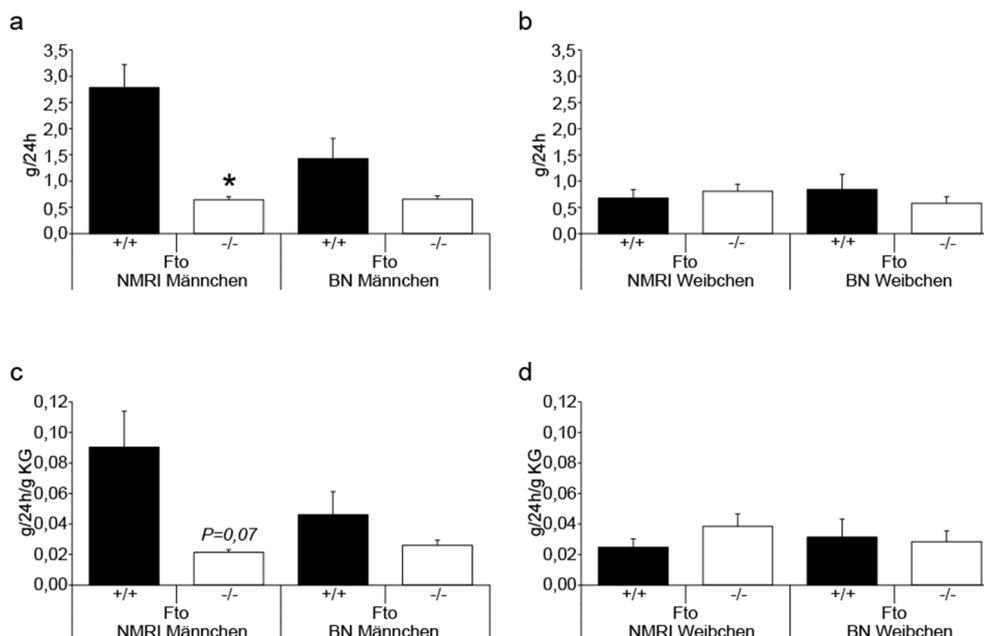


Abbildung 3.4: Fressverhalten.

Gezeigt sind die innerhalb eines Tages aufgenommenen Futtermengen von (a) männlichen Mäusen mit NMRI- (n=2/3; *p=0,02) und BN-Hintergrund (n=5/5) sowie von (b) weiblichen Mäusen mit NMRI- (n=5/5) und BN-Hintergrund (n=3/5). Außerdem ist die Futtermenge (c) männlicher und (d) weiblicher Mäuse bezogen auf das Körpergewicht (KG) in Gramm dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Männliche Mäuse mit BN-Hintergrund zeigen keinen signifikanten Unterschied im Fressverhalten, auch nicht bezogen auf ihr Körpergewicht (Abb. 3.4 a und c). Die Nahrungsaufnahme pro Gramm Körpergewicht weist bei weiblichen *Fto*^{-/-}-Mäusen mit NMRI-Hintergrund im Vergleich zum Wildtyp einen leichten, aber nicht signifikanten Anstieg auf (Abb. 3.4 d).

3.3 Der Verlust von FTO führt bei Mäusen im Alter von sieben Wochen zu verringerten Kreatininwerten im Urin

Um Rückschlüsse auf die Nierenfunktion ziehen zu können, wurde die Zusammensetzung des Urins untersucht. Zunächst wurden die Kreatininkonzentrationen im 24h-Urin bestimmt. Kreatinin ist eine harnpflichtige Substanz. Die Konzentration im Urin gibt die Menge Kreatinin an, welche innerhalb von 24 Stunden von der Niere ausgeschieden wird. Die Kreatininwerte im Urin

von sieben Wochen alten *Fto*^{-/-}-Mäusen mit NMRI-Hintergrund sind im Vergleich zu wildtypischen Mäusen signifikant um etwa die Hälfte reduziert (Abb. 3.5 a und b). Bei sieben Wochen alten Tieren mit BN-Hintergrund zeigen lediglich weibliche *Fto*^{-/-}-Mäuse eine fast signifikante Reduktion der Kreatininkonzentration um etwa 17% ($p=0,07$; Abb. 3.5 b).

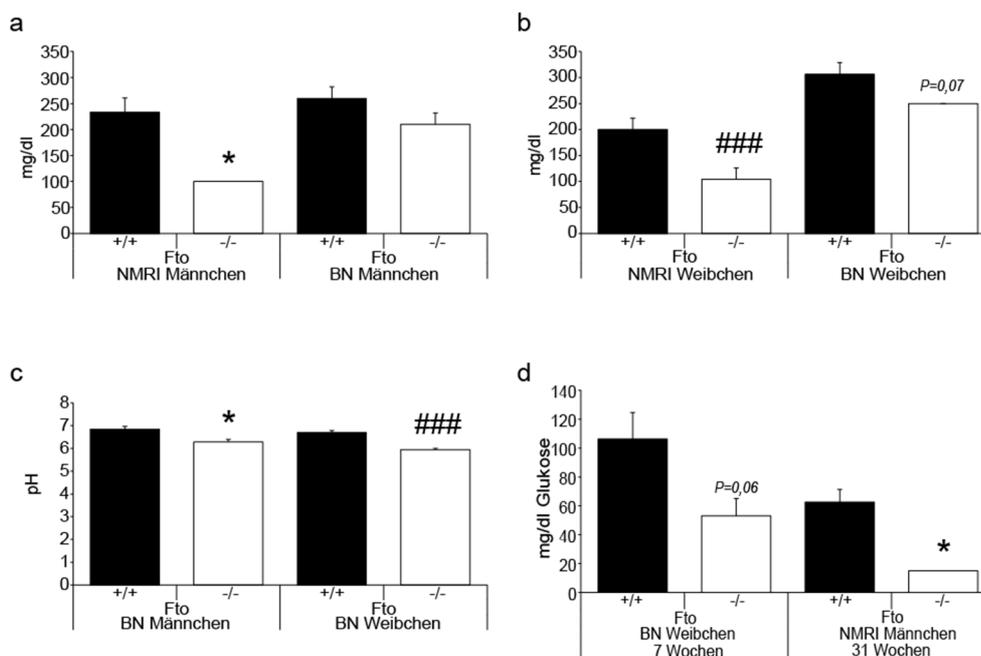


Abbildung 3.5: Bestimmung unterschiedlicher Parameter im Urin.

Hier sind die Urin-Kreatininwerte von (a) männlichen Mäusen mit NMRI- ($n=3/3$; $*p=0,02$) und BN-Hintergrund ($n=5/5$) sowie (b) weiblichen Mäusen mit NMRI- ($n=6/6$; $###p=0,0005$) und BN-Hintergrund ($n=4/4$) im Alter von sieben Wochen dargestellt. (c) zeigt die Unterschiede in den pH-Werten von Urinproben männlicher ($*p=0,02$) und weiblicher ($###p=0,0002$) Mäuse mit BN-Hintergrund. In (d) sind die Urin-Glukosewerte von sieben Wochen alten Weibchen mit BN-Hintergrund ($n=4/5$) und 31 Wochen alten Männchen mit NMRI-Hintergrund ($*p=0,02$; $n=2/3$) abgebildet. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Außerdem wurde der pH-Wert in den Urinproben bestimmt. Die pH-Werte des Urins von *Fto*^{-/-}-Mäusen mit BN-Hintergrund sind leicht, aber doch signifikant niedriger als die Werte ihrer wildtypischen Geschwister (Abb. 3.5 c).

Zusätzlich wurden weitere Metabolite im Urin bestimmt. Hier wurden ausschließlich Unterschiede im Glukosegehalt festgestellt. Sieben Wochen alte weibliche *Fto*^{-/-}-Mäuse mit BN-Hintergrund scheiden mit dem Urin 50% weniger Glukose aus als wildtypische Mäuse gleichen Geschlechts und Alters ($p=0,06$; Abb. 3.5 d). Bei männlichen Mäusen mit NMRI-Hintergrund im Alter von 31 Wochen ist der Unterschied mit einer Reduktion um etwa 76% signifikant (Abb. 3.5 d).

Die Bestimmung der Protein-Konzentration (vgl. Abb. 9.3 a und b), Urobilinogen, Bilirubin, Blut, Ketonen, Nitriten und Leukocyten mittels der Teststreifen ergab keine Unterschiedlichkeiten (vgl. Tab. 9.1).

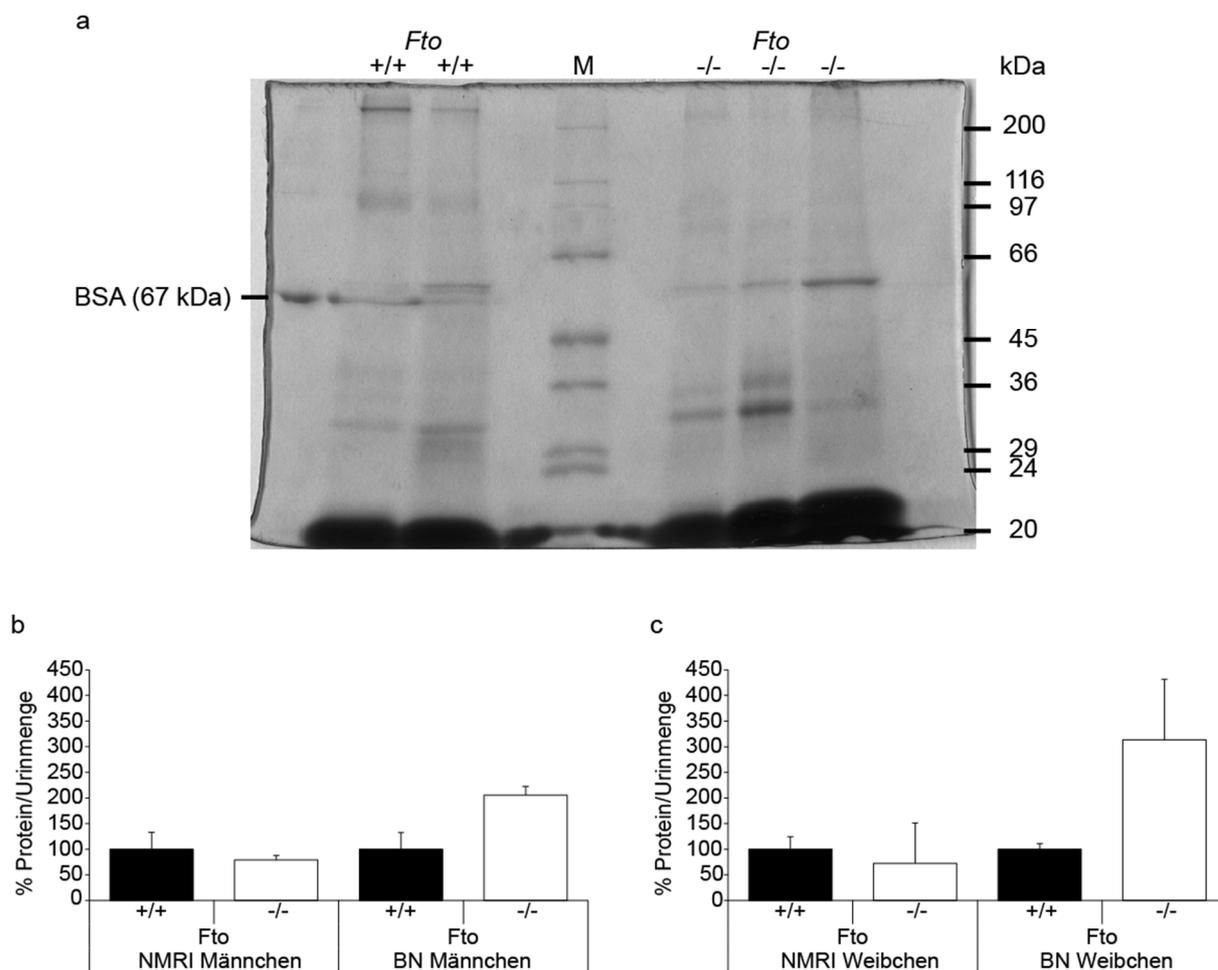


Abbildung 3.6: Detektion von Proteinen im Urin.

(a) zeigt beispielhaft die Schwarz-Weiß-Version eines Coomassie-gefärbten SDS-Gels. Es sind die der Größe nach aufgetrennten Proteine von zwei Urinproben wildtypischer und drei Urinproben *Fto*-negativer Mäuse zu sehen. Zur ungefähren Überprüfung der Proteingrößen sowie der Lauffront der Proteine wurde ein Proteinstandard (Marker, M) aufgetragen. Da die Proben unbehandelt und ohne Probenpuffer blieben, wurde außerdem auch unbehandeltes bovines Serumalbumin (BSA) zur Kontrolle aufgetragen. Für die Auswertung (b, c) wurden die mit Hilfe von ImageJ ermittelten Proteinmengen auf die Menge Urin bezogen und die Werte der wildtypischen Mäuse jeweils auf 100% normiert. Es sind Daten für (b) männliche Mäuse mit NMRI- ($n=3/3$) und BN-Hintergrund ($n=4/4$) sowie die Daten von (c) weiblichen Mäusen mit NMRI- ($n=4/4$) und BN-Hintergrund ($n=4/4$) dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Um den Proteingehalt der Urinproben genauer zu untersuchen, wurden die Proteine über eine SDS-PAGE (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ihrer Größe nach

aufgetrennt und mit Hilfe von ImageJ der Gesamtproteingehalt ermittelt (Abb. 3.6). Die Urinproben wurden hierzu unbehandelt auf das Gel aufgetragen. Zum Größenabgleich wurde außerdem eine unbehandelte Probe BSA (bovines Serumalbumin) sowie ein mit Probenpuffer versetzter Proteinstandard (Marker, M) aufgetragen. Auf Abbildung 3.6 a ist zu erkennen, dass die Bande für BSA mit einer Größe von 67 kDa nicht mit dem Größenabgleich des Proteinstandards übereinstimmt, da sie sich unterhalb der 66 kDa-Bande des Markers befindet.

Es sind Unterschiede im Bandenmuster der Proteine zwischen den Genotypen zu erkennen (Abb. 3.6 a), jedoch weisen sowohl männliche (Abb. 3.6 b) als auch weibliche (Abb. 3.6 c) Mäuse mit NMRI-Hintergrund insgesamt keine deutlichen Unterschiede in der Protein- bezogen auf die Urinmenge auf. Bei Tieren mit BN-Hintergrund ist eine nicht-signifikante Tendenz zu einer erhöhten Ausscheidung von Proteinen zu erkennen, welche bei männlichen *Fto*^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.6 b) jedoch nicht ganz so stark ausgeprägt ist wie bei weiblichen (Abb. 3.6 c).

3.4 *Fto*^{-/-}-Mäuse mit BN-Hintergrund weisen eine erhöhte Herzfrequenz auf

Eine weitere Aufgabe der Niere ist die Kontrolle des Blutdrucks. Hierbei ist die Zahl der Glomeruli entscheidend, wobei eine verringerte Nephronzahl mit einem erhöhten Blutdruck einhergeht (Brenner et al., 1988; Keller et al., 2003; Koeners et al., 2008). Der Blutdruck ist aber auch abhängig von der Adrenalin- und Leptin-Konzentration im Blut. Beides führt in erhöhter Konzentration zu einer Hypertonie (Elliott, 1905; Agata et al., 1997; Shek et al., 1998; Suter et al., 1998; Correia et al., 2001; Rahmouni und Morgan, 2007).

Bei *Fto*^{-/-}-Mäusen wurden bereits erhöhte Adrenalinwerte im Plasma, und damit eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems, nachgewiesen. Außerdem sind die Leptinwerte in Plasmaproben von *Fto*^{-/-}-Mäusen deutlich reduziert (Fischer et al., 2009). Dies führte zu der Annahme, dass der Blutdruck dieser Mäuse möglicherweise verändert sein könnte. In engem Zusammenhang mit dem Blutdruck steht die Herzfrequenz (Puls) (Mancia et al., 1983). Daher wurden sowohl der Blutdruck als auch die Herzfrequenz bei Mäusen unterschiedlicher Altersstufen untersucht.

Bei *Fto*^{-/-}-Mäusen mit BN-Hintergrund zeigen die Messungen der Herzfrequenz bei beiden Geschlechtern und in fast allen Altersstufen eine signifikante Erhöhung um etwa 10-20% im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.7 a). Eine Ausnahme bilden 30 Wochen alte Weibchen, hier ist die Steigerung um 4% nicht signifikant. Außerdem ist zu beobachten, dass die Pulswerte sowohl der männlichen als auch der weiblichen wildtypischen Mäuse über die Zeit der Messungen abnehmen, während der Puls der *Fto*^{-/-}-Mäuse stagniert oder sogar ansteigt (Abb. 3.7 b und c).

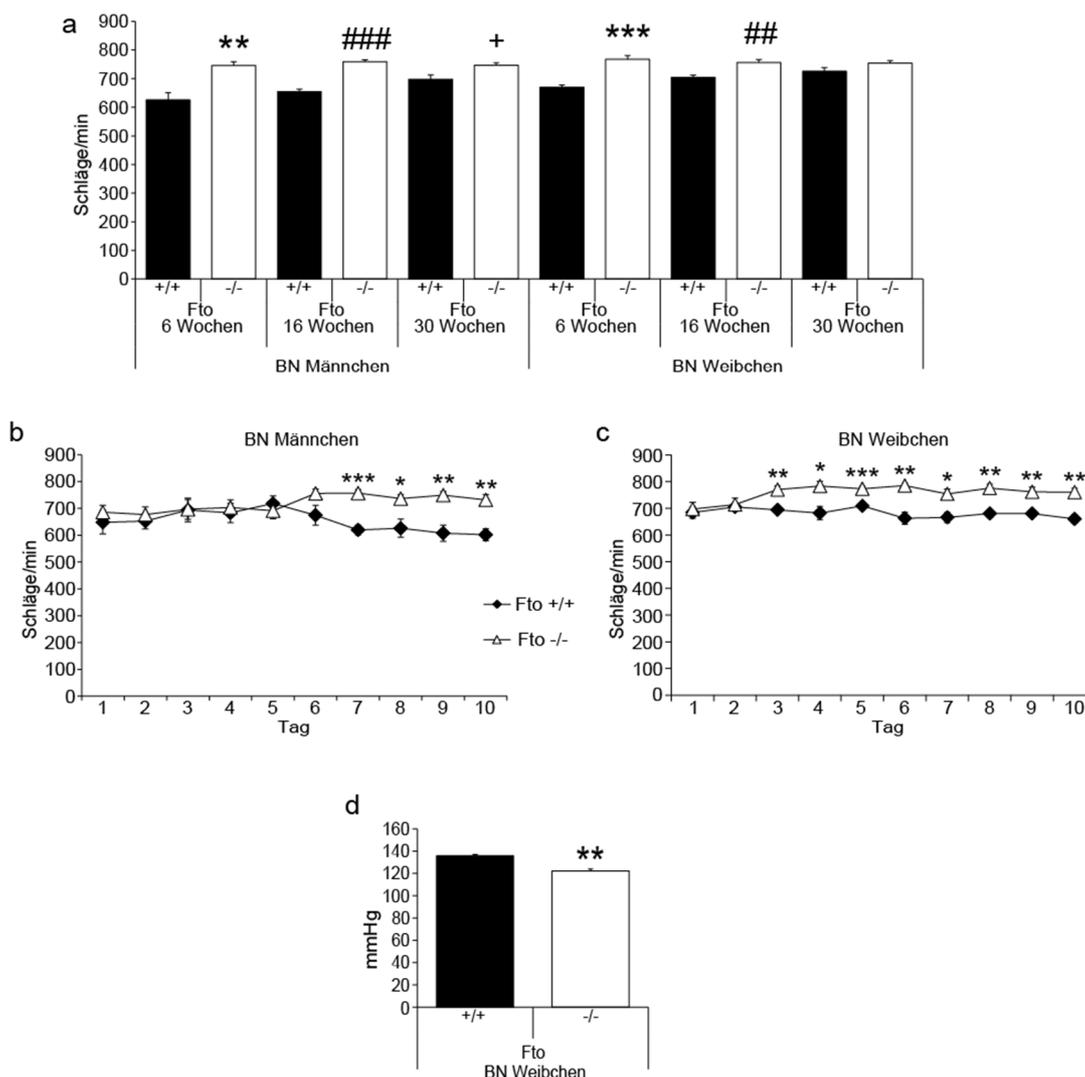


Abbildung 3.7: Veränderungen von Herzfrequenz und Blutdruck bei Mäusen mit BN-Hintergrund.

(a) zeigt die Herzfrequenz von männlichen sechs ($n=5/5$), 16 ($n=5/5$) und 30 ($n=5/4$) Wochen alten (** $p=0,006$; ### $p=0,00002$; + $p=0,05$) sowie weiblichen sechs ($n=4/5$), 16 ($n=4/5$) und 30 ($n=4/4$) Wochen alten (** $p=0,001$; ## $p=0,008$) Mäusen. Außerdem sind die Pulswerte über die Zeit der Messungen für (b) männliche (** $p=0,0005$; * $p=0,03$; ** $p=0,005$; ** $p=0,005$) und (c) weibliche Mäuse (** $p=0,007$; * $p=0,03$; *** $p=0,001$; ** $p=0,002$; * $p=0,02$; ** $p=0,004$; ** $p=0,01$; ** $p=0,004$) im Alter von sechs Wochen aufgetragen. In (d) sind die Blutdruckwerte der Übungswoche für sechs Wochen alte weibliche Mäuse dargestellt (** $p=0,01$). Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Im Alter von etwa fünf Wochen, in der ersten Woche der Gewöhnung an das Blutdruckmessen, konnte bei weiblichen Mäusen mit BN-Hintergrund ein signifikant niedrigerer Blutdruck festgestellt werden (Abb. 3.7 d). Die eigentlichen Messungen des Blutdrucks von Mäusen mit BN-Hintergrund zeigen jedoch keine Unterschiede (Abb. 3.8 a). Auch Mäuse mit NMRI-Hintergrund wiesen zu keiner Zeit Unterschiede im Blutdruck auf (Abb. 3.8 b).

Beim Puls zeigen männliche $Fto^{-/-}$ -Mäuse ebenfalls keine Abweichungen zu den Werten ihrer wildtypischen Geschwister (Abb. 3.8 c). Bei weiblichen $Fto^{-/-}$ -Mäusen im Alter von 16 Wochen

ist jedoch eine schwache Tendenz und im Alter von sechs ($p=0,07$) und 30 Wochen ($p=0,06$) eine fast signifikante Erhöhung der Herzfrequenz zu erkennen (Abb. 3.8 c).

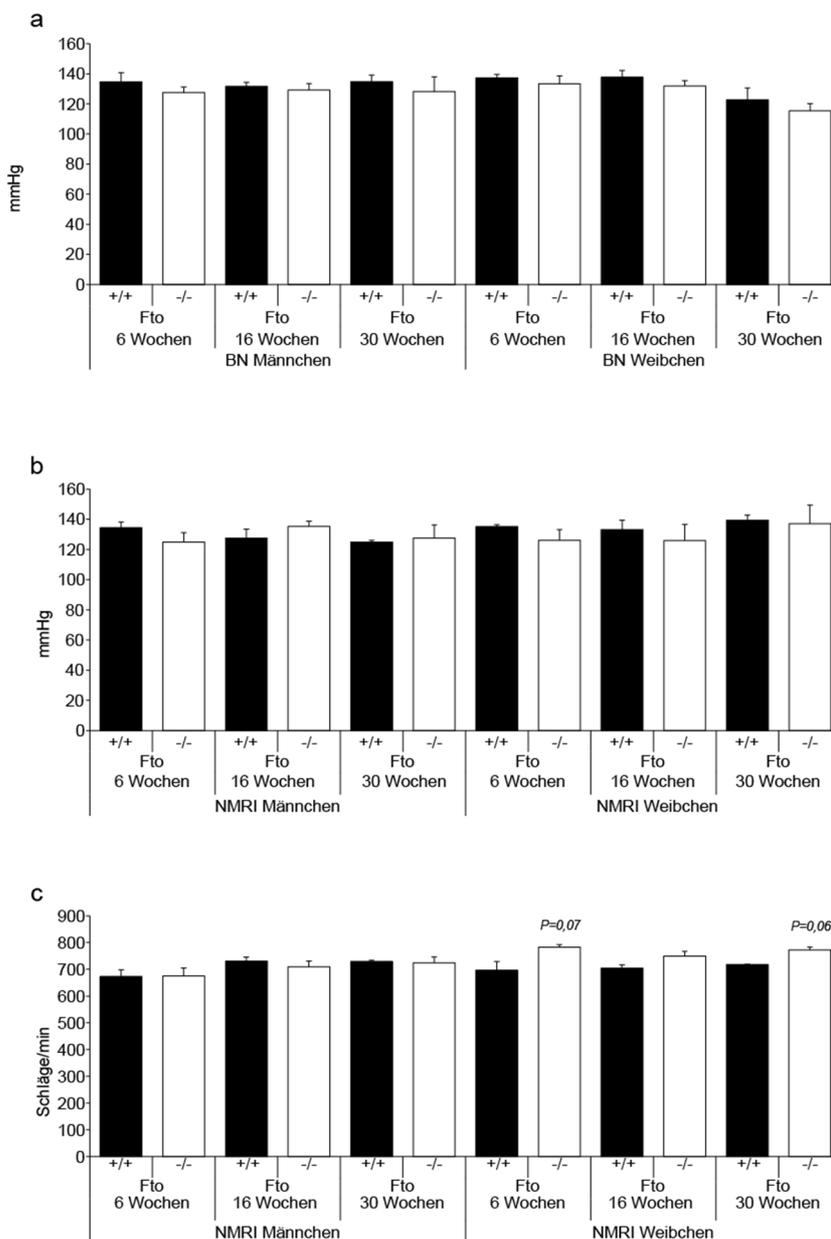


Abbildung 3.8: Blutdruck und Herzfrequenz.

(a) zeigt den Blutdruck von sechs ($n=5/5$), 16 ($n=5/5$) und 30 ($n=5/4$) Wochen alten männlichen und sechs ($n=4/5$), 16 ($n=4/5$) und 30 ($n=4/4$) Wochen alten weiblichen Mäusen mit BN-Hintergrund. In (b) sind die Blutdruckwerte für männliche sechs ($n=3/3$), 16 ($n=2/3$) und 30 ($n=2/3$) sowie für weibliche sechs ($n=4/4$), 16 ($n=5/4$) und 30 ($n=2/3$) Wochen alte Mäuse mit NMRI-Hintergrund dargestellt. Außerdem ist in (c) die Herzfrequenz sechs, 16 und 30 Wochen alter männlicher und weiblicher Mäuse mit NMRI-Hintergrund aufgetragen. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Allerdings sei generell zu erwähnen, dass bei weiblichen *Fto*^{-/-}-Mäusen beider Hintergründe sowie bei männlichen *Fto*^{-/-}-Mäusen mit BN-Hintergrund besonders im Alter von sechs und 16 Wochen eine leichte, jedoch nicht signifikante Tendenz zu einem niedrigeren Blutdruck zu erkennen ist (Abb. 3.8 a und b).

3.5 *Fto*^{-/-}-Mäuse zeigen Abweichungen in der Glomerulientwicklung

3.5.1 Unterschiede auf histologischer Ebene

Um herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung zum ersten Mal eine gesteigerte Glomerulidichte bei *Fto*^{-/-}-Mäusen sichtbar wird, wurden die Nieren von Embryonen mit NMRI- und BN-Hintergrund unterschiedlicher Entwicklungsstadien (E14.5, E15.5, E16.5 und E18.5) untersucht.

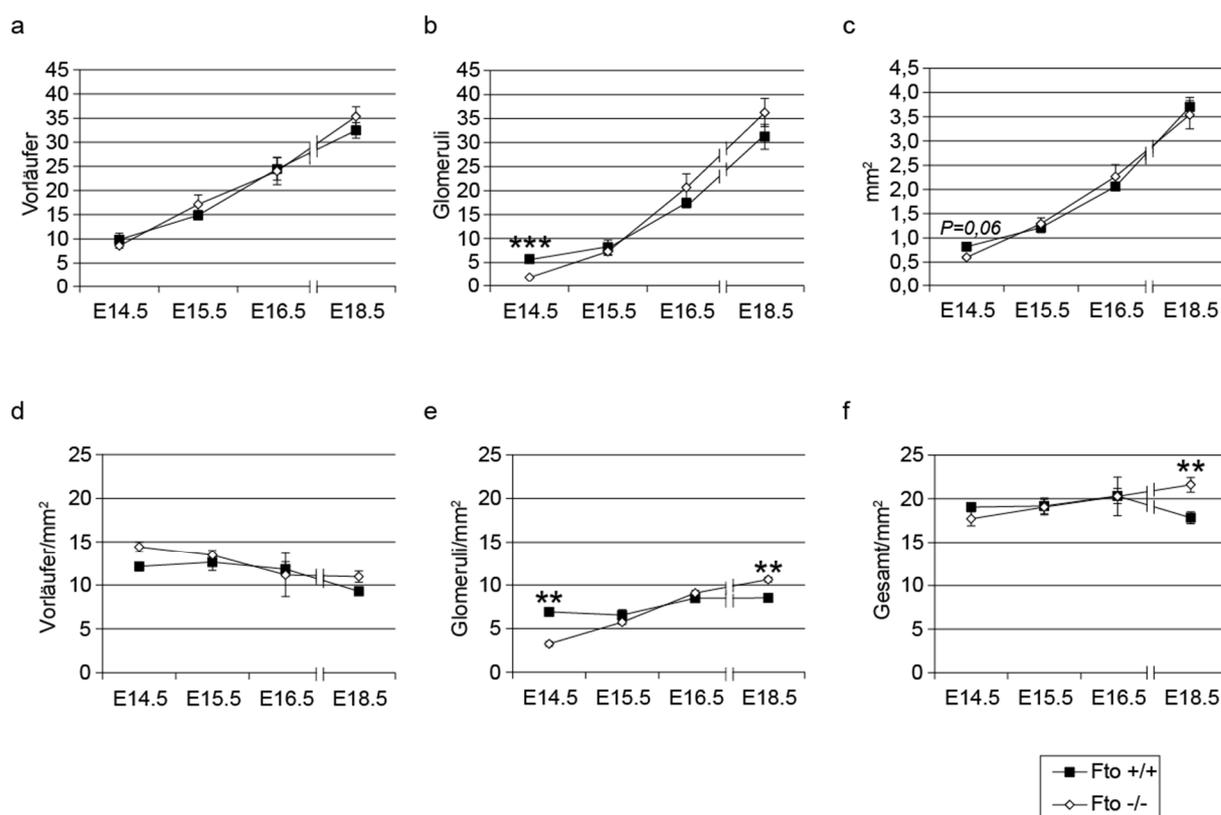


Abbildung 3.9: Anzahl und Dichte der Glomeruli-Vorläufer und fertig ausgebildeten Glomeruli in Nieren von Mausembryonen mit NMRI-Hintergrund.

Gezeigt ist die Zahl von (a) Glomeruli-Vorläufern und (b) bereits ausgebildeten Glomeruli (**p=0,001) während der Stadien E14.5 (n=2/4), E15.5 (n=6/5), E16.5 (n=5/2) und E18.5 (n=5/6). In (c) ist die Fläche der Nierenschnitte dargestellt, auf welche dann jeweils die Anzahl der (d) Vorläufer und (e) Glomeruli (**p=0,002) bezogen wurde. Außerdem ist in (f) die Dichte von Vorläufern und Glomeruli gemeinsam abgebildet (**p=0,01). Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Zunächst wurden hier sowohl Glomeruli-Vorläufer als auch voll entwickelte Glomeruli auf Nierenschnitten ausgezählt (Abb. 3.9 und 3.10). Die Nieren von Embryonen mit NMRI-Hintergrund weisen bei allen untersuchten Embryonalstadien keine Unterschiede in der Anzahl der Glomeruli-Vorläufer auf (Abb. 3.9 a). Auch bezogen auf die Nierenfläche, welche ausschließlich bei 14.5 Tage alten Embryonen um ein Viertel verkleinert ist (Abb. 3.9 c), sind keine signifikanten Abweichungen zwischen $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Embryonen zu erkennen (Abb. 3.9 d).

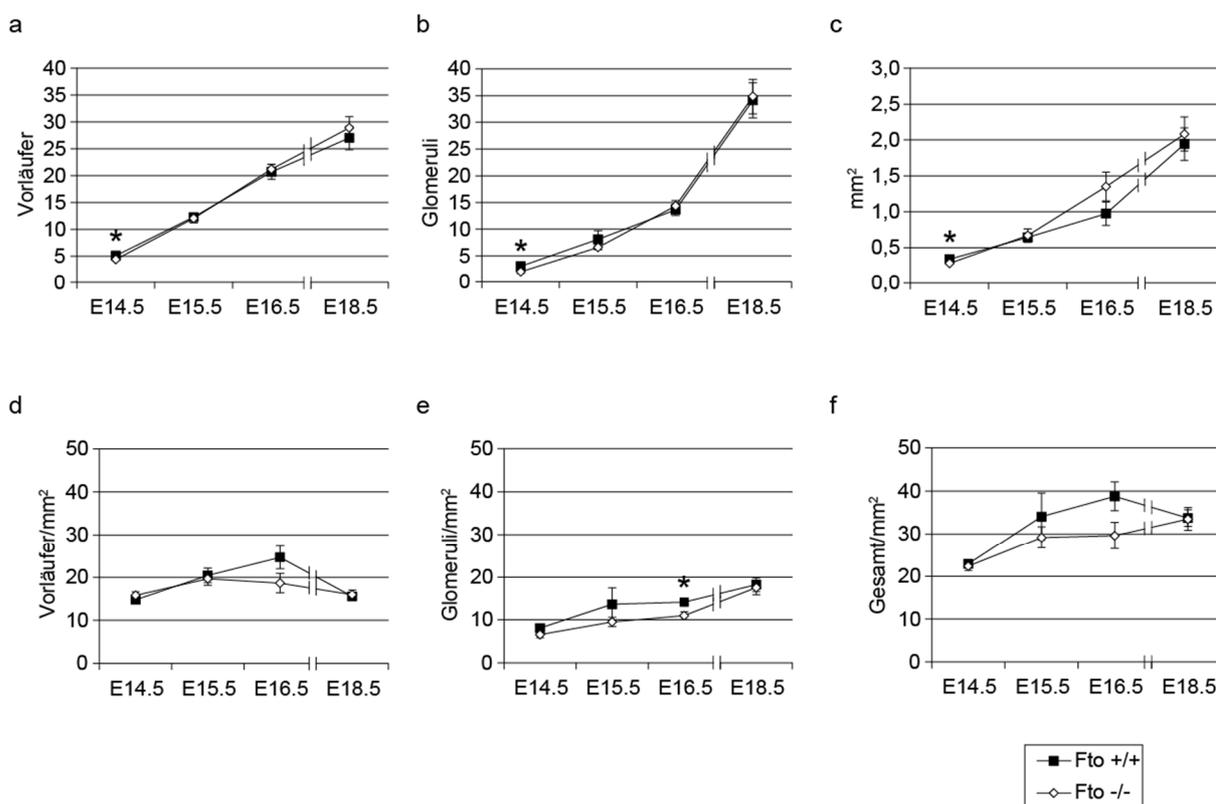


Abbildung 3.10: Anzahl und Dichte der Glomeruli-Vorläufer und fertig ausgebildeten Glomeruli in Nieren von Mausembryonen mit BN-Hintergrund.

Dargestellt ist die Anzahl der (a) Glomeruli-Vorläufer (* $p=0,04$) und (b) bereits ausgebildeten Glomeruli (* $p=0,02$) zu den Zeitpunkten E14.5 ($n=5/5$), E15.5 ($n=5/5$), E16.5 ($n=5/6$) und E18.5 ($n=5/6$). In (c) ist die Fläche der Nierenschnitte aufgetragen (* $p=0,02$), auf welche die Anzahl der (d) Vorläufer und (e) Glomeruli (* $p=0,05$) bezogen wurde. In (f) ist die Dichte von Vorläufern und Glomeruli gemeinsam dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Die Zahl der Glomeruli in Nieren von $Fto^{-/-}$ -Embryonen ist zum Zeitpunkt E14.5 um zwei Drittel geringer als in Nieren ihrer wildtypischen Geschwister (Abb. 3.9 b). Bezogen auf die Nierenfläche variiert die Anzahl noch stärker zu distinkten Zeitpunkten (E14.5 und E18.5). Während bei $Fto^{-/-}$ -Embryonen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern zum Zeitpunkt E14.5 nur

knapp die Hälfte an Glomeruli pro Quadratmillimeter ausgebildet sind, ist die Dichte im Stadium E18.5 bereits um 20% erhöht. Bei den Stadien E15.5 und E16.5 können keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Abb. 3.9 e). Die Dichte von Vorläufern und voll entwickelten Glomeruli zusammen ist im Stadium E18.5 ebenfalls um etwa 20% höher (Abb. 3.9 f).

Im Gegensatz dazu zeigen Embryonen mit BN-Hintergrund während der Entwicklung kaum Unterschiede. Lediglich in Stadium E14.5 ist bei *Fto*^{-/-}-Embryonen die Zahl der Vorläufer um 15% (Abb. 3.10 a) sowie die Anzahl der Glomeruli um 35% (Abb. 3.10 b) verringert. Auch die Nierenfläche ist zu diesem Zeitpunkt signifikant verkleinert (Abb. 3.10 c). Bezogen auf die Fläche sind bei den Glomeruli-Vorläufern keine Unterschiede mehr zu erkennen (Abb. 3.10 d). Im Stadium E16.5 ist die Glomerulidichte bei *Fto*^{-/-}-Embryonen um etwa 20% niedriger (Abb. 3.10 f). Die Gesamtzahlen von Vorläufern und voll entwickelten Glomeruli wiederum zeigen bezogen auf die Nierenfläche keine signifikanten Unterschiede.

3.5.2 Unterschiede auf mRNA-Ebene

Um mögliche molekulare Ursachen für die Unterschiede in der Glomeruli-Entwicklung herauszufinden, wurde auf mRNA-Ebene die Expression verschiedener Gene untersucht, welche an der Entwicklung der Glomeruli maßgeblich beteiligt sind und Einfluss auf die spätere Anzahl der entwickelten Nephrone haben. Dazu zählen sowohl Gene wie *Gdnf* und *Fgf8*, die von Zellen des metanephrogenen Mesenchyms exprimiert werden, als auch Gene wie *Ret* und *Wnt11*, welche von ureteralen Zellen exprimiert werden. *Gdnf*, *Ret* und *Wnt11* sind dabei wichtig für die Anzahl der Verzweigungen der Ureterknospe, von denen die Zahl der später ausgebildeten Nephrone abhängt. *Fgf8* hingegen spielt eine große Rolle in der Entwicklung spezifischer glomerulärer Reifestadien (*S-shaped bodies*; S-förmige Glomeruli-Vorläufer) und bei der Regulation der Genexpression sowie dem Überleben der Zellen, welche für die Bildung der Nephrone unabdingbar sind, und hat so ebenfalls Einfluss auf die Nephronzahl (Majumdar et al., 2003; Grieshammer, 2005; Cain et al., 2009; Michos et al., 2010).

Gdnf wird ab dem Stadium E13.5 von Zellen des undifferenzierten metanephrogenen Mesenchyms exprimiert, welches an das kondensierende, die Spitzen der Ureterknospe umgebende Mesenchym angrenzt. Es spielt eine wichtige Rolle für die epithelial-mesenchymale Interaktion, welche unbedingt notwendig für die Entwicklung der Nephrone ist (Saxén und Sariola, 1987; Hellmich, 1996). Die Analysen zeigen, dass die Menge an *Gdnf*-mRNA in Nieren von *Fto*^{-/-}-

Mäusen mit NMRI-Hintergrund im Stadium E14.5 um fast die Hälfte und in Nieren von *Fto*^{-/-}-Mäusen mit BN-Hintergrund im Stadium E16.5 um etwa 15% erhöht ist (Abb. 3.11 a).

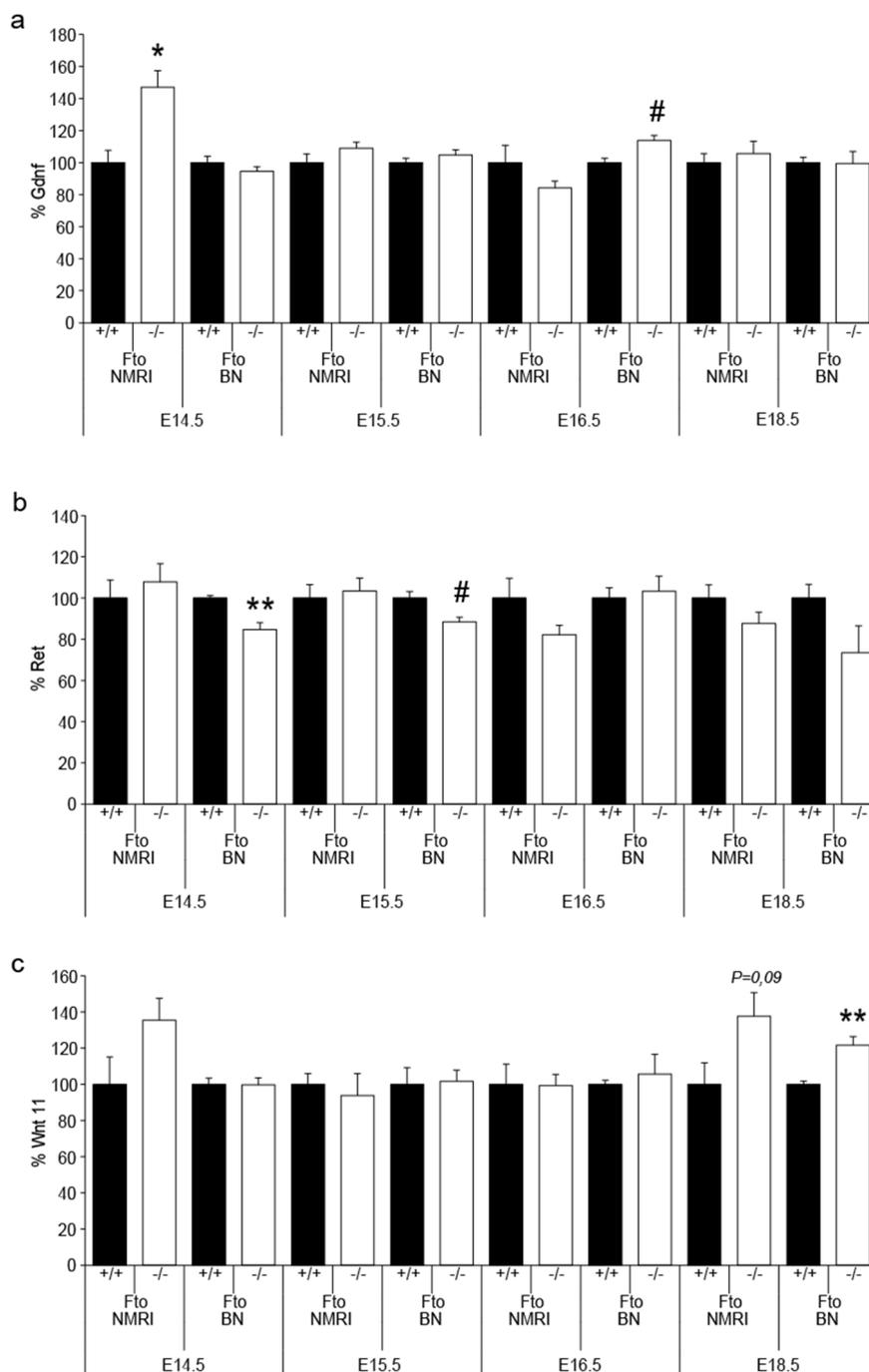


Abbildung 3.11: Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen in Nieren verschiedener Embryonalstadien für *Gdnf*, *Ret* und *Wnt11* via semiquantitativer RT-PCR.

(a) *Gdnf*- (*p=0,02; #p=0,02), (b) *Ret*- (**p=0,003; #p=0,03) und (c) *Wnt11*-mRNA-Expression (**p=0,005) in Nieren von Mäusen mit NMRI- und BN-Hintergrund der Embryonalstadien E14.5 (NMRI: n=2/4; BN: n=6/6), E15.5 (NMRI: n=6/5; BN: n=6/6), E16.5 (NMRI: n=5/2; BN: n=6/6) und E18.5 (NMRI: n=5/6; BN: n=5/5). Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Um die zuvor erwähnte epithelial-mesenchymale Interaktion zu realisieren, muss GDNF an seinen Rezeptor RET, eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, und dessen Co-Rezeptor GFR α 1 (*GDNF family receptor alpha 1*) binden, welche von den Epithelzellen der Ureterknospe exprimiert werden (Durbec et al., 1996; Cacalano et al., 1998). Die mRNA-Expression von *Ret* ist in Nieren von *Fto*^{-/-}-Mäusen mit BN-Hintergrund während der Stadien E14.5 und E15.5 signifikant um etwa 15% reduziert (Abb. 3.11 b).

Wnt11 wird als Zielgen der RET/GDNF-Signalkaskade ebenfalls im Epithel der Ureterknospe exprimiert. Über eine positive Rückkopplungsschleife findet eine Autoregulation der Expression von *Ret/Gdnf* und *Wnt11* statt, wodurch der Verzweigungsprozess der Ureterknospe geregelt wird. An den Enden der Verzweigungen werden letztendlich die Glomeruli gebildet (Kispert et al., 1996; Majumdar et al., 2003). Im Stadium E18.5 ist in Nieren von *Fto*^{-/-}-Mäusen mit NMRI-Hintergrund eine fast signifikante Zunahme der *Wnt11*-Expression von knapp 40%, in Nieren von Embryonen mit BN-Hintergrund eine signifikante Zunahme von 20% zu sehen (Abb. 3.11 c).

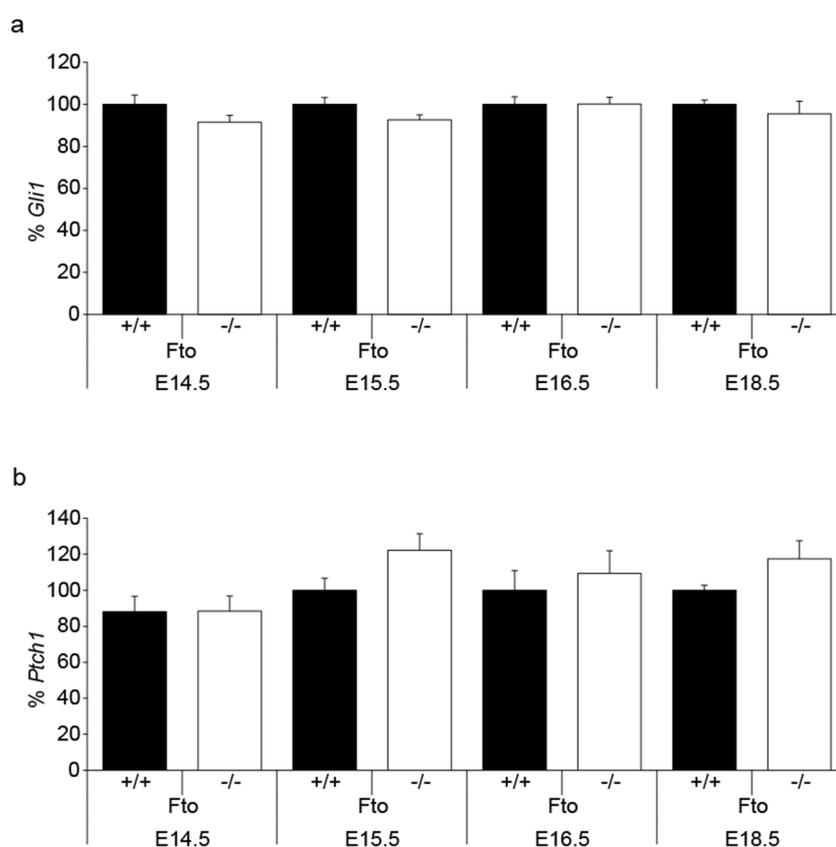


Abbildung 3.12: Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen in Nieren verschiedener Embryonalstadien für *Gli1* und *Ptch1* via Real-Time-PCR.

(a) *Gli1*- und (b) *Ptch1*-mRNA-Expression in Nieren von Mäusen mit BN-Hintergrund der Embryonalstadien E14.5 (n=6/6), E15.5 (n=6/6), E16.5 (n=6/6) und E18.5 (n=5/5). Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Die Expression von *Ret* und *Wnt11* wird außerdem über die Anwesenheit des GLI3-Repressors (GLI3^R) reguliert (Cain et al., 2009), welcher bei nicht anwesendem SHH-Signal exprimiert wird (vgl. 1.4.2.3). Es konnte eine verstärkte GLI3^R-Expression in Nieren von 14.5 Tage alten Embryonen mit BN-Hintergrund gezeigt werden (Samper Agrelo, 2012). Weitere Gene, welche eine wichtige Rolle in der Nephronentwicklung spielen und in engem Zusammenhang mit dem SHH-Signalweg stehen, sind *Gli1* und *Patched1* (*Ptch1*). Die Transkription von *Gli1* wird dabei ebenfalls über die Anwesenheit von SHH reguliert. *Ptch1* hingegen wird ausschließlich in epithelialen Vorläuferzellen des Ureters und in den in der Medulla befindlichen Sammelrohren exprimiert und beschränkt so als Faktor des Sonic-hedgehog- (SHH-) Signalweges die GLI3^R-Aktivität auf den Kortextbereich der Niere (Hu et al., 2006; Cain et al., 2009).

Auf diesem Hintergrund wurde die Expression von *Gli1* und *Ptch1* in Embryonen mit BN-Hintergrund mittels Real-Time-PCR untersucht, zeigte jedoch zu keinem Zeitpunkt der analysierten Entwicklungsstadien Unterschiede auf (Abb. 3.12 a und b).

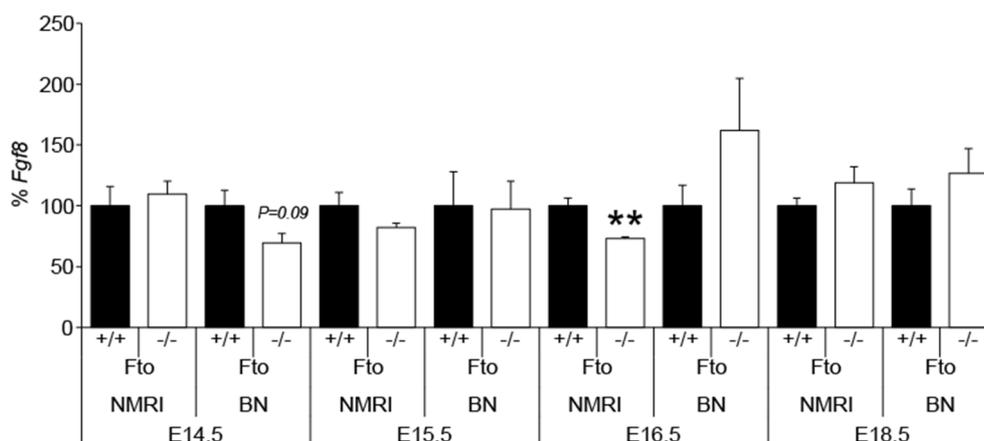


Abbildung 3.13: Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen in Nieren verschiedener Embryonalstadien für *Fgf8* via semiquantitativer RT-PCR.

Gezeigt ist die *Fgf8*-mRNA-Expression in Nieren von Mäusen mit NMRI- und BN-Hintergrund der Embryonalstadien E14.5 (NMRI: n=2/4; BN: n=6/6), E15.5 (NMRI: n=6/5; BN: n=6/6), E16.5 (NMRI: n=5/2 (**p=0,004); BN: n=6/6) und E18.5 (NMRI: n=5/6; BN: n=5/5). Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Wie bereits erwähnt, kommt auch *Fgf8* eine Rolle in der frühen Nephronentwicklung zu. *Fgf8* wird ab dem Zeitpunkt E12.0 zunächst rund um die Ureterknospe von Zellen des entstehenden Nephrons, später von Zellen der renalen Vesikel exprimiert (Grieshammer et al., 2005).

Die *Fgf8*-Expression ist zu bestimmten Entwicklungsstadien um etwa 30% reduziert (Abb. 3.13). In Nieren von Embryonen mit NMRI-Hintergrund ist diese Reduktion zum Zeitpunkt E16.5 zu

sehen und weist außerdem eine Signifikanz auf. In Nieren von Embryonen mit BN-Hintergrund ist dieser Unterschied im Alter von 14.5 Tagen nur als Tendenz ($p=0,09$) zu erkennen.

Um einen Zusammenhang der oben gezeigten Variationen zur Expression von *Fto* zu untersuchen und herauszufinden, ob es Expressions-Unterschiede in Nieren der verschiedenen Embryonalstadien sowie zwischen Tieren beider genetischer Hintergründe gibt, wurde außerdem die *Fto*-Expression in Nieren von Embryonen mit NMRI- und BN-Hintergrund untersucht.

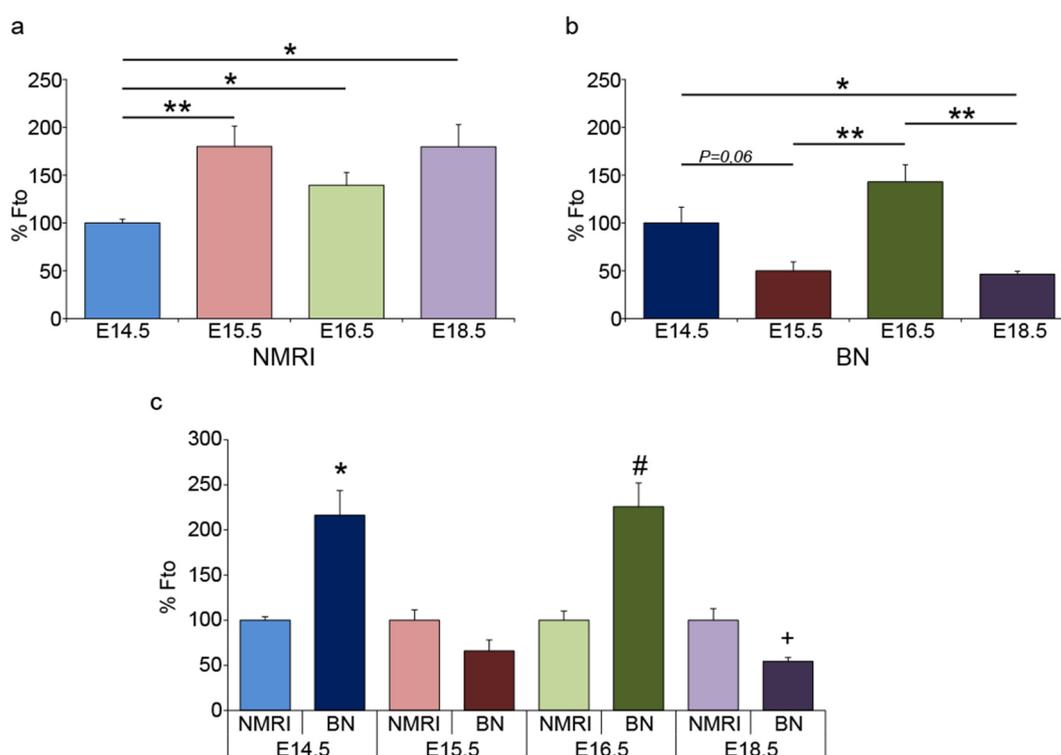


Abbildung 3.14: Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen in Nieren verschiedener Embryonalstadien für *Fto* via semiquantitativer RT-PCR.

In (a) ist die *Fto*-mRNA-Expression in Nieren von Mäusen mit NMRI-Hintergrund der Embryonalstadien E14.5 ($n=2/4$), E15.5 ($n=6/5$; * $p=0,01$), E16.5 ($n=5/2$; * $p=0,05$) und E18.5 ($n=5/6$; * $p=0,02$) dargestellt. (b) zeigt die *Fto*-mRNA-Expression in Nieren von Embryonen mit BN-Hintergrund der Stadien E14.5 ($n=6/6$), E15.5 ($n=6/6$), E16.5 ($n=6/6$; ** $p=0,003$) und E18.5 ($n=5/5$; * $p=0,04$; ** $p=0,002$). In beiden Fällen (a und b) wurde die Expression in Nieren von 14.5 Tage alten Embryonen auf 100% normiert und die anderen Werte jeweils darauf bezogen. In (c) wurde die *Fto*-mRNA-Expression in Nieren der NMRI-Embryonen für alle Altersklassen jeweils auf 100% normiert und die Expression in Nieren der BN-Embryonen (* $p=0,01$; # $p=0,003$; + $p=0,02$) darauf bezogen dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

In Nieren von Embryonen mit NMRI-Hintergrund ist die Expression von *Fto* zum Zeitpunkt E14.5 am niedrigsten. In Nieren der Stadien E15.5 und E18.5 ist sie im Vergleich dazu um 80% gesteigert, bei E16.5 um etwa 40% (Abb. 3.14 a). In Nieren von Embryonen mit BN-Hintergrund variiert die *Fto*-Expression während der Zeitpunkte E15.5 und E18.5 entgegengesetzt und ist,

verglichen zum Stadium E14.5, jeweils um die Hälfte reduziert (Abb. 3.14 b). Die Erhöhung um 50% in Nieren von Mäusen des Embryonalstadiums 16.5 ist in Bezug auf das Stadium E14.5 nicht signifikant. Verglichen mit E15.5 und E18.5 wird *Fto* hier allerdings beinahe drei Mal so stark exprimiert.

Die Betrachtung der einzelnen Embryonalstadien in Bezug auf die Hintergründe lässt erkennen, dass die *Fto*-Expression in Nieren von Embryonen mit BN-Hintergrund, im Vergleich zu jenen mit NMRI-Hintergrund, zum Zeitpunkt E14.5 und E16.5 um mehr als das Doppelte erhöht ist. Die Reduktion um 35% bei 15.5 Tage alten Embryonen im Vergleich zu Nieren von Embryonen mit NMRI-Hintergrund ist nicht signifikant, im Gegensatz zu der um 45% verringerten *Fto*-Expression bei E18.5 (Abb. 3.14 c).

4. Diskussion

Bei ersten Untersuchungen wurde eine gesteigerte Glomerulidichte auf Transversalschnitten von Nieren weiblicher *Fto*-defizienter Mäuse mit NMRI-Hintergrund, besonders im anterioren und posterioren Bereich, beobachtet (Zingsem, 2010). Diese Erkenntnis konnte in der vorliegenden Arbeit für die gesamte Niere auf Längsschnitten bestätigt werden. Außerdem stellte sich heraus, dass dieses Ergebnis auch auf männliche Mäuse sowohl mit NMRI- als auch mit BN-Hintergrund übertragbar ist. Daraus lässt sich schließen, dass FTO eine entscheidende Aufgabe während der Nierenentwicklung innehat.

4.1 FTO spielt eine Rolle während der Nephrogenese

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Geschwindigkeit der Entwicklung der Glomeruli von der An- bzw. Abwesenheit von FTO abhängig ist. Allerdings spielt hier auch der genetische Hintergrund eine Rolle. Bei *Fto*^{-/-}-Mäusen mit NMRI-Hintergrund ist, verglichen mit deren *Fto*^{+/+}-Geschwistern, zunächst eine Verzögerung der Glomerulientwicklung zu erkennen (E14.5). Allerdings ist eine gesteigerte Glomerulidichte bereits ab dem Stadium E18.5 zu beobachten (vgl. Abb. 3.9). *Fto*^{-/-}-Mäuse mit BN-Hintergrund hingegen weisen während der gesamten Embryonalentwicklung eine Retardierung bezüglich der Nephrogenese im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern auf (vgl. Abb. 3.10). Da die Nierenentwicklung bei der Hausmaus jedoch erst um den fünften bis zehnten Tag nach der Geburt abgeschlossen ist (Guron und Friberg, 2000; Dickinson et al., 2005), holen *Fto*^{-/-}-Mäuse mit BN-Hintergrund vermutlich neonatal in der Nierenentwicklung zunächst auf, so dass die Anzahl der Glomeruli schließlich übereinstimmt (vgl. Abb. 3.1 e). Da die Nierenschnitte der kleineren *Fto*^{-/-}-Mäuse (vgl. Fischer et al., 2009) jedoch eine kleinere Fläche aufweisen als ihre wildtypischen Geschwister (vgl. Abb. 9.1 a und b), resultiert daraus letztendlich eine erhöhte Glomerulidichte, welche im adulten Tier deutlich sichtbar wird (vgl. Abb. 3.1 f). Obwohl *Fto*^{-/-}-Mäuse und deren Nieren kleiner sind, führt der Verlust des *Fto*-Gens also zur Entwicklung der gleichen Anzahl von Glomeruli wie in den Nieren wildtypischer Mäuse und damit zu einer erhöhten Glomerulidichte. Eine ähnliche Konsequenz durch den Verlust eines Gens wurde bisher nur für Mäuse beschrieben, bei denen das SHH-Signal konditionell innerhalb der Zellen des ureteralen Epithels ausgeschaltet wurde. Die Gesamtzahl der Glomeruli war hier zwar reduziert, bezogen auf das ebenfalls stark verkleinerte Nierenvolumen resultierte dies allerdings in einer erhöhten Glomerulidichte (Yu et al., 2002). Bei adulten *Fto*^{-/-}-Mäusen mit

NMRI-Hintergrund ist im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern ebenfalls ein verringertes Nierenvolumen zu beobachten (vgl. Abb. 9.4). Bei männlichen *Fto*^{-/-}-Mäusen mit NMRI- wie auch mit BN-Hintergrund variiert die Zahl der Glomeruli pro Nierenschnitt nicht (vgl. Abb. 3.1 e). Bezogen auf die jeweils stark verkleinerte Nierenfläche (vgl. Abb. 9.1 a) ist allerdings in beiden Fällen die Glomerulidichte erhöht (vgl. Abb. 3.1 f). Adulte weibliche *Fto*^{-/-}-Mäuse weisen ebenso ein geringeres Nierenvolumen auf als deren weibliche *Fto*^{+/+}-Geschwister (vgl. Abb. 9.4). Die bereits signifikant erhöhte Anzahl Glomeruli (vgl. Abb. 3.1 e), bezogen auf die kaum verkleinerte Fläche (vgl. Abb. 9.1 b), zeigt hier ebenfalls eine erhöhte Glomerulidichte (vgl. Abb. 3.1 f).

Die Verkleinerung des Nierenvolumens erzielte bei den *Shh*-mutanten Mäusen keine Unterschiede im Verhältnis von Kortex zu Medulla (Yu et al., 2002). Demgegenüber weist die Gattung der Stachelmäuse (*Acomys*) im Vergleich zur Hausmaus eine verringerte Glomerulizahl sowie ein verkleinertes Verhältnis von Kortex zu Medulla auf. Es wird vermutet, dass diese Kombination eine bessere Konzentrationsfähigkeit des Urins begünstigt (Dickinson et al., 2005). Aufgrund dieser Sachlage wurden zusätzlich die Flächen von Kortex und Medulla in Nieren erwachsener männlicher Mäuse untersucht. Auch hier scheint das Fehlen von FTO einen Einfluss auf die Größenentwicklung zu haben, jedoch abhängig vom genetischen Hintergrund. Bezug nehmend auf die Stachelmäuse ist bei männlichen *Fto*^{-/-}-Mäusen mit NMRI-Hintergrund im Vergleich zu ihren *Fto*^{+/+}-Geschwistern ebenfalls ein verringertes Verhältnis von Kortex- zu Medullafläche zu erkennen. Im Gegensatz dazu weisen männliche *Fto*^{-/-}-Mäuse mit BN-Hintergrund, verglichen mit ihren wildtypischen Geschwistern, ein vergrößertes Verhältnis auf (vgl. Abb. 3.2 c).

In jedem Fall kann davon ausgegangen werden, dass FTO eine Rolle während der Nephrogenese spielt und dass das Fehlen von FTO letztendlich aufgrund der erhöhten Glomerulidichte zu einer insgesamt vergrößerten Filtrationsfläche bezogen auf die verkleinerte Nierenfläche führt. Dies wirft außerdem die Vermutung auf, dass sich das Fehlen von FTO möglicherweise auf die spätere Nierenfunktion auswirkt (siehe Abschnitt 4.2).

4.1.1 Die Geschwindigkeit der Nierenentwicklung ist abhängig vom genetischen Hintergrund

Vergleiche zwischen *Fto*^{-/-}-Embryonen mit NMRI-Hintergrund und solchen mit BN-Hintergrund zeigen einen versetzten Entwicklungsfortschritt der Nieren. Während jene mit NMRI-Hintergrund bereits im Stadium E14.5 eine gesteigerte *Gdnf*-Expression und im Embryonalstadi-

um 18.5 eine höhere Glomerulidichte aufweisen als wildtypische Embryonen, ist die *Gdnf*-Expression bei *Fto*^{-/-}-Embryonen mit BN-Hintergrund am Embryonaltag 16.5 im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern erhöht, wobei die gesteigerte Glomerulidichte vermutlich erst postnatal nachweisbar sein wird (vgl. Abb 3.9 und 3.10). Ferner zeigen Analysen der *Fto*-Expression der einzelnen Embryonalstadien starke Unterschiede in Form inverser Expressionschwankungen (vgl. Abb. 3.14). Dies lässt womöglich auf unterschiedliche Entwicklungsstände der Embryonen schließen, welche auf den genetischen Hintergrund zurückzuführen sind und weist auf eine retardierte Nierenentwicklung der Mäuse mit BN- im Vergleich zu jenen mit NMRI-Hintergrund hin.

Unterschiedlich lange embryonale Entwicklungszeiträume bei verschiedenen Mausstämmen sind nicht unnatürlich. So ist die Entwicklung der Niere bei der Stachelmaus schon vor der Geburt abgeschlossen, während die der Hausmaus darüber hinaus andauert (Guron und Friberg, 2000; Dickinson et al., 2005).

4.1.2 Regulation des ziliär vermittelten SHH-Signalwegs durch FTO

Obwohl eine Erhöhung der absoluten Zahl der Glomeruli bisher ausschließlich bei weiblichen *Fto*^{-/-}-Mäusen mit NMRI- Hintergrund gezeigt werden konnte, so ist doch bei beiden Geschlechtern die Glomeruli-Dichte erhöht (vgl. Abb. 3.1 e und f). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass bezogen auf die Nierenfläche eine im Vergleich zum Wildtyp vergrößerte Filtrationsfläche vorliegt, deren Entstehung durch Expressionsunterschiede in verschiedenen, die Glomeruli-Entwicklung betreffenden Genen, erklärt werden sollte.

In der Maus kommt es während der Entwicklung des Metanephros zu einer positiven autoregulatorischen Rückkopplungsschleife zwischen GDNF-Signalen aus Zellen des metanephrogenen Mesenchyms, welche über den Rezeptor RET vermittelt werden, und WNT11-Signalen aus Zellen der Ureterknospe. Hierdurch wird zunächst die dichotome Verzweigung der Ureterknospe kontrolliert und schließlich die Anzahl der Nephrone festgelegt (Grobstein, 1955; Durbec et al., 1996; Vega et al., 1996; Pepicelli et al., 1997; Majumdar et al., 2003). Die Expression von *Ret* und *Wnt11* wird durch den GLI3-Repressor kontrolliert, welcher in Abwesenheit eines SHH-Signals aus dem GLI3-Vollängenprotein prozessiert wird (Cain et al., 2009), was bei *Fto*^{-/-}-Mäusen mit BN-Hintergrund im Stadium E14.5 verstärkt erfolgt (Samper Agrelo, 2012). Auch konnten Schwankungen der *Fgf8*-Expression während der Embryonalentwicklung gezeigt werden (vgl. Abb. 3.13). FGF8 ist für das Überleben von Nephron-Progenitorzellen, die Bildung S-

förmiger Glomeruli-Vorläufer und damit für die Entstehung von Glomeruli verantwortlich (Grieshammer et al., 2005).

Studien lassen vermuten, dass FTO eine Funktion hinsichtlich der Proliferation innehat (Boissel et al., 2009; Jäger, 2012; Zhang et al., 2012). Ferner wird angenommen, dass SHH in der Lage ist, die Expression von Mitgliedern der FGF-Familie in der Niere zu beeinflussen (Gill und Rosenblum, 2006). Sowohl Expressionsunterschiede der oben genannten Gene während verschiedener Embryonalstadien als auch die erhöhte Glomerulidichte in *Fto*-defizienten Mäusen deuten somit darauf hin, dass FTO einen regulatorischen Einfluss auf den SHH-Signalweg besitzt.

Es wurde bereits die Vermutung einer negativen Regulation aufgestellt, wodurch es beim Verlust von *Fto* zu einer ektopischen SHH-Expression kommt (Jäger, 2012). In vivo wurde eine solche ektopische Expression durch die konditionelle Inaktivierung des Rezeptors Patched1 (PTCH1) in der Niere von Mausembryonen fingiert. Dies führte im Stadium E13.5 zu einer verminderten Expression von *Wnt11* und *Ret* und damit auch zu einer reduzierten *Gdnf*-Expression. Außerdem wurde durch die Überaktivierung des SHH-Signalwegs weniger GLI3 zu GLI3^R prozessiert, was letztendlich in der Ausbildung kleinerer Nieren mit weniger Glomeruli resultierte (Cain et al., 2009).

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass 14.5 Tage alte *Fto*^{-/-}-Embryonen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern kleinere Nieren besitzen (vgl. Abb. 3.9 c und 3.10 c). Ebenfalls ist die Anzahl der Glomeruli (vgl. Abb. 3.9 b bzw. 3.10 b) – und bei *Fto*^{-/-}-Embryonen mit BN-Hintergrund auch die Zahl der Glomeruli-Vorläufer (vgl. Abb. 3.10 a) – in diesem Stadium verringert. Hier scheint sich die Hypothese von FTO als negativem Regulator des SHH-Signalweges zu bestätigen. Bei Mäusen mit BN-Hintergrund bestärkt außerdem die reduzierte *Ret*-Expression in Nieren von *Fto*^{-/-}-Embryonen der Stadien E14.5 und E15.5 diese Vermutung (vgl. Abb. 3.11 b). Allerdings kann in *Fto*^{-/-}-Embryonen zu keinem der hier analysierten Stadien eine verminderte *Ptch1*- oder verstärkte *Gli1*-Expression nachgewiesen werden, was eine vermutete ektopische Expression von *Shh* untermauern würde (vgl. Abb. 3.12).

Ähnliche Ergebnisse konnten hingegen bei Störungen des anterograden (von der Zilienbasis zur Spitze) intraflagellaren Transports (IFT) durch den Verlust der primären Zilien in der Niere gezeigt werden. Hier wurde die Expression des für den anterograden IFT wesentlichen *Kif3a*-Gens konditionell in Zellen des metanephrogenen Mesenchyms ausgeschaltet, was neben einer verringerten Expression von *Wnt11* und *Ret* auch eine verminderte *Fgf8*-Expression in den Nieren der Mausembryonen zur Folge hatte (Chi et al., 2013). KIF3a spielt überdies eine Rolle in der Übertragung des SHH-Signals (Huangfu et al., 2003). In einigen Organen *Fto*-defizienter Tiere konnte

bereits eine Verkürzung der Zilien festgestellt werden, was auf eine Störung des ziliären Transports hinweisen könnte (Pritzel, 2013). Eine verringerte *Fgf8*-Expression konnte in der vorliegenden Arbeit zum Zeitpunkt E14.5 in Nieren von *Fto*^{-/-}-Embryonen mit BN-Hintergrund und zum Zeitpunkt E16.5 in Nieren von *Fto*^{-/-}-Embryonen mit NMRI-Hintergrund beobachtet werden (vgl. Abb. 3.13). Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen Störungen im IFT von Zilien und Defekten in der SHH-Signalkaskade ist anzunehmen, dass primäre Zilien unerlässlich für die Weiterleitung des SHH-Signals sind (Goetz und Anderson, 2010). Dies lässt auf eine Kohärenz zwischen FTO und dem IFT innerhalb der Zilie schließen. Hier findet sich demnach auch eine Verbindung zwischen FTO und der Weiterleitung des SHH-Signals durch die primäre Zilie.

Die verstärkte *Gdnf*-Expression in Nieren 14.5 Tage alter *Fto*^{-/-}-Embryonen mit NMRI-Hintergrund (vgl. Abb. 3.11 a) spricht jedoch gegen die aufgestellte Hypothese einer negativen Regulation der SHH-Signalkaskade durch FTO. In *Fto*^{-/-}-Embryonen mit BN-Hintergrund ist eine verstärkte *Gdnf*-Expression zum Zeitpunkt E16.5 zu beobachten (vgl. Abb. 3.11 a). Dies beides deutet vielmehr auf eine Reduktion der SHH-Expression in *Fto*-defizienten Mäusen hin – und damit auf eine Rolle für FTO als positiver Regulator des SHH-Signalwegs. Gefestigt wird diese Hypothese dadurch, dass zum Zeitpunkt E18.5 *Fto*^{-/-}-Embryonen mit NMRI-Hintergrund mehr Glomeruli ausgebildet haben als ihre wildtypischen Geschwister (vgl. Abb. 3.9 b und e) und eine verstärkte *Wnt11*-Expression aufweisen, welche auch bei *Fto*^{-/-}-Embryonen diesen Alters mit BN-Hintergrund detektiert werden konnte (vgl. Abb. 3.11 c).

Der IFT ist für die Prozessierung der GLI-Aktivatoren sowie des GLI3-Repressors unbedingt notwendig. Mutationen, welche zu Funktionsstörungen des IFT führen, beeinträchtigen außerdem die Weiterleitung des SHH-Signals. In manchen Zelltypen kommt es dadurch zu einem Verlust der SHH-Signalkaskade, in anderen zu einer Verstärkung (Huangfu und Anderson, 2005; Liu et al., 2005; May et al., 2005; Ocbina und Anderson, 2008).

Das SHH-Signal ist während der Nierenentwicklung auf Zellen der Medulla und des Ureters beschränkt und kann nicht in Zellen des Kortex nachgewiesen werden (Cain et al., 2009). Aufgrund des verringerten Verhältnisses von Kortex- zu Medullafläche bei männlichen *Fto*^{-/-}-Mäusen mit NMRI-Hintergrund (vgl. Abb. 3.2 c) würde dies auf embryonaler Ebene für eine Ausdehnung des SHH-Signals sprechen. Bei männlichen *Fto*^{-/-}-Mäusen mit BN-Hintergrund, welche ein vergrößertes Kortex-zu-Medulla-Verhältnis aufweisen (vg. Abb 3.2 c), wäre demnach von einer Reduktion des SHH-Signals auszugehen. Ein reduziertes SHH-Signal in Form einer verstärkten GLI3^R-Expression konnte bereits in Nieren 14.5 Tage alter Embryonen mit BN-Hintergrund gezeigt werden (Samper Agrelo, 2012).

Diese Resultate sprechen in ihrer Gesamtheit dafür, dass FTO als Regulator der SHH-Signalkaskade über die Kontrolle des ziliären IFT wirkt. Dies geschieht jedoch gewebe- und altersspezifisch und führt, abhängig von weiteren Faktoren, zu einer Verstärkung oder Verringerung des SHH-Signals.

4.2 Auswirkungen der strukturellen Veränderungen auf die Nierenfunktion

Die vorliegenden strukturellen Veränderungen innerhalb der Nieren *Fto*-defizienter Mäuse lassen den Schluss zu, dass auch die Nierenfunktion betroffen sein könnte. Die beobachtete erhöhte Glomerulidichte legt zunächst die Vermutung nahe, dass die Filtration des Blutes und somit die Urinproduktion beeinträchtigt ist. Diese Annahme wird unterstützt durch Analysen von Nieren adulter weiblicher *Fto*^{-/-}-Mäuse mit BN-Hintergrund, welche zeigen konnten, dass die Kapillarnetze innerhalb der Nierenkörperchen, also die Glomeruli selbst, verkleinert sind, aber mehr Nephren exprimieren (Samper Agrelo, 2012), welches für die Ultrafiltration des Blutes (Holzman et al., 1999) und somit für die Produktion des Primärharns erforderlich ist. Des Weiteren muss in Betracht gezogen werden, dass eine erhöhte Glomerulidichte Veränderungen im Blutdruck zur Folge hat (vgl. Brenner et al., 1988; Keller et al., 2003; Koeners et al., 2008). Gestützt wird diese Vermutung außerdem von der gesteigerten sympathischen Aktivität bei *Fto*^{-/-}-Mäusen, welche mit einer Erhöhung der Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentration im Plasma einhergeht, sowie von einer reduzierten Leptin-Konzentration im Blut *Fto*-defizienter Mäuse (Fischer et al., 2009). Eine erhöhte Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin führt in der Regel zu einer Verminderung der Nierenfunktion sowie einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, was letztendlich eine Erhöhung des Blutdrucks zur Folge hat (Vander, 1965; Wathen et al., 1965; Gordon et al., 1967; Hackenthal et al., 1990). Eine reduzierte Leptinkonzentration bewirkt hingegen einen Blutdruckabfall (Agata et al., 1997; Shek et al., 1998; Suter et al., 1998; Correia et al., 2001; Rahmouni und Morgan, 2007).

4.2.1 Eine Kombination aus genetischem Hintergrund und Geschlecht bedingt die Kompensation von Variationen in der Wasseraufnahme

Eine niedrige Nephronzahl ist mit einer Hyperfiltration und einer damit einhergehenden Vergrößerung der glomerulären Kapillarnetze verbunden. Dies wiederum resultiert in einer arteriellen Hypertonie (Keller et al., 2003; Luyckx et al., 2011; Schlote et al., 2013). Eine erhöhte Glomeru-

lidichte (vgl. Abb. 3.1 f) und verkleinerte Kapillarnetze (Samper Agrelo, 2012) in Nieren $Fto^{-/-}$ -defizienter Mäuse lassen auf eine Hypofiltration innerhalb der einzelnen Glomeruli und somit auf eine normale Filtration insgesamt schließen. Eine gesteigerte Nephrin-Expression innerhalb der Glomeruli dieser Mäuse (Samper Agrelo, 2012) lässt hingegen die Vermutung zu, dass die Filtration an sich hier stärker kontrolliert wird. Im Bezug dazu wurden das Trinkverhalten sowie die Urinproduktion untersucht.

Sowohl männliche als auch weibliche $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit BN-Hintergrund zeigen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern eine verringerte Wasseraufnahme, verbunden mit einer verminderten Urinabgabe (vgl. Abb. 3.3 a bzw. b, e und f), während weibliche $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit NMRI-Hintergrund im Vergleich zu ihren wildtypischen Schwestern eine gesteigerte Wasseraufnahme sowie Urinabgabe vorweisen (vgl. Abb. 3.3 b, e und f). Variationen in der Wasseraufnahme können demnach von Nieren weiblicher $Fto^{-/-}$ -Mäuse sowie männlicher Fto -defizienter Tiere mit BN-Hintergrund gut kompensiert werden.

Männliche $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit NMRI-Hintergrund hingegen zeigen, verglichen mit ihren $Fto^{+/+}$ -Geschwistern, eine erhöhte Urinproduktion, kombiniert mit einer verringerten Wasseraufnahme (vgl. Abb. 3.3 a und c) und sind demnach nicht in der Lage ihren Urin in angemessener Form zu konzentrieren. Dies könnte ein Hinweis auf einen gestörten Konzentrationsmechanismus sein, welcher auf Defekte bei der Filtration, aber auch im Reabsorptionsmechanismus innerhalb der Tubuli zurückzuführen sein könnte.

Die maximale Länge einer Henle-Schleife ist direkt proportional zur Dicke der Medulla (Beuchat, 1990) und die Fähigkeit der Konzentrierung von Urin ist abhängig von der Länge der Henle-Schleife. Je länger diese ist, desto größer ist die Fähigkeit, stark konzentrierten Urin zu produzieren (Schmidt-Nielsen und O'Dell, 1961). Ferner wird vermutet, dass eine verringerte Nephronzahl und ein verringertes Verhältnis von Kortex- zu Medullafläche in einer verbesserten Konzentrationsfähigkeit innerhalb der Niere unter Stressbedingungen resultiert (Dickinson et al., 2005).

Während der Sammlung des 24h-Urins waren die Mäuse in einem metabolischen Käfig psychischem und physischem Stress ausgesetzt. Die gewohnte Umgebung unter Geschwistern in einem mit Streu ausgelegten Käfig wurde gegen Einzelhaltung in einem Käfig mit Gitterboden ausgetauscht, in dem es aufgrund der durchsichtigen Wände keinerlei Versteckmöglichkeiten gibt. Versuche mit Mäusen mit BN-Hintergrund haben gezeigt, dass Fto -defiziente Tiere zu jeder Zeit ein gesteigertes Stressniveau aufweisen (Spsychala, 2012). Außerdem ist bekannt, dass psychosozialer Stress, wie beispielsweise die Isolation von Individuen, bei Mäusen zu Veränderungen in der Adrenalin- und Noradrenalinproduktion führt (Axelrod et al., 1970). Dies legt die Vermutung

nahe, dass das Stresslevel der $Fto^{-/-}$ -Mäuse in einer solchen Situation um ein Vielfaches gesteigert ist als das ihrer wildtypischen Geschwister.

Bei männlichen $Fto^{-/-}$ -Mäusen konnte neben der erhöhten Glomerulidichte (vgl. Abb. 3.1 f) bei vorliegendem BN-Hintergrund ein vergrößertes Verhältnis von Kortex- zu Medullafläche beobachtet werden (vgl. Abb. 3.2 c). Diese Kombination legt nahe, dass es zu einer Verschlechterung der Konzentrationsfähigkeit unter Stressbedingungen, also einer gesteigerten Urinabgabe kommen muss. Dennoch produzierten diese Mäuse eine geringere Urinmenge, welche mit der im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls verminderten Wasseraufnahme korreliert (vgl. Abb. 3.3 a und c). Demgegenüber weisen männliche $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit NMRI-Hintergrund ein vermindertes Verhältnis von Kortex- zu Medullafläche auf (vgl. Abb. 3.2 c). Davon ausgehend, dass dies die Konzentrationsfähigkeit verbessert, ist dennoch zu vermuten, dass diese Verbesserung durch die erhöhte Glomerulidichte aufgehoben wird, da diese Mäuse nicht in der Lage sind, eine im Vergleich zum Wildtyp leicht verminderte Wasseraufnahme auszugleichen, indem sie weniger Urin ausscheiden. Stattdessen kommt es hier zu einer nicht signifikant erhöhten Urinproduktion (vgl. Abb. 3.3 a) und so auch zu einer signifikant erhöhten Urinproduktion in Bezug zur verminderten Wasseraufnahme (vgl. Abb. 3.3 c).

Es ist also anzunehmen, dass bei $Fto^{-/-}$ -Mäusen mit BN-Hintergrund die erhöhte Glomerulidichte aufgrund der Verkleinerung der Kapillarnetze und der erhöhten Nephtrin-Expression (Samper Agrelo, 2012) kompensiert werden kann, so dass die Konzentrationsfähigkeit innerhalb der Nieren nicht beeinflusst wird. Auch das vergrößerte Verhältnis von Kortex zu Medulla bei männlichen Mäusen mit diesem genetischen Hintergrund hat keinen Einfluss auf deren Fähigkeit, den Urin zu konzentrieren. Weibliche $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit NMRI-Hintergrund zeigen eine insgesamt vergrößerte Filtrationsfläche (Zingsem, 2010). Überträgt man dieses Ergebnis auf deren männliche $Fto^{-/-}$ -Geschwister und beachtet dabei auch die erhöhte Glomerulidichte (vgl. Abb. 3.1 f), kann dies hier scheinbar nicht durch das verringerte Verhältnis von Kortex zu Medulla ausgeglichen werden. Es liegt also nahe, dass sowohl der genetische Hintergrund, aber auch das Geschlecht eine entscheidende Rolle bei der Konzentrierung des Urins spielen.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Auswirkungen des Fehlens von FTO bei den verschiedenen Mausstämmen ist, dass zur Generierung der F1-Generation mit BN-Hintergrund immer eine Maus mit NMRI-Hintergrund mit einer Maus des C57BL/6-Mausstamms gekreuzt wurde. Es handelte sich hier also niemals um verwandte Tiere, so dass ein völlig neuer Genpool entstehen konnte. Der NMRI-Mausstamm ist zwar ebenfalls ein Auszuchtstamm, bei welchem keine verwandten Tiere miteinander verpaart werden. Dennoch war der Genpool hier stets begrenzt, da nur eine beschränkte Anzahl an Mäusen zur Verfügung stand, so dass die Möglichkeit

der Verpaarung entfernt verwandter Tiere durchaus gegeben war, was die genetische Variabilität der Nachkommen sicherlich beeinträchtigte. Wichtig in diesem Zusammenhang ist überdies auch die Tatsache, dass Mäuse mit NMRI-Hintergrund generell zu schädlichen Nierenveränderungen, wie Glomerulonephritis oder einer Proteinurie neigen, während Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund demgegenüber widerstandsfähiger zu sein scheinen (Kren und Hostetter, 1999; Harlan Laboratories, Inc. 2008a).

Betrachtet man die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen männlichen und weiblichen Mäusen, so ist hier auch zu berücksichtigen, dass weibliche Mäuse aufgrund ihres Zyklus ständigen Hormonschwankungen ausgesetzt sind, was sowohl die Wasseraufnahme als auch die Urinabgabe beeinflusst (Prashad et al., 1987; Claybaugh et al., 2000; Chang et al., 2007).

4.2.2 Unterschiedlichkeiten im Urin deuten auf eine veränderte Nierenfunktion hin

Um weitere Schlüsse auf die Nierenfunktion ziehen zu können, wurden verschiedene Parameter im Urin untersucht. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass weibliche *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI-Hintergrund sowie männliche *Fto*^{-/-}-Mäuse mit BN-Hintergrund im Alter von sieben Wochen zunächst scheinbar gesünder sind als deren wildtypische Geschwister, da bei letzteren leicht erhöhte Nitritwerte im Harn gemessen wurden (vgl. Tab. 9.1). Dies deutet auf einen beginnenden Harnwegsinfekt hin, da es im Normalfall nicht detektierbar ist (Hicks et al., 1977; Green et al., 1982). Die Werte verschlechterten sich jedoch im Laufe der Zeit nicht, so dass ein Infekt ausgeschlossen werden konnte. Zu späteren Zeitpunkten (17 und 31 Wochen; vgl. Tab. 9.1) konnten hingegen leicht erhöhte Nitritwerte in einigen Urinproben von Mäusen beider Genotypen gemessen werden, was womöglich für mangelnde hygienische Zustände spricht.

4.2.2.1 Veränderungen in der Nierenfunktion in *Fto*^{-/-}-Mäusen beeinflussen den Glukose-Metabolismus

Des Weiteren wurde die Glukosekonzentration in den Urinproben gemessen. Die Werte liegen meist weit unterhalb der Standardwerte (vgl. Abb. 9.5 a und b), welche für NMRI-Mäuse bei etwa 175 bis 255 mg/dl und für C57BL/6-Mäuse bei ca. 125 bis 200 mg/dl liegen sollten (Harlan Laboratories, Inc. 2008a (NMRI) und 2008b (C57BL/6)); die Werte wurden mit Hilfe des Einheiten-Umrechners vom Gemeinschaftslabor Cottbus in mg/dl umgerechnet (http://www.labor-cottbus.de/einheiten-umrechner.einheiten_umrechner.0.html). Eine denkbare Erklärung hierfür

könnte die Benutzung von Teststreifen sein, welche besonders für zuverlässige Ergebnisse bei Spontanurin entwickelt wurden (vgl. Axonlab Informationsbroschüre für Arkray AUTION-Urinteststreifen), so dass der 24h-Urin möglicherweise zu schwach konzentriert ist. Einen an die Standardwerte angenäherten Wert zeigen ausschließlich sieben Wochen alte weibliche *Fto*^{-/-}-Mäuse mit BN-Hintergrund. Im Vergleich hierzu scheiden deren *Fto*-defiziente Schwestern allerdings fast signifikant weniger Glukose mit dem Urin aus, liegen aber damit wiederum im gleichen Bereich wie der Großteil der übrigen Tiere (vgl. Abb. 3.5 d). Eine signifikante Reduktion der Glukoseausscheidung weisen auch 31 Wochen alte männliche *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI-Hintergrund im Vergleich zu ihren wildtypischen männlichen Geschwistern auf. Hier liegen die gemessenen Glukosewerte im Urin der *Fto*^{-/-}-Mäuse jedoch deutlich niedriger als die der anderen Tiere (vgl. Abb. 3.5 d).

Generell sind die Urin-Glukosewerte der *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI-Hintergrund niedriger als die der wildtypischen Geschwister (vgl. Abb. 9.5 a). Eine Erklärung für die stark unterschiedlichen Glukosewerte könnte sein, dass einige Mäuse das Futter aus dem dafür vorgesehenen Behälter herausgeholt und auf den Gitterstangen des Käfigs gefressen haben, so dass Futterbrösel in den Urin gefallen sind und sich darin aufgelöst haben. Die insgesamt leicht niedrigeren Werte könnten mit der erhöhten Insulin-Sensivität dieser Tiere erklärt werden (Fischer et al., 2009), wodurch möglicherweise mehr Glukose aus dem Blut in die Organe transportiert wird, so dass weniger in den Nieren filtriert und somit auch weniger ausgeschieden wird. Dass eine *Fto*-Defizienz keinen signifikanten Einfluss auf den Glukose-Metabolismus hat (vgl. Fischer et al., 2009), konnte in Bezug auf die Nieren demnach nicht bestätigt werden.

4.2.2.2 Eine *Fto*-Defizienz scheint den Abbau von Kreatin zu beeinflussen

Kreatinin ist ein Abbauprodukt des Kreatins und wird ausschließlich über die Nieren ausgeschieden (DocCheck Medical Services GmbH, 2015). Hier konnte gezeigt werden, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse im Alter von sieben Wochen weniger Kreatinin mit dem Urin ausscheiden als ihre wildtypischen Geschwister (vgl. Abb. 3.5 a und b). Dies deutet zunächst darauf hin, dass die Filtrationseigenschaften der Nieren *Fto*-defizienter Tiere negativ beeinflusst sind. Demnach wird beim Fehlen von FTO weniger Kreatinin aus dem Blut herausgefiltert als bei wildtypischen Tieren. Dabei muss jedoch davon ausgegangen werden, dass bei *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen ähnliche Mengen Kreatinin im Blut vorhanden sind.

Um die Funktionalität der Niere genauer zu überprüfen, wird die Kreatinin-Clearance ermittelt, über welche eine Aussage zur Nierenfunktion in Form der glomerulären Filtrationsrate gemacht werden kann. Hierfür sollten die Kreatininwerte in Plasmaproben gemessen werden. Die angewandte Messmethode war jedoch nicht sensitiv genug, so dass eine Berechnung der Clearance, und somit eine präzise Aussage in Bezug auf eine einwandfreie Funktion der Nieren, nicht möglich war. Die wenigen Werte, welche für Mäuse mit BN-Hintergrund bestimmt werden konnten, lagen bei 0,3 mg/dl (eine männliche und zwei weibliche *Fto*^{-/-}-Mäuse) bzw. bei 0,4 mg/dl (eine männliche *Fto*^{-/-}- und eine weibliche *Fto*^{+/+}-Maus; vgl. Tab. 9.2 und Abb. 9.6). Diese Werte stimmen mit Standardwerten überein, welche sowohl für C57BL/6- als auch für NMRI-Mäuse in einem Bereich von 0,3 bis 0,4 mg/dl liegen sollten (Harlan Laboratories, Inc. 2008a (NMRI) bzw. Fernández et al., 2010 (C57BL/6); die Standardwerte wurden mit Hilfe des Einheiten-Umrechners vom Gemeinschaftslabor Cottbus in mg/dl umgerechnet (http://www.labor-cottbus.de/einheiten-umrechner.einheiten_umrechner.0.html)).

Im Falle einer Niereninsuffizienz wären demnach Werte weit oberhalb des Schwellenwertes von 0,3 mg/dl zu erwarten, welche auch die angegebenen Standardwerte bei Weitem überschreiten würden. Angenommen, es würde zu wenig Kreatinin aus dem Blut herausfiltriert und über den Urin abgegeben, müssten bei einer beginnenden Niereninsuffizienz im Alter von sieben Wochen, besonders aber im Alter von 17 bzw. 31 Wochen, die Kreatininwerte im Plasma weitaus höher sein. Dass beinahe alle Werte unterhalb des messbaren Schwellenwertes und die gemessenen Werte noch innerhalb des Normbereichs liegen, spricht demzufolge gegen eine mögliche Niereninsuffizienz. Es kann lediglich vermutet werden, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse im Allgemeinen weniger Kreatinin produzieren, also weniger Kreatin aus den Muskeln abbauen, als ihre wildtypischen Geschwister oder, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse weniger Muskelmasse besitzen als *Fto*^{+/+}-Mäuse und dadurch letztendlich auch weniger Kreatinin abgebaut werden kann. Beides würde im Endeffekt dazu führen, dass weniger Kreatinin über die Nieren ausgeschieden wird.

4.2.2.3 FTO hat möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf den Proteinstoffwechsel

Obleich bei Mäusen auch größere Proteine wie Albumin die Filtrationsbarriere des Glomerulus überwinden können, werden diese im Normalfall jedoch wenig später innerhalb des proximalen Tubulus wieder resorbiert. Kommt es zum Ausscheiden von Proteinen dieser Größe, spricht man von einer Proteinurie, welche eng mit der Entwicklung unterschiedlicher Krankheiten in Verbindung steht (Smetana, 1946; Wagener et al., 1994; Gekle, 2005).

Um das Problem der fehlenden Plasma-Kreatininwerte zu umgehen, gibt es eine weitere Möglichkeit, Schlüsse auf die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) zu ziehen und gleichzeitig eine Proteinurie auszuschließen. Hierbei wird der Protein/Kreatinin-Quotient errechnet. Ist dieser erhöht, ist meist die GFR vermindert und somit die Nierenfunktion beeinträchtigt. *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI- sowie mit BN-Hintergrund zeigen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im Protein/Kreatinin-Quotienten (vgl. Abb. 9.7 a und b). Allerdings zeigen männliche *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI-Hintergrund im Alter von 17 Wochen eine um das 1,7-Fach erhöhte Proteinausscheidung (vgl. Abb. 9.3 a) und aufgrunddessen einen dreifach erhöhten Protein/Kreatinin-Quotienten (vgl. Abb. 9.7 a).

Wird jedoch der psychosoziale Stress berücksichtigt, unter welchem die Mäuse beim Harnlassen standen, so könnte dies eine mögliche Erklärung sein, da dieser Stress zu einer erhöhten Adrenalin- und Noradrenalin-Produktion führt, was in einer Beeinträchtigung der Nierenfunktion resultiert (Vander, 1965; Wathen et al., 1965; Axelrod et al., 1970). Auch kann Stress eine funktionelle Proteinurie auslösen, ohne dass dabei eine Nierenerkrankung vorliegt (Waller et al., 1989). Dafür spricht auch, dass die Werte im Alter von 31 Wochen wieder vollkommen ausgeglichen sind und keinerlei Unterschiede zu denen der wildtypischen Geschwister zeigen. Betrachtet man hingegen die Protein- und Kreatinin-Werte dieser 17 Wochen alten männlichen *Fto*^{-/-}-Mäuse getrennt voneinander, so sind zwar keine signifikanten Unterschiede festzustellen, es ist aber zu erkennen, dass die *Fto*^{-/-}-Mäuse hier nur etwa die Hälfte an Kreatinin (vgl. Abb. 9.3 c), jedoch etwa anderthalb mal so viel Protein ausscheiden wie ihre wildtypischen Geschwister (vgl. Abb. 9.3 a).

Variationen der im Urin enthaltenen Proteine zwischen den Genotypen sind in drei verschiedenen Bereichen zu erkennen (vgl. Abb. 3.6 a). Bei den Urinproben wildtypischer Mäuse erscheinen deutliche Banden auf Höhe der 200 kDa-Bande des Proteinstandards sowie auf Höhe der Bande der BSA-Probe. Hier sind keine deutlichen Banden bei den Urin-Proben der *Fto*^{-/-}-Mäuse zu erkennen. Diese weisen jedoch eine Bande auf Höhe der 36 kDa-Bande des Proteinstandards auf, die bei den Proben der *Fto*^{+/+}-Tiere nicht zu erkennen ist. Dabei ist zu beachten, dass sich die Proteine unbehandelte Proben schneller durch ein SDS-Gel bewegen als die Proteine einer mit Probenpuffer versetzten Probe. Dies ist deutlich an der Bande der BSA-Probe (67 kDa) zu erkennen, welche, wie die Proben auch, vor dem Auftragen nicht behandelt wurde, und somit eine grobe Orientierung geben kann. Demnach kann aber der verwendete Proteinstandard, der bereits mit Probenpuffer versetzt war, nicht als Orientierung für die wirkliche Größe der sich im Urin befindlichen Proteine dienen.

Die mit Hilfe eines SDS-Gels ermittelte Gesamtproteinmenge zeigt keine Unterschiedlichkeiten (vgl. Abb. 3.6 a). Auch die Menge an ausgeschiedenem Protein bezogen auf die Urinmenge zeigt im Vergleich zwischen den Genotypen keine Unterschiede (vgl. Abb. 3.6 b).

Für Mäuse mit NMRI-Hintergrund ist bekannt, dass diese oft eine spontane Glomerulonephritis ausbilden, welche mit einer Proteinurie einhergeht (Harlan Laboratories, Inc. 2008a). Ob also eine stressbedingte funktionelle Proteinurie vorlag, welche im weiteren Verlauf kompensiert werden konnte, kann hier nicht mit Gewissheit bestätigt werden. Generell hat das Fehlen von FTO nach Durchsicht dieser Daten keinen Einfluss auf die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und scheint die Filtrationsfunktion der Nieren nicht maßgeblich zu beeinflussen.

Ein wichtiger Aspekt, welcher die Gesundheit eines Tieres bezüglich der Nieren betrifft, ist außerdem der pH-Wert des Urins. Dieser liegt bei allen untersuchten Proben im Normbereich (vgl. Blomqvist et al., 2004). Allerdings stellte sich heraus, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse mit BN-Hintergrund signifikant mehr Protonen mit dem Urin ausscheiden als ihre wildtypischen Geschwister (vgl. Abb. 3.5 c). Mäuse mit NMRI-Hintergrund zeigen zwar keine signifikanten Unterschiede, aber dennoch eine leichte Tendenz zu einem ebenfalls niedrigeren Urin-pH-Wert bei *Fto*^{-/-}-Tieren (vgl. Abb. 9.8 a).

Im Zusammenhang mit dem pH-Wert des Urins konnte gezeigt werden, dass dieser unter anderem abhängig von der Ernährung ist (Welch et al., 2008). So führt eine gesteigerte Proteinzufuhr zu einem niedrigeren Urin-pH-Wert (Lutz, 1984; Trilok und Draper 1989). FTO spielt eine Rolle innerhalb des Stoffwechsels und dessen Verlust verändert diesen maßgeblich (Fischer et al., 2009; McMurray et al., 2013). Auch wird FTO bereits ein Einfluss auf die Proteinbiosynthese und die Kontrolle der Nahrungsaufnahme zugeschrieben (Cheung et al., 2013; Gulati et al., 2013).

Bei Mäusen mit NMRI-Hintergrund scheint die vorhandene *Fto*-Defizienz einen nicht so ausgeprägten Einfluss auf den Stoffwechsel zu besitzen. Dies macht sich auch bei der Menge der ausgeschiedenen Proteine, bezogen auf die Menge Urin, bemerkbar. Mäuse mit NMRI-Hintergrund zeigen hier keine Unterschiedlichkeiten in den ausgeschiedenen Proteinmengen. Allerdings ist bei *Fto*^{-/-}-Mäusen mit BN-Hintergrund im Vergleich zu deren wildtypischen Geschwistern eine nicht signifikante Erhöhung zu erkennen (vgl. Abb. 3.6 b und c). Dies könnte an einem erhöhten Durchlass von Proteinen an der Schlitzmembran des Glomerulus liegen, was aufgrund der erhöhten Nephrexpression aber eher unwahrscheinlich ist (vgl. Samper Agrelo 2012; Tojo und Kinugasa, 2012), oder aber an einer gestörten Rückresorption innerhalb des Tubulussystems (Gekle, 2005; Comper et al., 2008; Tanner, 2008).

Da alle Mäuse zu jeder Zeit das gleiche Futter erhielten, liegt die Vermutung nahe, dass es durch die vorhandene *Fto*-Defizienz zunächst zu einer veränderten Verstoffwechslung der Proteine und so letztendlich zur Produktion eines saureren Harns kommt. Dies wäre beispielsweise durch die aufgrund der *Fto*-Defizienz fehlende N6-Methyladenosin-RNA-Demethylierung von mRNA zu erklären, wodurch auch regulatorische Mechanismen des alternativen RNA-Spleißens betroffen sind, was letztendlich zu einer veränderten Translation der mRNA in Zellen von *Fto*^{-/-}-Mäusen führt (Jia et al., 2011; Zhao et al., 2014). Beispielsweise könnte dann ein abgewandeltes Angebot an Enzymen, welche für die Verstoffwechslung von Proteinen wichtig sind, dazu führen, dass diese nicht bzw. auf eine völlig andere Art abgebaut werden. Fehlt FTO, können also womöglich nicht alle mit der Nahrung aufgenommenen Proteine abgebaut werden, so dass diese sich im Blut anreichern und schließlich mit dem Urin ausgeschieden werden. Setzt man den vorhandenen Proteinüberschuss mit einer verstärkten Proteinaufnahme durch die Nahrung gleich, wäre es denkbar, dass dies zu einer Senkung des pH-Wertes im Urin von *Fto*^{-/-}-Mäusen führt (vgl. Lutz, 1984; Trilok und Draper 1989).

Dass männliche *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI-Hintergrund nur einen leicht saureren Urin-pH-Wert aufweisen als ihr wildtypischen Geschwister (vgl. Abb. 9.8 a), könnte damit einhergehen, dass sie während des Aufenthaltes im metabolischen Käfig weniger gefressen (vgl. Abb. 3.4 a und c), und demnach auch insgesamt weniger Proteine zu sich genommen haben. Warum weibliche *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI-Hintergrund trotz leicht angedeuteter Hyperphagie (vgl. Abb. 3.4 b und d) ebenfalls nur eine sehr leichte Verringerung des Urin-pH-Wertes zeigen, könnte womöglich aufgrund von zyklusbedingten Hormonschwankungen erklärt werden, welche sowohl einen Einfluss auf die Flüssigkeitsmenge als auch die Menge der Ionen haben, welche mit dem Urin ausgeschieden werden (Prashad et al., 1987; Claybaugh et al., 2000; Chang et al., 2007). Gleichwohl kann in diesem Zusammenhang die bereits beschriebene Hyperphagie der *Fto*^{-/-}-Mäuse nicht bestätigt werden (vgl. Fischer, 2009). Die im Gegensatz dazu beobachtbare Hypophagie ist vermutlich auf die bestehende Stresssituation zurückzuführen, in der es an Versteckmöglichkeiten und Streu fehlt.

4.2.3 Erhöhte Adrenalin- und Corticosteronwerte im Plasma *Fto*-defizienter Mäuse bedingen eine erhöhte Herzfrequenz bei unverändertem Blutdruck

Eine weitere Aufgabe der Niere ist die Feinregulation des Blutdrucks, welche unter anderem mit der Nephronzahl im Zusammenhang steht (Gordon et al., 1967; de Champlain und van Amerin-

gen, 1972; Brenner et al., 1988; Hackenthal et al., 1990; Stevens und Lowe, 1992; Koeners et al., 2008). Der Blutdruck wiederum ist eng mit der Herzfrequenz verknüpft (Mancia et al., 1983). Ausgehend von einer erhöhten Glomerulidichte, läge hier demnach die Vermutung nahe, dass der Blutdruck, und dementsprechend auch die Herzfrequenz, bei Mäusen mit einer *Fto*-Defizienz verringert sind. Im Gegensatz dazu konnte jedoch gezeigt werden, dass der Puls bei *Fto*^{-/-}-Mäusen mit BN-Hintergrund zu beinahe allen gemessenen Zeitpunkten signifikant erhöht ist (vgl. Abb. 3.7 a). Eine Ausnahme bilden hier weibliche Mäuse im Alter von 30 Wochen, wobei die Tendenz zu einer erhöhten Herzfrequenz auch in diesem Fall noch zu erkennen ist. Über die Dauer der Messungen hinweg zeigen *Fto*^{-/-}-Mäuse mit BN-Hintergrund bei der Herzfrequenz zunächst den gleichen Ausgangswert wie ihre wildtypischen Geschwister. Letztere scheinen sich aber an die Situation zu gewöhnen, so dass ihr Puls im Laufe der Messtage sinkt (vgl. Abb. 3.7 b und c). Weibliche *Fto*^{-/-}-Mäuse mit NMRI-Hintergrund zeigen ähnliche Ergebnisse, wobei hier jedoch keine Signifikanz zu erkennen ist, während deren männliche Geschwister keinerlei Unterschiede in der Herzfrequenz aufweisen (vgl. Abb. 3.8 c). Dies könnte möglicherweise an der geringen Stichprobenzahl der männlichen Versuchstiere mit NMRI-Hintergrund liegen, welche eine Konsequenz deren erhöhter neonataler Sterberate war (vgl. Jäger, 2012).

Hinsichtlich des Zusammenspiels von Herzfrequenz und Blutdruck wäre nach diesem Befund also anders als zunächst vermutet davon auszugehen, dass auch der Blutdruck erhöhte Werte aufweist. Allerdings konnte bei weiblichen *Fto*^{-/-}-Mäusen mit BN-Hintergrund während der allerersten Übungswoche im Alter von etwa fünf Wochen ein signifikant niedrigerer Blutdruck gemessen werden (vgl. Abb. 3.7 d). Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht reproduziert werden. Sowohl Männchen als auch Weibchen mit BN- und NMRI-Hintergrund zeigen letztendlich keine Unterschiede bei den Blutdruckwerten (vgl. Abb. 3.8 a und b).

Betrachtet man weitere Faktoren, welche Puls und Blutdruck beeinflussen, so stellt man fest, dass von diesen mehrere bei *Fto*^{-/-}-Mäusen verändert sind. Ein wichtiger Faktor dabei ist beispielsweise der Stress, dem die Tiere während der Messungen ausgesetzt sind. Die Mäuse sind während des Messvorgangs in einer für sie unbekanntem und demnach stressauslösenden Situation. Sie sind fixiert und befinden sich auf einem, im Vergleich zur Einstreu, recht harten Untergrund. Trotz einer Gewöhnungsperiode von jeweils fünf Tagen vor den eigentlichen Messungen zeigen *Fto*^{-/-}-Mäuse währenddessen stets eine erhöhte Herzfrequenz. Dies könnte mit deren erhöhter Stressanfälligkeit sowie dem dauerhaft gesteigerten Stressniveau und den damit verbundenen erhöhten Corticosteronwerten im Plasma dieser Mäuse in Verbindung stehen (Spsychala, 2012). Ebenso trägt vermutlich die gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems der *Fto*^{-/-}-Mäuse in Form erhöhter Adrenalinwerte dazu bei (Fischer et al., 2009). Adrenalin bedingt jedoch

in erster Linie eine Erhöhung des Blutdrucks, welcher hier allerdings nicht verändert ist. Weitere Faktoren, die einen Einfluss auf den Blutdruck haben, sind die Leptinkonzentration sowie die Nephronzahl. Leptin bindet an Rezeptoren im Hypothalamus und dort speziell an solche des Nucleus arcuatus (ARC). Dies ist ein weiterer Ort, an dem der Blutdruck reguliert wird. Genau dort konnte bei wildtypischen Mäusen im Zusammenhang mit dem Sättigungszustand eine veränderte *Fto*-Expression nachgewiesen werden. Überdies weisen *Fto*^{-/-}-Mäuse einen niedrigeren Leptin-Spiegel sowie eine erhöhte Glomerulidichte auf. Beides führt unabhängig voneinander zu einem niedrigeren Blutdruck (Elliott, 1905; Vander, 1965; Brenner et al., 1988; Agata et al., 1997; Hirose et al., 1998; Suter et al., 1998; Keller et al., 2003; Guyenet, 2006; Hughson et al., 2006; Gerken et al., 2007; Rahmouni und Morgan, 2007; Koeners et al., 2008; Stratigopoulos et al., 2008; Tanner, 2008; Fischer et al., 2009). Da es sich also hier um eine Stresssituation für die Mäuse handelt, scheinen sich diese Faktoren, welche durch das Fehlen von FTO bedingt werden, gegenseitig dahingehend zu beeinflussen, dass der Blutdruck schließlich unverändert bleibt, während der Puls stärker auf die gesteigerte Stressanfälligkeit dieser Mäuse reagiert und daher erhöhte Werte aufweist.

5. Ausblick

Neben einer erhöhten Glomerulidichte bei *Fto*-defizienten Mäusen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Fehlen von FTO zu Veränderungen in der Nierenfunktion sowie zu einer erhöhten Herzfrequenz führt. Auch deuten die Ergebnisse auf eine Beeinflussung des SHH-Signalwegs und eine Störung der Verstoffwechslung von Proteinen hin. Um die vorliegenden Ergebnisse zu untermauern und die aufgestellten Vermutungen zu bestätigen, ist dennoch die Durchführung weiterer Analysen notwendig.

5.1 Vergleichbarkeit der Nieren von Mäusen beider genetischer Hintergründe

Um den genauen Zeitpunkt bestimmen zu können, an dem die Nieren der *Fto*^{-/-}-Mäuse mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen eine bereits signifikant erhöhte Glomerulidichte aufweisen, sollte die Glomerulizahl in Nieren von Mäusen mit NMRI-Hintergrund zusätzlich zum Zeitpunkt E17.5 bestimmt werden. Eventuell wäre es außerdem vonnöten, nächstliegende Stadien (E17.0 bzw. E18.0) zu begutachten. Bei Mäusen mit BN-Hintergrund sind zum Zeitpunkt E18.5 noch keine Unterschiede in der Glomerulidichte erkennbar. Hier ist die Betrachtung der Nieren von Mäusen neonataler Stadien angebracht. Ist der Zeitpunkt für beide Mauslinien klar, kann auch die Expression von *Fto* zu jeweils unterschiedlichen Stadien verglichen werden, welche aber den gleichen renalen Entwicklungsstand aufzeigen. Hier ist außerdem zusätzlich eine geschlechtsspezifische Genotypisierung empfehlenswert, um herauszufinden, ob Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen während der Embryonalentwicklung auftreten.

Die Stichprobenzahl für Anzahl bzw. Dichte der Glomeruli bei adulten Mäusen mit BN-Hintergrund umfasst jeweils eine männliche *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Maus. Dies diene lediglich der Überprüfung, ob eine erhöhte Glomerulidichte auch bei einem anderen als dem NMRI-Hintergrund zu finden ist. Um aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können, sollte diese Stichprobenzahl unbedingt erhöht werden. Auch wird davon ausgegangen, dass weibliche Mäuse mit BN-Hintergrund ähnliche Unterschiede in der Dichte der Glomeruli aufweisen. Dies gilt es dringend zu beweisen.

5.2 Klärung der Rolle von FTO innerhalb des Proteinstoffwechsels und als Regulator des SHH-Signals

Dass FTO an der Proteinbiosynthese beteiligt ist, konnte in vorangegangenen Studien bereits angedeutet werden (Cheung, et al., 2013; Gulati, et al., 2013). Ob FTO jedoch tatsächlich eine Rolle innerhalb des Proteinstoffwechsels innehat, könnte beispielsweise im Versuch mit Hilfe markierter Aminosäuren überprüft werden. Hier sollte sich herausstellen lassen, ob der Abbau von mit der Nahrung zugeführten Proteinen ohne FTO auf die gleiche Weise abläuft wie unter dem Einfluss der N6-Methyladenosin-RNA-Demethylierungs-Funktion eines vorhandenen FTO-Proteins. In Bezug auf den Einfluss von FTO auf den SHH-Signalweg ist die Niere als Organ besonders dahingehend interessant, dass die Expression von SHH auf die Medulla und den Ureter begrenzt ist (Cain et al., 2009). Das veränderte Verhältnis von Kortex zu Medulla bei männlichen *Fto*^{-/-}-Mäusen deutet demnach auf eine Veränderung des SHH-Signals hin. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine gesteigerte GLI3^R-Expression, wie sie in Nieren von *Fto*^{-/-}-Mäusen mit BN-Hintergrund des Stadiums E14.5 bereits gezeigt werden konnte (Samper Agrelo, 2012). Daher wäre es von großem Interesse herauszufinden, ob das Verhältnis von Kortex zu Medulla bereits während der Embryonalentwicklung Unterschiede aufweist. Um hier außerdem geschlechtsspezifische Abweichungen herausheben zu können, sollte diese Analyse auf männliche und weibliche Embryonen und Mäuse neonataler Stadien sowie auf adulte weibliche Tiere angewendet werden. Im Zuge dieser Untersuchungen sollte auch überprüft werden, ob sich die Expression von SHH bei *Fto*^{-/-}-Mäusen weiterhin auf die Medulla beschränkt oder ob es hier zu einer ektopischen Expression kommt, wie es bereits innerhalb anderer Organe vermutet wird (vgl. Jäger, 2012). Zu prüfen, ob die Ausdehnung der SHH-Expression durch das Fehlen von FTO beeinflusst wird, könnte auch Anhaltspunkte geben, ob FTO in der Niere als positiver oder negativer Regulator des SHH-Signals auftritt.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene (*Gdnf*, *Ret*, *Wnt11*, *Gli1*, *Ptch1* und *Fgf8*) stehen im Zusammenhang mit dem SHH-Signalweg. Hier wäre es sinnvoll, die auf mRNA-Ebene gefundenen Expressionsunterschiede auf Proteinebene zu verifizieren. Auch sollten mehr embryonale (NMRI) bzw. neonatale (BN) Stadien untersucht werden, um hier ebenfalls verschiedene Entwicklungsstadien der unterschiedlichen genetischen Hintergründe miteinander vergleichen zu können. Es sollte auch die Frage geklärt werden, ob die Expressionsunterschiede bei *Fto*^{-/-}-Mäusen mit NMRI-Hintergrund die Folge einer veränderten GLI3^R-Expression sind.

Die Analysen weiterer Gene und Proteine, welche an der Nephrogenese, speziell am Auswachsen und Verzweigen der Ureterknospe beteiligt sind und deren Expression von SHH beeinflusst wird,

könnte bei Bedarf ebenfalls ausgeweitet werden. Als Beispiel seien hier *Fgf7* bzw. FGF7 und *Fgf10* bzw. FGF10 genannt (vgl. Gill und Rosenblum, 2006).

5.3 Weitere Analysen der Niere und ihrer Funktionen

Um tiefere Aussagen darüber machen zu können, ob und in welcher Form die Funktion der Niere bei *Fto*-defizienten Mäusen beeinträchtigt ist, wäre es ratsam, die Stichprobenzahlen weiter zu erhöhen. Beispielsweise wären im Bereich der Herzfrequenz und des Blutdrucks so womöglich eindeutigere Ergebnisse zu erzielen. Um den Mäusen einigen Stress zu ersparen und aussagekräftigere Werte zu erhalten, wäre außerdem ein invasives Messen des Blutdrucks eine sinnvolle Alternative zur angewendeten nicht-invasiven Methode.

Das Trinkverhalten der Mäuse genau zu bestimmen, ist eine besondere Herausforderung. Erste im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere erhobene Daten zum Trinkverhalten von *Fto*^{-/-}-Mäusen zeigten keine Unterschiede zwischen *Fto*-defizienten Tieren und deren wildtypischen Geschwistern (unveröffentlichte Daten von J. Fischer). Da die Mäuse oft spielerisch gegen das Ventil der Flasche stupsen, so dass Wasser herauskommt, welches jedoch nicht aufgenommen wird, ist die tatsächlich getrunkene Menge nicht immer genau messbar. Dies ist in der Regel leicht am nassen Fell der Maus zu erkennen. Ob hier die Benutzung metabolischer Käfige mit anderen Flaschen-Aufhängungen weiterhelfen könnte, wäre zu prüfen. Das aus der Flasche austretende Wasser kann zum Teil auch in den Urin fließen und diesen so verdünnen. Dies zu verhindern, wäre daher zudem wichtig, um später die exakte Urinmenge sowie die präzise Kreatinin-Clearance berechnen zu können.

Des Weiteren ist es hier dringend erforderlich, eine Methode zu etablieren, welche sensitiv genug ist, um die geringen Mengen Kreatinin im Plasma der Mäuse zu detektieren, und die mit dem zur Verfügung stehenden geringen Probenvolumen auskommt. Hier könnte bereits eine andere Art der Blutentnahme zu messbaren Ergebnissen führen (vgl. Schnell et al., 2002; Fernández et al., 2010).

Außerdem ist die Messung unterschiedlicher Salze wie Natrium, Kalium und verschiedener Phosphate im Urin ratsam, um weitere Nierenerkrankungen, welche die Filtrationsfunktion der Niere betreffen (z. B. eine Kristallurie), ausschließen zu können. Hierzu gehört auch eine nähere Analyse des gesamten Nephrons als Einheit, also des Glomerulus mitsamt seines Tubulussystems, da die veränderte Ausscheidung von Metaboliten über den Urin sowohl von einer Störung der Filtration innerhalb des Glomerulus als auch durch eine Störung in der Reabsorption inner-

halb des Tubulussystems verursacht werden kann. Dies betrifft in besonderem Maße die Proteinkonzentration im Endharn, welche im Vergleich zum Primärharn normalerweise wesentlich weniger Albumin aufweist (Gekle, 2005; Tojo und Kinugasa, 2012). Des Weiteren gehören hierzu die Expressionsanalysen von Transmembranproteinen wie GLUT2 (engl.: *glucose transporter 2*) sowie der SGLT-Proteine (engl.: *sodium-glucose linked transporter*) SGLT1 und 2, welche Glukose aus dem Primärharn in das Zytoplasma der Tubuluszellen transportieren. Ferner führt eine Verlustmutation des *Slc5a2* (engl.: *solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter) member 2*) Gens, welches für das SGLT2-Protein codiert, zu einer erhöhten Wasser- und Nahrungsaufnahme sowie Polyurie (Heidiger und Rhoads, 1994; Wright, 2001; Hummel et al., 2010; Valion et al., 2011).

Da bereits gezeigt werden konnte, dass in den Nieren adulter *Fto*^{-/-}-Mäuse mit BN-Hintergrund mehr Nephrin innerhalb der verkleinerten Kapillarnetze der Glomeruli exprimiert wird (Samper Agrelo, 2012), könnten überdies vermeintliche Unterschiede innerhalb der Schlitzmembran mit Hilfe eines Elektronenmikroskops detektiert werden.

Schließlich gilt es die Frage zu beantworten, ob eine *Fto*-Defizienz zu einem gestörten Proteinstoffwechsel führt oder ob eine veränderte Nephrogenese zu derart umorganisierten Strukturen führt, dass es letztendlich zu Beeinflussungen der Nierenfunktion, beispielsweise durch strukturelle Veränderungen des Filtrations- bzw. Reabsorptionsmechanismus kommt. Eine genauere Untersuchung von Größe und Menge der im Urin befindlichen Proteine könnte an dieser Stelle hilfreich sein.

6. Zusammenfassung

Das FTO („fat mass and obesity associated“)-Protein gehört zur nicht-Häm-Eisen-II- und α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenase-Superfamilie und besitzt eine Funktion als N6-Methyladenosin-RNA-Demethylase. Es ist an der Proteinbiosynthese sowie an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligt. Beim Menschen besteht ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen (SNPs = engl.: *single nucleotide polymorphisms*) des ersten Introns des *Fto*-Gens und der Neigung, eine Adipositas sowie Herz-Kreislaufkrankungen wie Bluthochdruck zu entwickeln. Des Weiteren korreliert das Auftreten bestimmter Risikoallele mit chronischem Nierenversagen. Das Fehlen von FTO führt bei der Maus in verschiedenen Organen zu verkürzten Zilien, wodurch die Übertragung des SHH-Signals möglicherweise beeinflusst ist.

Die in dieser Arbeit durchgeführten histologischen Analysen zeigen eine erhöhte Glomerulidichte in den Nieren *Fto*-defizienter Mäuse, welche sich in der späten Embryonalentwicklung (NMRI) bzw. postnatal (BN) manifestiert. Expressionsanalysen unterschiedlicher Gene (*Gdnf*, *Ret*, *Wnt11*, *Gli1*, *Ptch1* und *Fgf8*), die dem SHH-Signal nachgeschaltet sind, deuten außerdem darauf hin, dass dies das Resultat von Modifikationen innerhalb des SHH-Signalwegs ist.

Frühere Untersuchungen an Mäusen konnten zeigen, dass eine *Fto*-Defizienz zu einer gesteigerten Aktivierung des sympathischen Nervensystems sowie vermehrter Nervosität und Stressanfälligkeit führt. Dies geht einher mit erhöhten Adrenalin- und Noradrenalin- sowie Corticosteron-Konzentrationen im Plasma dieser Mäuse. In diesem Zusammenhang konnte hier gezeigt werden, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse zu einer erhöhten Herzfrequenz neigen. Im Gegensatz dazu scheint die erhöhte Glomerulidichte der Aktivierung des sympathischen Nervensystems jedoch derart entgegenzuwirken, dass der Blutdruck der Mäuse keineswegs erhöht ist, sondern eher die Tendenz zu einer Verringerung zeigt.

Im Hinblick auf Analysen, welche auf eine Veränderung der Expression des Filtrationsproteins Nephritin innerhalb der Glomeruli hinweisen, konnte in dieser Arbeit beschrieben werden, dass sich die vorliegenden strukturellen Veränderungen durchaus auch auf die Zusammensetzung des Urins auswirken. Beispielsweise liegen die pH-Werte des Harns von *Fto*-defizienten Mäusen in einem saureren Bereich als die Werte ihrer wildtypischen Geschwister. Dies lässt auf Veränderungen und damit auf eine Rolle von FTO innerhalb des Proteinstoffwechsels schließen. Auch deuten eine verringerte Kreatininausscheidung sowie spontan auftretende Veränderungen der Glukosewerte im Urin auf Veränderungen der Nierenfunktion aufgrund des Fehlens von FTO hin.

Abstract

The FTO (“fat mass and obesity associated“) protein is a member of the non-heme iron (II) and 2-oxoglutarate-dependent oxygenase superfamily and functions as N6-methyladenosine RNA demethylase. FTO is involved in protein synthesis and controlling of food intake. In humans single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the first intron of the *FTO* gene correlate with obesity and cardiovascular diseases like hypertension. Additionally specific risk alleles are associated with renal failure. In certain mouse organs the loss of FTO leads to a decrease in ciliary length which affects SHH signaling pathway.

This study exhibit an increased glomerular density in kidneys of *Fto*^{-/-} mice which appear during late embryogenesis (NMRI) and early postnatal period (BN), respectively. Expression analysis of distinct genes (*Gdnf*, *Ret*, *Wnt11*, *Gli1*, *Ptch1* and *Fgf8*) downstream of SHH signal indicate modifications of SHH signaling pathway.

Former investigations of *Fto*^{-/-} mice show increased sympathetic activation together with nervousness and stress sensitivity associated with elevated serum adrenaline and noradrenaline as well as plasma corticosterone levels. In that regard this study reveals effects on cardiovascular system characterized by increased heart rate. In contrast to this raised glomerular number is believed to antagonize sympathetic activation so blood pressure is not elevated but seems to be lowered.

Further analyses depict alterations in the expression of the glomerular filtration protein nephrin. This coincides with here shown variances in urine composition. For instance, *Fto*-negative mice show more acidic pH-values than control mice. This implies alterations and therefore a role of FTO in protein metabolism. Moreover decreased urine creatinine and spontaneous variations in urine glucose advert to modifications in kidney function based on the loss of FTO.

7. Abkürzungsverzeichnis

7.1 Abkürzungen

a	Länge
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARC	Nucleus arcuatus
b	Breite
BMI	Body Mass Index
BMP	bone morphogenetic protein (Protein)
BN	C57BL/6/NMRI-Mischhintergrund
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Tiefe
C	Kreatinin-Clearance
C57BL/6	C57 black 6
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary DNA
Ct	cycle of threshold
dd	bidestilliert

DEPC	diethylpyrocarbonate
<i>Dhh</i>	<i>desert hedgehog</i> (Maus-Gen)
DHH	desert hedgehog (Protein)
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate
DSH	dishevelled (Protein)
dT	deoxythymidine
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
engl.	englisch
et al.	et alteri
ERK	extracellular signal-regulated kinase
e.V.	eingetragener Verein
F	forward
F1-Generation	erste Filialgeneration
FAM	fluorescein amidite
FET	Fachgesellschaft für Ernährungstherapie und Prävention
<i>Fgf</i>	<i>fibroblast growth factor</i> (Maus-Gen)
FGF	fibroblast growth factor (Protein)
FGFR	FGF-Rezeptor (Protein)

for	forward
FRET	fluorescence resonance energy transfer
<i>Ft</i>	<i>fused toes</i> (Maus-Gen)
<i>Fto</i>	<i>fat mass and obesity associated</i> (Maus-Gen)
<i>FTO</i>	<i>fat mass and obesity associated</i> (Mensch-Gen)
FTO	fat mass and obesity associated (Protein)
Fz	frizzled (Protein)
<i>GapDh</i>	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (Maus-Gen)
<i>Gdnf</i>	<i>glial cell derived neurotrophic factor</i> (Maus-Gen)
GDNF	glial cell derived neurotrophic factor (Protein)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GFR1 α	GDNF family receptor alpha 1 (Protein)
GLI	glioma-associated oncogene homolog (Zinkfingerprotein)
<i>Gli</i>	<i>glioma-associated oncogene homolog</i> (Maus-Gen)
GLI2	GLI-Krüppel family member 2
GLI3	GLI-Krüppel family member 3
GLI3 ^R	Gli3-Repressor (Protein)
GLUT2	glucose transporter 2
Gsk3 β	glycogen synthase kinase 3 β (Protein)
GWAS	genome-wide association studies
HCl	Salzsäure

HE	Hämalaun-Eosin
Hh	hedgehog (Protein)
H ₂ O	Wasser
<i>Hom-C</i>	<i>homeotic complex</i>
<i>Hox</i>	<i>Homöobox</i>
<i>Hprt</i>	<i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> (Maus-Gen)
ICM	inner cell mass
IFT	intraflagellarer Transport
<i>Ihh</i>	<i>indian hedgehog</i> (Maus-Gen)
IHH	indian hedgehog (Protein)
Inc./Ink	Incorporated
<i>int</i>	<i>integrase</i> (Drosophila-Gen)
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KG	Körpergewicht
<i>Kif3a</i>	<i>kinesin family member 3a</i> (Maus-Gen)
KIF3a	kinesin family member 3a (Protein)
KO	knock out
K _P	Kreatininkonzentration im Plasma
K _U	Kreatininkonzentration im Urin
LDLR	low density lipoprotein related receptor (Protein)
LEF	lymphoid enhancer binding factor (Protein)

M	Marker, Proteinstandard
MAPK	mitogen-aktiviertes Protein kinase (Protein)
MEF	mouse embryonic fibroblast
mRNA	messenger RNA
mTORC	mammalian target of rapamycin complex (Protein)
n	Anzahl
n.b.	nicht bestimmbar
n.m.	nicht messbar
Na ⁺	Natriumion
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Neo	Neomycin
NLS	nuclear localisation signal
NMRI	Naval Medical Research Institute
p	p-Wert, Angabe für Signifikanzen
PBS	phosphate buffered saline
PCP	planar cell polarity
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
<i>Ptch1</i>	<i>patched1</i> (Maus-Gen)

PTCH1	patched1 (Protein)
R	reverse
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Protein)
<i>Ret</i>	<i>rearranged during transfection</i> (Maus-Gen)
RET	rearranged during transfection (Protein)
rev	reverse
Rho	Ras homologue (Protein)
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute, „Umdrehungen pro Minute“
RTK	rezeptor tyrosine kinase (Protein)
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of the mean
SGLT	sodium-glucose linked transporter (Protein)
<i>Shh</i>	<i>sonic hedgehog</i> (Maus-Gen)
SHH	sonic hedgehog (Protein)
<i>Slc5a2</i>	<i>solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 2</i> (Maus-Gen)
SMAD	Portmanteauwort: small body size (SMA) & mothers against decapentaplegic (MAD) (Protein)

SMO	smoothened (Protein)
SNP	single nucleotide polymorphism
ss	single stranded
T	Sammelzeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCF	transcription factor
TE	Tris-EDTA
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	transforming growth factor (Protein)
T _m	temperature of melting
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V _N	Nierenvolumen
V _U	Urinvolumen
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WAT	white adipose tissue
WHR	waist-hip ratio
<i>Wnt</i>	Portmanteauwort: <i>wingless (wg)</i> & <i>integrase (int)</i> (Maus-Gen)
WNT	Portmanteauwort: <i>wingless (wg)</i> & <i>integrase (int)</i> (Protein)

z. B. zum Beispiel

π Kreiszahl Pi

7.2 Einheiten

Bp Basenpaare

$^{\circ}\text{C}$ Grad Celsius

dl Deziliter

g Erdbeschleunigung

g Gramm

h Stunde

Kb Kilobasen

kDa Kilodalton

M Molar

mg Milligramm

min Minute

μl Mikroliter

ml Milliliter

μm Mikrometer

mm Millimeter

mM Millimolar

mm^2 Quadratmillimeter

mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilber
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	picomol
s	Sekunde
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

8. Literatur

Agata, J., Masuda, A., Takada, M., Higashiura, K., Murakami, H., Miyazaki, Y., & Shimamoto, K. (1997). High plasma immunoreactive leptin level in essential hypertension. *Am J Hypertens*, *10*, 1171-4.

Anderson, G. J., & Darshan, D. (2008). Small-molecule dissection of BMP signaling. *Nat Chem Biol*, *4*, 15-6.

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.

Angers, S., & Moon, R. T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*, 468-77.

Axelrod, J., Mueller, R. A., Henry, J. P., & Stephens, P. M. (1970). Changes in enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of noradrenaline and adrenaline after psychosocial stimulation. *Nature*, *225*, 1059-60.

Axelrod, J., & Reisine, T. D. (1984). Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, *224*, 452-9.

Axon Lab AG. Arkray AUTION-Urinteststreifen. Die Urinteststreifen von Arkray – für das zuverlässige und kostengünstige Screening. Hochsensitiv und präzise!

Bai, C. B., Auerbach, W., Lee, J. S., Stephen, D., & Joyner, A. L. (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development*, *129*, 4753-61.

Berulava, T., Ziehe, M., Klein-Hitpass, L., Mladenov, E., Thomale, J., Rüther, U., & Horsthemke, B. (2013). FTO levels affect RNA modification and the transcriptome. *Eur J Hum Genet*, *21*, 317-23.

Beuchat, C. A. (1990). Body size, medullary thickness, and urine concentrating ability in mammals. *Am J Physiol*, *258*, R298-308.

Bitgood, M. J., & McMahon, A. P. (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*, *172*, 126-38.

Bitgood, M. J., Shen, L., & McMahon, A. P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*, *6*, 298-304.

- Blomqvist, S. R., Vidarsson, H., Fitzgerald, S., Johansson, B. R., Ollerstam, A., Brown, R., Persson, A. E. G., Bergstrom, G., & Enerback, S.** (2004). Distal renal tubular acidosis in mice that lack the forkhead transcription factor Foxo1. *Journal of Clinical Investigation*, *113*, 1560-70.
- Boissel, S., Reish, O., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Sedgwick, B., Yeo, G. S., Meyre, D., Golzio, C., Molinari, F., Kadhom, N., Etchevers, H. C., Saudek, V., Farooqi, I. S., Froguel, P., Lindahl, T., O'Rahilly, S., Munnich, A., & Colleaux, L.** (2009). Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am J Hum Genet*, *85*, 106-11.
- Bowman, W.** (1842). On the Structure and Use of the Malpighian Bodies of the Kidney, with Observations on the Circulation through That Gland. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, *132*, 57-80.
- Brenner, B. M., Garcia, D. L., & Anderson, S.** (1988). Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens*, *1*, 335-47.
- Cacalano, G., Farinas, I., Wang, L. C., Hagler, K., Forgie, A., Moore, M., Armanini, M., Phillips, H., Ryan, A. M., Reichardt, L. F., Hynes, M., Davies, A., & Rosenthal, A.** (1998). GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron*, *21*, 53-62.
- Cain, J. E., Islam, E., Haxho, F., Chen, L., Bridgewater, D., Nieuwenhuis, E., Hui, C. C., & Rosenblum, N. D.** (2009). GLI3 repressor controls nephron number via regulation of Wnt11 and Ret in ureteric tip cells. *PLoS One*, *4*, e7313.
- Capecchi, M. R.** (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*, *244*, 1288-92.
- Chang, C. T., Sun, C. Y., Pong, C. Y., Chen, Y. C., Lin, G. P., Chang, T. C., & Wu, M. S.** (2007). Interaction of estrogen and progesterone in the regulation of sodium channels in collecting tubular cells. *Chang Gung Med J*, *30*, 305-12.
- Cheung, M. K., Gulati, P., O'Rahilly, S., & Yeo, G. S.** (2013). FTO expression is regulated by availability of essential amino acids. *Int J Obes (Lond)*, *37*, 744-7.
- Chi, L., Galtseva, A., Chen, L., Mo, R., Hui, C. C., & Rosenblum, N. D.** (2013). Kif3a controls murine nephron number via GLI3 repressor, cell survival, and gene expression in a lineage-specific manner. *PLoS One*, *8*, e65448.
- Church, C., Moir, L., McMurray, F., Girard, C., Banks, G. T., Teboul, L., Wells, S., Brüning, 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*, 1086-92.
- Claybaugh, J. R., Sato, A. K., Crosswhite, L. K., & Hassell, L. H.** (2000). Effects of time of day, gender, and menstrual cycle phase on the human response to a water load. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *279*, R966-73.
- Coleman, S. J., Bruce, C., Chioni, A. M., Kocher, H. M., & Grose, R. P.** (2014). The ins and outs of fibroblast growth factor receptor signalling. *Clin Sci (Lond)*, *127*, 217-31.

- Comper, W. D., Hilliard, L. M., Nikolic-Paterson, D. J., & Russo, L. M.** (2008). Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *Am J Physiol Renal Physiol*, *295*, F1589-600.
- 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*, 75-9.
- Correia, M. L. G., Morgan, D. A., Sivitz, W. I., Mark, A. L., & Haynes, W. G.** (2001). Leptin acts in the central nervous system to produce dose-dependent changes in arterial pressure. *Hypertension*, *37*, 936-42.
- 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*, 927-30.
- Croce, J. C., & McClay, D. R.** (2008). Evolution of the Wnt pathways. *Methods Mol Biol*, *469*, 3-18.
- Cummings, B.** (2004). The Urinary System. In F.H. Martini & J. L. Nath (Ed.), *Fundamentals of Anatomy & Physiology* (8th Edition, Chapter 26). PowerPoint® Lecture Slides prepared by Jason LaPres Lone Star College – North Harris. Figure 26.5a (Slide 30). Copyright © 2004 Pearson Education, Inc.
- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M., & Ishii, S.** (1999). Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem*, *274*, 8143-52.
- Davies, J. A., & Davey, M. G.** (1999). Collecting duct morphogenesis. *Pediatr Nephrol*, *13*, 535-41.
- De, A.** (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* *43*, 745-56.
- De Champlain, J., & Van Ameringen, M. R.** (1972). Regulation of blood pressure by sympathetic nerve fibers and adrenal medulla in normotensive and hypertensive rats. *Circ Res*, *31*, 617-28.
- Denef, N., Neubuser, D., Perez, L., & Cohen, S. M.** (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell*, *102*, 521-31.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., & Balmain, A.** (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*, *29*, 117-29.
- Dickinson, H., Walker, D. W., Cullen- McEwen, L., Wintour, E. M., & Moritz, K.** (2005). The spiny mouse (*Acomys cahirinus*) completes nephrogenesis before birth. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *289*, F273-9.
- Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Korner, A., Jacobson, P., Carlsson, L. M., Kiess, W., Vatin, V., Lecoecur, C., Delplanque, J., Vaillant, E., Pattou, F., Ruiz, J., Weill, J.,**

Levy-Marchal, C., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., Le Stunff, C., Bougneres, P., Kovacs, P., Marre, M., Balkau, B., Cauchi, S., Chevre, J. C., & Froguel, P. (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*, *39*, 724-6.

DocCheck Medical Services GmbH. *Kreatin*. Copyright © 2015.
<http://flexikon.doccheck.com/de/Kreatin>

Dressler, G. R. (2006). The cellular basis of kidney development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *22*, 509-29.

Duboule, D., Boncinelli, E., DeRobertis, E., Featherstone, M., Lonai, P., Oliver, G., & Ruddle, F. H. (1990). An update of mouse and human HOX gene nomenclature. *Genomics*, *7*, 458-9.

Durbec, P., Marcos-Gutierrez, C. V., Kilkenny, C., Grigoriou, M., Wartiovaara, K., Suvanto, P., Smith, D., Ponder, B., Costantini, F., Saarma, M., & et al. (1996). GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature*, *381*, 789-93.

Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, *75*, 1417-30.

Eigenbrot, C., & Gerber, N. (1997). X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 Å resolution and implications for receptor binding. *Nat Struct Biol*, *4*, 435-8.

Elliott, T. R. (1905). The action of adrenalin. *J Physiol*, *32*, 401-67.

Fan, C. M., & Tessier-Lavigne, M. (1994). Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell*, *79*, 1175-86.

Fernandez, I., Pena, A., Del Teso, N., Perez, V., & Rodriguez-Cuesta, J. (2010). Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, *49*, 202-6.

FET (Fachgesellschaft für Ernährungstherapie und Prävention) e.v. (2011). Chronisches Nierenversagen. *Fachkompendium Ernährungsmedizin, Band 14: Fachkompendium Chronisches Nierenversagen*, 4-5. Wissenschaftlicher Aufsatz.

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*, 894-8.

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., Ring, S. M., Ben-Shlomo, Y., Jarvelin, M. R., Sovio, U., Bennett, A. J., Melzer, D., Ferrucci, L., Loos, R. J., Barroso, I., Wareham, N. J., Karpe, F., Owen, K. R., Cardon, L. R., Walker, M., Hitman, G. A., Palmer, C. N., Doney, A. S., Morris, A. D., Smith, G. D., Hattersley, A. T., & McCarthy, M. I. (2007). A common variant in the FTO gene

is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 316, 889-94.

Fredriksson, R., Hagglund, M., Olszewski, P. K., Stephansson, O., Jacobsson, J. A., Olszewska, A. M., Levine, A. S., Lindblom, J., & Schioth, H. B. (2008). The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology*, 149, 2062-71.

Gekle, M. (2005). Renal tubule albumin transport. *Annu Rev Physiol*, 67, 573-94.

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., Lindahl, T., Ponting, C. P., Ashcroft, F. M., O'Rahilly, S., & Schofield, C. J. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science*, 318, 1469-72.

Gerlai, R. (2001). Gene targeting: technical confounds and potential solutions in behavioral brain research. *Behav Brain Res*, 125, 13-21.

Gilbert, S. F. (2006). *Developmental Biology* (Vol. 8th edition). Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc.

Gill, P. S., & Rosenblum, N. D. (2006). Control of murine kidney development by sonic hedgehog and its GLI effectors. *Cell Cycle*, 5, 1426-30.

Goetz, S. C., & Anderson, K. V. (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet*, 11, 331-44.

Gordon, R. D., Kuchel, O., Liddle, G. W., & Island, D. P. (1967). Role of the sympathetic nervous system in regulating renin and aldosterone production in man. *J Clin Invest*, 46, 599-605.

Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 126, 131-8.

Griesshammer, U., Cebrian, C., Ilagan, R., Meyers, E., Herzlinger, D., & Martin, G. R. (2005). FGF8 is required for cell survival at distinct stages of nephrogenesis and for regulation of gene expression in nascent nephrons. *Development*, 132, 3847-57.

Grindley, J. C., Bellusci, S., Perkins, D., & Hogan, B. L. (1997). Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. *Dev Biol*, 188, 337-48.

Grobstein, C. (1955). Inductive Interaction in the Development of the Mouse Metanephros. *Journal of Experimental Zoology*, 130, 319-39.

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, 2557-62.

- Guron, G., & Friberg, P.** (2000). An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *Journal of Hypertension*, *18*, 123-37.
- Guyenet, P. G.** (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*, *7*, 335-46.
- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D., & Taugner, R.** (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*, *70*, 1067-116.
- Haeckel, E.** (1866). *Generelle Morphologie der Organismen. Allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenztheorie* (Vol. bd. 1). Berlin: G. Reimer.
- Harlan Laboratories, I.** (2008a). NMRI Naval Medical Research Institute. Indianapolis, USA.
- Harlan Laboratories, I.** (2008b). C57BL/6. Indianapolis, USA.
- Hauch, E.** (1903). Über die Anatomie und Entwicklung der Nieren. *Anatomische Hefte*, *69*.
- Haycraft, C. J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E. J., & Yoder, B. K.** (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet*, *1*, e53.
- Hediger, M. A., & Rhoads, D. B.** (1994). Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol Rev*, *74*, 993-1026.
- Heldin, C. H.** (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, *80*, 213-23.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., & ten Dijke, P.** (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, *390*, 465-71.
- Hellmich, H. L., Kos, L., Cho, E. S., Mahon, K. A., & Zimmer, A.** (1996). Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech Dev*, *54*, 95-105.
- Hicks, R. M., Walters, C. L., Elsebai, I., Aasser, A. B., Merzabani, M. E., & Gough, T. A.** (1977). Demonstration of nitrosamines in human urine: preliminary observations on a possible etiology for bladder cancer in association with chronic urinary tract infections. *Proc R Soc Med*, *70*, 413-7.
- Hirose, H., Saito, I., Tsujioka, M., Mori, M., Kawabe, H., & Saruta, T.** (1998). The obese gene product, leptin: possible role in obesity-related hypertension in adolescents. *Journal of Hypertension*, *16*, 2007-12.
- Hogan, B. L.** (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*, *6*, 432-8.

- Holzman, L. B., St John, P. L., Kovari, I. A., Verma, R., Holthofer, H., & Abrahamson, D. R.** (1999). Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int*, *56*, 1481-91.
- Hooper, J. E., & Scott, M. P.** (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*, 306-17.
- 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., Yoshimatsu, H., Nakao, K., Sakata, T., Matsuzawa, Y., Tanaka, K., Kamatani, N., & Nakamura, Y.** (2008). Variations in the FTO gene are associated with severe obesity in the Japanese. *J Hum Genet*, *53*, 546-53.
- Hu, M. C., Mo, R., Bhella, S., Wilson, C. W., Chuang, P. T., Hui, C. C., & Rosenblum, N. D.** (2006). GLI3-dependent transcriptional repression of Gli1, Gli2 and kidney patterning genes disrupts renal morphogenesis. *Development*, *133*, 569-78.
- Huangfu, D., & Anderson, K. V.** (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*, 11325-30.
- Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A. S., Murcia, N. S., Niswander, L., & Anderson, K. V.** (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*, *426*, 83-7.
- Hubacek, J. A., Stanek, V., Gebauerova, M., Pilipcincova, A., Dlouha, D., Poledne, R., Aschermann, M., Skalicka, H., Matouskova, J., Kruger, A., Penicka, M., Hrabakova, H., Veselka, J., Hajek, P., Lanska, V., Adamkova, V., & Pitha, J.** (2010). A FTO variant and risk of acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*, *411*, 1069-72.
- Hughson, M. D., Douglas-Denton, R., Bertram, J. F., & Hoy, W. E.** (2006). Hypertension, glomerular number, and birth weight in African Americans and white subjects in the southeastern United States. *Kidney Int*, *69*, 671-8.
- Hummel, C. S., Lu, C., Loo, D. D., Hirayama, B. A., Voss, A. A., & Wright, E. M.** (2011). Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *Am J Physiol Cell Physiol*, *300*, C14-21.
- Hynes, M., Stone, D. M., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Goddard, A., Gurney, A., & Rosenthal, A.** (1997). Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. *Neuron*, *19*, 15-26.
- Ikels, K.** (2013). *Der Einfluss von FTO auf die Entstehung des metabolischen Syndroms*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Ingham, P. W., & McMahon, A. P.** (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, *15*, 3059-87.

- Jäger, Y.** (2012). *Der Verlust von Fto in Mäusen führt zu embryonalen und postnatalen Entwicklungsstörungen, sowie zu neonataler Sterblichkeit*. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, 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.** (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 7, 885-7.
- 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, 3313-9.
- Josso, N., & di Clemente, N.** (1997). Serine/threonine kinase receptors and ligands. *Curr Opin Genet Dev*, 7, 371-7.
- Judd, B. H.** (2001). *Experimental Organisms Used in Genetics eLS*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Keller, G., Zimmer, G., Mall, G., Ritz, E., & Amann, K.** (2003). Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med*, 348, 101-8.
- Kessel, M., & Gruss, P.** (1990). Murine developmental control genes. *Science*, 249, 374-9.
- Kestila, M., Lenkkeri, U., Mannikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C. E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A., & Tryggvason, K.** (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*, 1, 575-82.
- Kingsley, D. M.** (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, 8, 133-46.
- Kispert, A., Vainio, S., Shen, L., Rowitch, D. H., & McMahon, A. P.** (1996). Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips. *Development*, 122, 3627-37.
- Klagsbrun, M.** (1989). The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res*, 1, 207-35.
- Koeners, M. P., Braam, B., & Joles, J. A.** (2008). Blood pressure follows the kidney: Perinatal influences on hereditary hypertension. *Organogenesis*, 4, 153-7.
- Kren, S., & Hostetter, T. H.** (1999). The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney Int*, 56, 333-7.
- Kretschmar, M., & Massague, J.** (1998). SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 103-11.
- Kriz, W., & Bankir, L.** (1988). A standard nomenclature for structures of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). *Kidney Int*, 33, 1-7.
- Krumlauf, R.** (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 78, 191-201.

- Lappalainen, T., Kolehmainen, M., Schwab, U. S., Tolppanen, A. M., Stancakova, A., Lindstrom, J., Eriksson, J. G., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Aunola, S., Ilanne-Parikka, P., Herder, C., Koenig, W., Gylling, H., Kolb, H., Tuomilehto, J., Kuusisto, J., & Uusitupa, M.** (2011). Association of the FTO gene variant (rs9939609) with cardiovascular disease in men with abnormal glucose metabolism--the Finnish Diabetes Prevention Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, *21*, 691-8.
- Lee, J., Platt, K. A., Censullo, P., & Ruiz i Altaba, A.** (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development*, *124*, 2537-52.
- Lenkkeri, U., Mannikko, M., McCready, P., Lamerdin, J., Gribouval, O., Niaudet, P. M., Antignac, C. K., Kashtan, C. E., Homberg, C., Olsen, A., Kestila, M., & Tryggvason, K.** (1999). Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations. *Am J Hum Genet*, *64*, 51-61.
- Lesche, R., Peetz, A., van der Hoeven, F., & Rüther, U.** (1997). Ft1, a novel gene related to ubiquitin-conjugating enzymes, is deleted in the Fused toes mouse mutation. *Mamm Genome*, *8*, 879-83.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, *276*, 565-70.
- Lewis, P. M., Dunn, M. P., McMahon, J. A., Logan, M., Martin, J. F., St-Jacques, B., & McMahon, A. P.** (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell*, *105*, 599-612.
- Lin, H. Y., & Lodish, H. F.** (1993). Receptors for the TGF-beta superfamily: multiple polypeptides and serine/threonine kinases. *Trends Cell Biol*, *3*, 14-9.
- Liu, A., Wang, B., & Niswander, L. A.** (2005). Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development*, *132*, 3103-11.
- 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*, 1501-5.
- Lutz, J.** (1984). Calcium balance and acid-base status of women as affected by increased protein intake and by sodium bicarbonate ingestion. *Am J Clin Nutr*, *39*, 281-8.
- Luyckx, V. A., Shukha, K., & Brenner, B. M.** (2011). Low nephron number and its clinical consequences. *Rambam Maimonides Med J*, *2*, e0061.
- Majumdar, A., Vainio, S., Kispert, A., McMahon, J., & McMahon, A. P.** (2003). Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. *Development*, *130*, 3175-85.
- Mancia, G., Ferrari, A., Gregorini, L., Parati, G., Pomidossi, G., Bertinieri, G., Grassi, G., di Rienzo, M., Pedotti, A., & Zanchetti, A.** (1983). Blood pressure and heart rate variabilities in normotensive and hypertensive human beings. *Circ Res*, *53*, 96-104.

- Marigo, V., Davey, R. A., Zuo, Y., Cunningham, J. M., & Tabin, C. J.** (1996a). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature*, *384*, 176-9.
- Marigo, V., Johnson, R. L., Vortkamp, A., & Tabin, C. J.** (1996b). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol*, *180*, 273-83.
- Martin, G. R.** (1987). Nomenclature for homoeobox-containing genes. *Nature*, *325*, 21-2.
- Massague, J., Andres, J., Attisano, L., Cheifetz, S., Lopez-Casillas, F., Ohtsuki, M., & Wrana, J. L.** (1992). TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev*, *32*, 99-104.
- May, S. R., Ashique, A. M., Karlen, M., Wang, B., Shen, Y., Zarbalis, K., Reiter, J., Ericson, J., & Peterson, A. S.** (2005). Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev Biol*, *287*, 378-89.
- 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.
- Michos, O., Cebrian, C., Hyink, D., Grieshammer, U., Williams, L., D'Agati, V., Licht, J. D., Martin, G. R., & Costantini, F.** (2010). Kidney development in the absence of Gdnf and Spry1 requires Fgf10. *PLoS Genet*, *6*, e1000809.
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., & Miyazono, K.** (2002). Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*, *7*, 1191-204.
- Miyazono, K., Maeda, S., & Imamura, T.** (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*, *16*, 251-63.
- Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackelford, G., McMahon, A., Moon, R., & Varmus, H.** (1991). A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*, *64*, 231.
- Ocbina, P. J., & Anderson, K. V.** (2008). Intraflagellar transport, cilia, and mammalian Hedgehog signaling: analysis in mouse embryonic fibroblasts. *Dev Dyn*, *237*, 2030-8.
- Olza, J., Ruperez, A. I., Gil-Campos, M., Leis, R., Fernandez-Orth, D., Tojo, R., Canete, R., Gil, A., & Aguilera, C. M.** (2013). Influence of FTO variants on obesity, inflammation and cardiovascular disease risk biomarkers in Spanish children: a case-control multicentre study. *BMC Med Genet*, *14*, 123.
- Ozer, A., & Bruick, R. K.** (2007). Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? *Nat Chem Biol*, *3*, 144-53.
- Pan, Y., Bai, C. B., Joyner, A. L., & Wang, B.** (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol*, *26*, 3365-77.

- Patterson, L. T., Pembaur, M., & Potter, S. S.** (2001). Hoxa11 and Hoxd11 regulate branching morphogenesis of the ureteric bud in the developing kidney. *Development*, *128*, 2153-61.
- Pausova, Z., Syme, C., Abrahamowicz, M., Xiao, Y., Leonard, G. T., Perron, M., Richer, L., Veillette, S., Smith, G. D., Seda, O., Tremblay, J., Hamet, P., Gaudet, D., & Paus, T.** (2009). A common variant of the FTO gene is associated with not only increased adiposity but also elevated blood pressure in French Canadians. *Circ Cardiovasc Genet*, *2*, 260-9.
- 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*, 481-4.
- Pepicelli, C. V., Kispert, A., Rowitch, D. H., & McMahon, A. P.** (1997). GDNF induces branching and increased cell proliferation in the ureter of the mouse. *Dev Biol*, *192*, 193-8.
- Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K., Taylor, F. R., Wang, E. A., & Galdes, A.** (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem*, *273*, 14037-45.
- Perantoni, A. O.** (2003). Renal development: perspectives on a Wnt-dependent process. *Semin Cell Dev Biol*, *14*, 201-8.
- Peters, T., Ausmeier, K., Dildrop, R., & Rüther, U.** (2002). The mouse Fused toes (Ft) mutation is the result of a 1.6-Mb deletion including the entire Iroquois B gene cluster. *Mamm Genome*, *13*, 186-8.
- 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*, 983-6.
- Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E. J., Huang, S. P., Saarma, M., Hoffer, B. J., Sariola, H., & Westphal, H.** (1996). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature*, *382*, 73-6.
- Pluthero, F.** (1993). Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucl Acids Res*, *21*, 20.
- Porter, J. A., von Kessler, D. P., Ekker, S. C., Young, K. E., Lee, J. J., Moses, K., & Beachy, P. A.** (1995). The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature*, *374*, 363-6.
- Porter, J. A., Young, K. E., & Beachy, P. A.** (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*, *274*, 255-9.
- Prashad, D. N., Fletcher, P. A., & Cooper, M.** (1987). Exercise-induced changes in urinary water and mineral output during the menstrual cycle. *Br J Sports Med*, *21*, 9-12.
- Pritzel, S.** (2013). *Ziliogenese und Fto-Funktion*. Masterarbeit, Fach Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Rahmouni, K., & Morgan, D. A.** (2007). Hypothalamic arcuate nucleus mediates the sympathetic and arterial pressure responses to leptin. *Hypertension*, *49*, 647-52.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., & Tabin, C.** (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, *75*, 1401-16.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., & Nusse, R.** (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*, *50*, 649-57.
- 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*, 80-4.
- Rodbell, M.** (1980). The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature*, *284*, 17-22.
- Saarma, M.** (2000). GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur J Biochem*, *267*, 6968-71.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* *239*, 487-91.
- Sainio, K., Suvanto, P., Davies, J., Wartiovaara, J., Wartiovaara, K., Saarma, M., Arumae, U., Meng, X., Lindahl, M., Pachnis, V., & Sariola, H.** (1997). Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. *Development*, *124*, 4077-87.
- Samper Agrelo, I.** (2012). *Analyse von Entwicklungs- und Funktions-Proteinen in der Niere von Fto-negativen Mäusen*. Bachelorarbeit, Fach Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- 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.
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., & Kondoh, H.** (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development*, *126*, 3915-24.
- Saxen, L., & Sariola, H.** (1987). Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol*, *1*, 385-92.
- Saxen, L., Sariola, H., & Lehtonen, E.** (1986). Sequential cell and tissue interactions governing organogenesis of the kidney. *Anat Embryol (Berl)*, *175*, 1-6.
- Schlote, J., Schroder, A., Dahlmann, A., Karpe, B., Cordasic, N., Daniel, C., Hilgers, K. F., Titze, J., Amann, K., & Benz, K.** (2013). Cardiovascular and renal effects of high salt diet in GDNF^{+/-} mice with low nephron number. *Kidney Blood Press Res*, *37*, 379-91.

- Schmidt-Nielsen, B., & O'Dell, R.** (1961). Structure and concentrating mechanism in the mammalian kidney. *Am J Physiol*, 200, 1119-24.
- Schnell, M. A., Hardy, C., Hawley, M., Propert, K. J., & Wilson, J. M.** (2002). Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters. *Hum Gene Ther*, 13, 155-61.
- 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., Sprau, A. G., Tong, M., White, P. P., Hetrick, K. N., Barnhart, M. W., Bark, C. W., Goldstein, J. L., Watkins, L., Xiang, F., Saramies, J., Buchanan, T. A., Watanabe, R. M., Valle, T. T., Kinnunen, L., Abecasis, G. R., Pugh, E. W., Doheny, K. F., Bergman, R. N., Tuomilehto, J., Collins, F. S., & Boehnke, M.** (2007). A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*, 316, 1341-5.
- 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., Chakravarti, A., Schlessinger, D., Cao, A., Lakatta, E., & Abecasis, G. R.** (2007). Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet*, 3, e115.
- Shakya, R., Watanabe, T., & Costantini, F.** (2005). The role of GDNF/Ret signaling in ureteric bud cell fate and branching morphogenesis. *Dev Cell*, 8, 65-74.
- Shek, E. W., Brands, M. W., & Hall, J. E.** (1998). Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension*, 31, 409-14.
- Shi, Y., & Massague, J.** (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113, 685-700.
- Smetana, H.** (1947). The Permeability of the Renal Glomeruli of Several Mammalian Species to Labelled Proteins. *Am J Pathol*, 23, 255-67.
- Spoto, B., Mattace-Raso, F., Sijbrands, E., Mallamaci, F., Leonardis, D., Aucella, F., Testa, A., Gesuete, A., Sanguedolce, M. C., D'Arrigo, G., Parlongo, R. M., Pisano, A., Torino, C., Enia, G., Tripepi, G., Postorino, M., & Zoccali, C.** (2012). The fat-mass and obesity-associated gene (FTO) predicts mortality in chronic kidney disease of various severity. *Nephrol Dial Transplant*, 27 Suppl 4, iv58-62.
- Spychala, A.** (2012). *Analyse von Verhaltensstörungen in Fto-defizienten Mäusen*. Masterarbeit, Fach Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Stecca, B., & Ruiz, I. A. A.** (2010). Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *J Mol Cell Biol*, 2, 84-95.
- Stevens, A. u. L., J.** (1992). Harnapparat (K. Tiedemann, Trans.). In C. H. GmbH (Ed.), *Histologie* (pp. 271-303). Weinheim.

- 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, R1185-96.
- Suter, P. M., Locher, R., Hasler, E., & Vetter, W.** (1998). Is there a role for the ob gene product leptin in essential hypertension? *Am J Hypertens*, 11, 1305-11.
- 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, 2851-7.
- Tang, M. J., Worley, D., Sanicola, M., & Dressler, G. R.** (1998). The RET-glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) pathway stimulates migration and chemoattraction of epithelial cells. *J Cell Biol*, 142, 1337-45.
- Tanner, G. A.** (2008). Kidney Function. In R. A. Rhoades (Ed.), *Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine* (Chapter 22, pp. 391-418): Lippincott Williams & Wilkins.
- Thorausch, P., Mydlak, K., Bühling A., Wojtzyk I.** Einheiten-Umrechner, http://www.labor-cottbus.de/einheiten-umrechner.einheiten_umrechner.0.html
- Tojo, A., & Kinugasa, S.** (2012). Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *Int J Nephrol*, 2012, 481520.
- Treanor, J. J., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D. M., Poulsen, K. T., Beck, C. D., Gray, C., Armanini, M. P., Pollock, R. A., Hefti, F., Phillips, H. S., Goddard, A., Moore, M. W., Buj-Bello, A., Davies, A. M., Asai, N., Takahashi, M., Vandlen, R., Henderson, C. E., & Rosenthal, A.** (1996). Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature*, 382, 80-3.
- Trilok, G., & Draper, H. H.** (1989). Effect of a high protein intake on acid-base balance in adult rats. *Calcif Tissue Int*, 44, 339-42.
- Vallon, V., Platt, K. A., Cunard, R., Schroth, J., Whaley, J., Thomson, S. C., Koepsell, H., & Rieg, T.** (2011). SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*, 22, 104-12.
- 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, 2601-7.
- Vander, A. J.** (1965). Effect of catecholamines and the renal nerves on renin secretion in anesthetized dogs. *Am J Physiol*, 209, 659-62.
- 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, e45-9.

Vega, Q. C., Worby, C. A., Lechner, M. S., Dixon, J. E., & Dressler, G. R. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor activates the receptor tyrosine kinase RET and promotes kidney morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*, 10657-61.

Villalobos-Comparán, M., Flores-Dorantes, M. T., Villarreal-Molina, M. T., Rodríguez-Cruz, M., García-Ulloa, A. C., Robles, L., Huertas-Vázquez, A., Saucedo-Villarreal, N., López-Alarcón, M., Sánchez-Muñoz, F., Domínguez-López, A., Gutiérrez-Aguilar, R., Menjivar, M., Coral-Vázquez, R., Hernández-Stengele, G., Vital-Reyes, V. S., Acuña-Alonzo, V., Romero-Hidalgo, S., Ruiz-Gómez, D. G., Riaño-Barros, D., Herrera, M. F., Gómez-Pérez, F. J., Froguel, P., García-García, E., Tusié-Luna, M. T., Aguilar-Salinas, C. A., & Canizales-Quinteros, S. (2008). The FTO Gene Is Associated With Adulthood Obesity in the Mexican Population. *Obesity*, *16*, 2296-301.

Vimtrup, B. (1928). On the number, shape, structure, and surface area of the glomeruli in the kidneys of man and mammals. *American Journal of Anatomy*, *41*, 123-51.

Vize, P. D., Seufert, D. W., Carroll, T. J., & Wallingford, J. B. (1997). Model systems for the study of kidney development: Use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. *Dev Biol*, *188*, 189-204.

Wagener, D. K., Harris, T., & Madans, J. H. (1994). Proteinuria as a Biomarker: Risk of Subsequent Morbidity and Mortality. *Environmental Research*, *66*, 160-72.

Waite, K. A., & Eng, C. (2003). From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet*, *4*, 763-73.

Waller, K. V., Ward, K. M., Mahan, J. D., & Wismatt, D. K. (1989). Current concepts in proteinuria. *Clin Chem*, *35*, 755-65.

Wardle, J., Llewellyn, C., Sanderson, S., & Plomin, R. (2009). The FTO gene and measured food intake in children. *Int J Obes (Lond)*, *33*, 42-5.

Wathen, R. L., Kingsbury, W. S., Stouder, D. A., Schneider, E. G., & Rostorfer, H. H. (1965). *Effects of infusion of catecholamines and angiotensin II on renin release in anesthetized dogs* (Vol. 209).

Welch, A. A., Mulligan, A., Bingham, S. A., & Khaw, K. T. (2008). Urine pH is an indicator of dietary acid-base load, fruit and vegetables and meat intakes: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk population study. *Br J Nutr*, *99*, 1335-43.

Wellik, D. M., Hawkes, P. J., & Capecchi, M. R. (2002). Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. *Genes Dev*, *16*, 1423-32.

Wilmer, H. A. (1941). The arrangement of the capillary tuft of the human glomerulus. An injection study. *The Anatomical Record*, *80*, 507-18.

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*, 336-40.

Wright, E. M. (2001). Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280, F10-8.

Yamada, T., Pfaff, S. L., Edlund, T., & Jessell, T. M. (1993). Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell*, 73, 673-86.

Yu, J., Carroll, T. J., & McMahon, A. P. (2002). Sonic hedgehog regulates proliferation and differentiation of mesenchymal cells in the mouse metanephric kidney. *Development*, 129, 5301-12.

Zhang, Z., Zhou, D., Lai, Y., Liu, Y., Tao, X., Wang, Q., Zhao, G., Gu, H., Liao, H., Zhu, Y., Xi, X., & Feng, Y. (2012). Estrogen induces endometrial cancer cell proliferation and invasion by regulating the fat mass and obesity-associated gene via PI3K/AKT and MAPK signaling pathways. *Cancer Lett*, 319, 89-97.

Zhao, X., Yang, Y., Sun, B. F., Shi, Y., Yang, X., Xiao, W., Hao, Y. J., Ping, X. L., Chen, Y. S., Wang, W. J., Jin, K. X., Wang, X., Huang, C. M., Fu, Y., Ge, X. M., Song, S. H., Jeong, H. S., Yanagisawa, H., Niu, Y., Jia, G. F., Wu, W., Tong, W. M., Okamoto, A., He, C., Rendtlew Danielsen, J. M., Wang, X. J., & Yang, Y. G. (2014). FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Res*, 24, 1403-19.

Zingsem, R. (2010). *Untersuchungen zur Funktion von Fto in verschiedenen Organen der Maus*. Diplomarbeit, Fach Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

9. Anhang

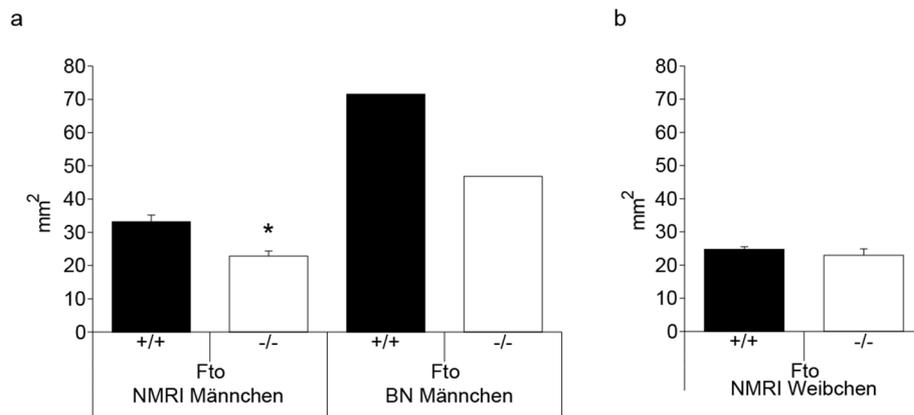


Abbildung 9.1: Fläche der ausgezählten Nierenschnitte.

Fläche der ausgezählten Nierenschnitte für (a) männliche Mäuse mit NMRI- (n=4/3; *p=0,02) und BN-Hintergrund (n=1/1) sowie (b) für weibliche Mäuse mit NMRI-Hintergrund (n=6/3). Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

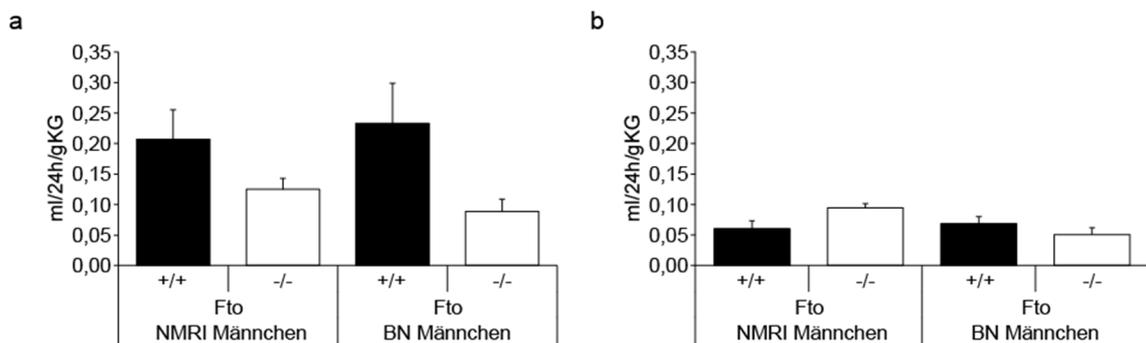


Abbildung 9.2: Trinkverhalten und Urinproduktion männlicher Mäuse.

(a) Gezeigt sind die Mengen an aufgenommenem Wasser sowie (b) die Mengen ausgeschiedenen Urins innerhalb eines Tages und jeweils bezogen auf das Körpergewicht (KG) in Gramm von männlichen Mäusen mit NMRI- (n=2/3) und BN-Hintergrund (n=5/5). Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

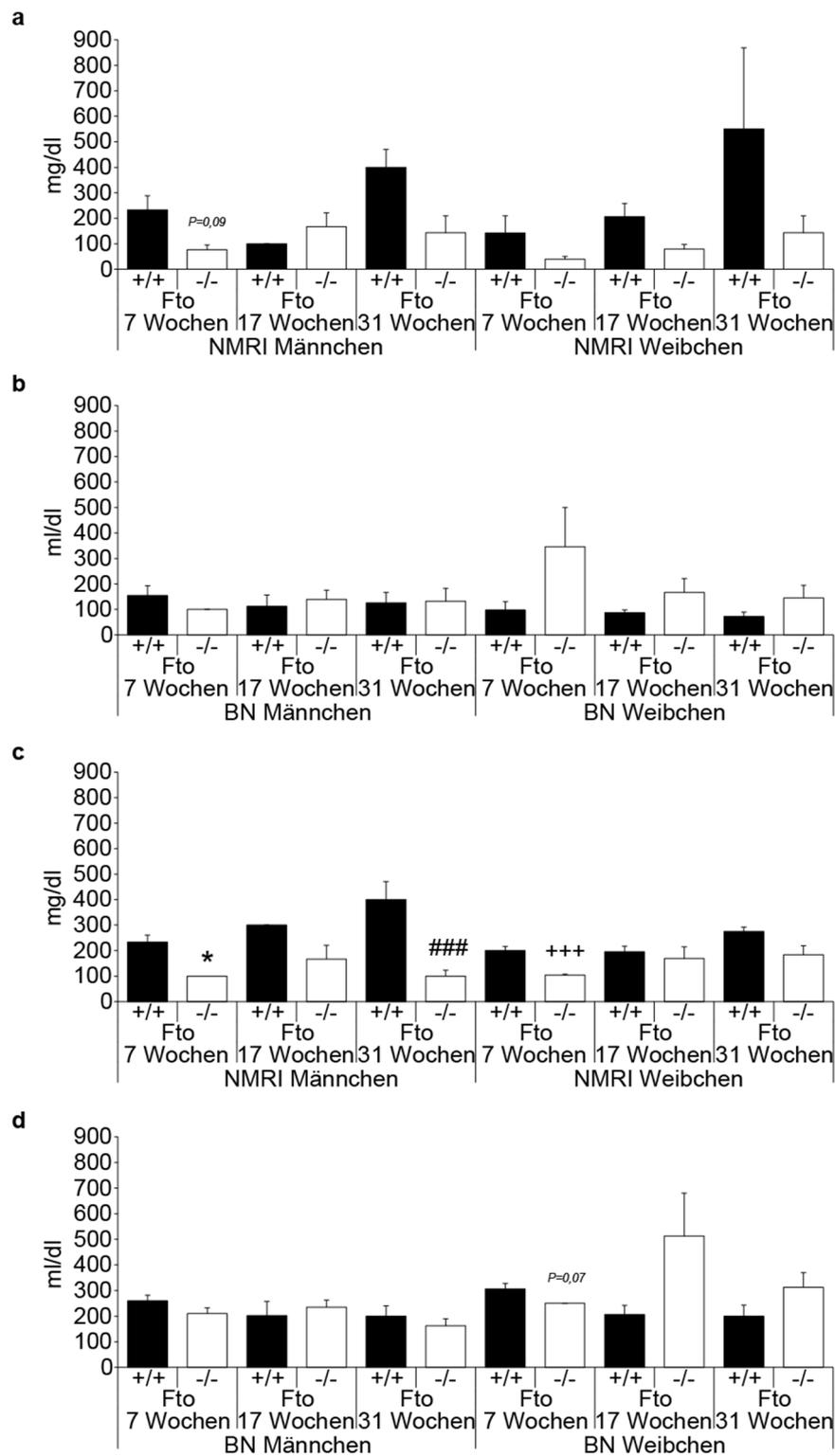


Abbildung 9.3: Protein- und Kreatinin-Konzentrationen im Urin adulter Mäuse.

Proteinkonzentrationen im Urin (a) männlicher und weiblicher sieben (n=3/3; n=6/6), 17 (n=2/3; n=5/4) und 31 Wochen (n=2/3; n=2/3) alter Mäuse mit NMRI-Hintergrund sowie (b) männlicher und weiblicher sieben (n=5/5; n=4/5), 17 (n=5/5; n=4/3) und 31 Wochen (n=5/4; n=4/4) alter Mäuse mit BN-Hintergrund. In (c) sind die Kreatinin-Konzentrationen im Urin männlicher und weiblicher sieben (*p=0,02; +++p=0,0005), 17 und 31 Wochen (#p=0,04) alter Mäuse mit NMRI-Hintergrund und in (d) die Kreatinin-Konzentration im Urin männlicher und weiblicher sieben (Weibchen n=4/4), 17 (Weibchen n=4/2) und 31 Wochen alter Mäuse mit BN-Hintergrund dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Mauslinie	Alter	Geschlecht	Urobilinogen		Bilirubin		Blut		Ketone		Nitrite		Leukozyten	
			+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-
NMRI	7 Wochen	♂	1	1	0	0	0,05	n.m.	0	0	0	0	6,25	5
		♀	1	1	0	0,08	0,06	0,1	0	0	0,17	0	10,42	4,17
	17 Wochen	♂	n.m.	n.m.	0	0	0,2	0,06	0	0	0	0	0	0
		♀	1	1	0,2	0,17	0,06	n.m.	0	0	0,4	0,4	12,5	12,5
	31 Wochen	♂	1	n.m.	0	0	n.m.	n.m.	0	0	0,5	0,83	6,25	8,3
		♀	1	1	1	0	n.m.	0,06	0,63	0	0	0	12,5	8,3
BN	7 Wochen	♂	1	1	0,13	0	n.m.	0,06	0	0	0,4	0	7,5	7,5
		♀	1	1	0,17	0,13	0,05	n.m.	0	0	0	0	0	0
	17 Wochen	♂	1	1	0,17	0	0,06	0,06	0	0	0,6	0,5	5	3,13
		♀	1	n.m.	0,17	0	0,03	n.m.	0	2,5	1,25	1,25	6,25	6,25
	31 Wochen	♂	1	1	0,1	0,06	n.m.	0,06	0	0	0,25	0,25	15	16,67
		♀	1	1	0,13	0	n.m.	0,13	3,75	1,25	0,63	0,38	9,38	12,5

Tabelle 9.1: Aus Urinproben ermittelte Werte für die Parameter Urobilinogen, Bilirubin, Blut, Ketone, Nitrite und Leukozyten.

Im oberen Teil der Tabelle sind für männliche und weibliche Mäuse mit NMRI-Hintergrund die Mittelwerte der Messungen der Parameter Urobilinogen im Alter von sieben (n=1/0; n=4/2), 17 (n=0/0; n=2/1) und 31 Wochen (n=2/1; n=1/0), Bilirubin im Alter von sieben (n=2/3; n=6/6), 17 (n=2/3; n=5/3) und 31 Wochen (n=2/3; n=2/3), Blut im Alter von sieben (n=1/0; n=4/3), 17 (n=1/1; n=3/0) und 31 Wochen (n=0/0; n=0/1), Ketone im Alter von sieben (n=3/3; n=6/6), 17 (n=2/3; n=5/3) und 31 Wochen (n=2/3; n=2/3), Nitrite im Alter von sieben (n=3/3; n=6/6), 17 (n=2/3; n=5/3) und 31 Wochen (n=2/3; n=2/3) und Leukozyten im Alter von sieben (n=3/3; n=6/6), 17 (n=2/3; n=5/4) und 31 Wochen (n=2/3; n=2/3) gezeigt. Im unteren Teil der Tabelle sind für männliche und weibliche Mäuse mit BN-Hintergrund die Mittelwerte der Messungen der Parameter Urobilinogen im Alter von sieben (n=2/1; n=3/3), 17 (n=1/1; n=2/0) und 31 Wochen (n=2/2; n=3/3), Bilirubin im Alter von sieben (n=4/5; n=3/4), 17 (n=3/5; n=3/2) und 31 Wochen (n=5/3; n=4/4), Blut im Alter von sieben (n=1/2; n=3/2), 17 (n=2/1; n=3/0) und 31 Wochen (n=0/1; n=0/2), Ketone im Alter von sieben (n=5/5; n=4/5), 17 (n=5/5; n=4/3) und 31 Wochen (n=5/3; n=4/4), Nitrite im Alter von sieben (n=5/4; n=3/3), 17 (n=5/5; n=4/2) und 31 Wochen (n=4/3; n=4/4) und Leukozyten im Alter von sieben (n=5/5; n=4/5), 17 (n=5/5; n=4/3) und 31 Wochen (n=5/3; n=4/4) dargestellt; (n.m.= nicht messbar).

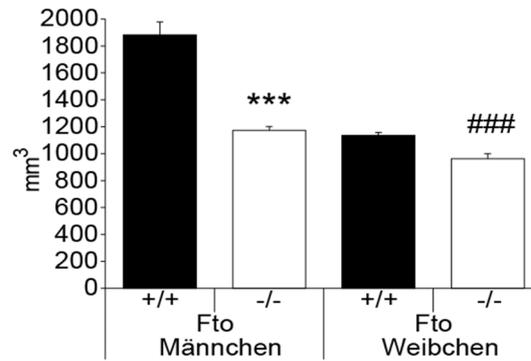


Abbildung 9.4: Nierenvolumen adulter Mäuse mit NMRI-Hintergrund.

Das Volumen der Nieren männlicher (n=12/12; ***p=0,000009) und weiblicher (n=22/18; ###p=0,0002) Mäuse mit NMRI-Hintergrund im Alter von drei bis vier Monaten. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

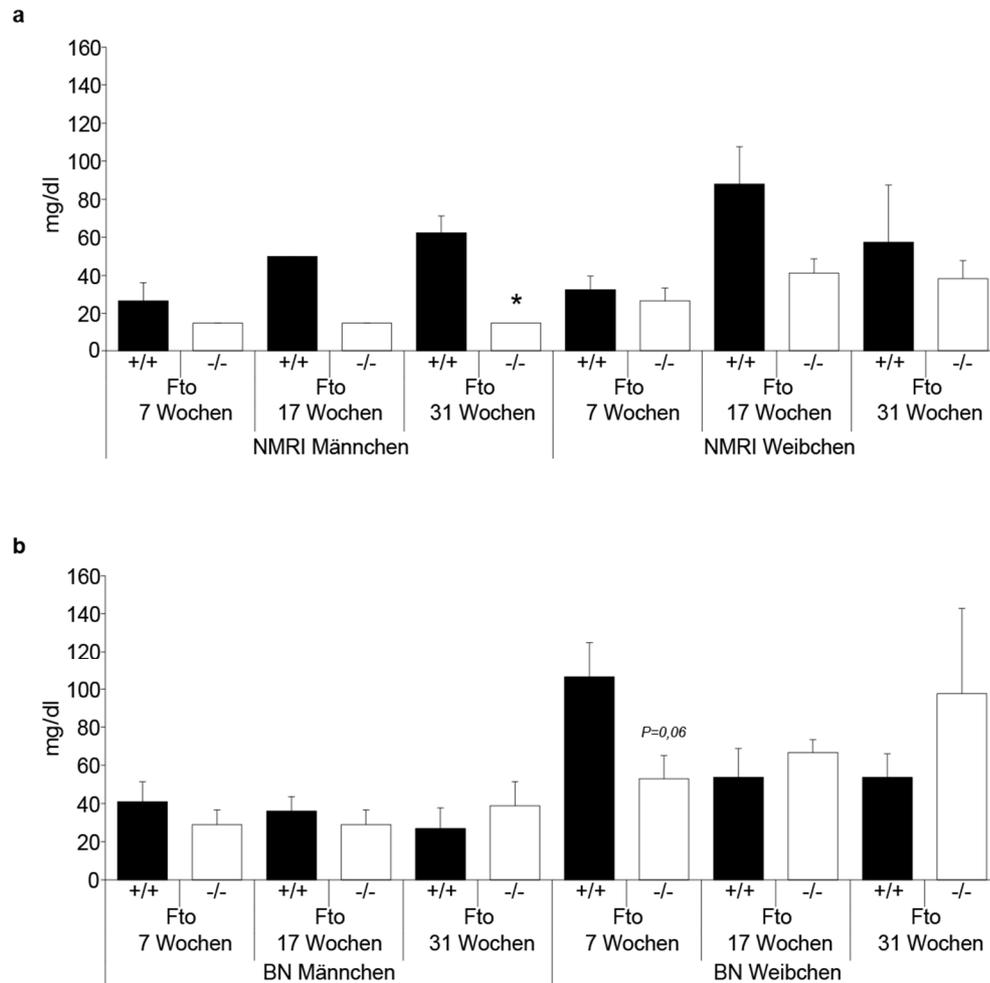


Abbildung 9.5: Glukosekonzentrationen im Urin adulter Mäuse.

Glukosekonzentration im Urin (a) männlicher und weiblicher Mäuse mit NMRI-Hintergrund im Alter von sieben (n=3/3; n=6/6), 17 (n=2/3; n=5/4) und 31 Wochen (n=2/3; *p=0,02; n=2/3) sowie (b) männlicher und weiblicher Mäuse mit BN-Hintergrund im Alter von sieben (n=5/5; n=4/5), 17 (n=5/5; n=4/3) und 31 Wochen (n=5/4; n=4/4). Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

Mauslinie	Alter	Geschlecht	Kreatinin Plasma		Kreatinin Clearance	
			+/+	-/-	+/+	-/-
NMRI	7 Wochen	♂	n.m.	n.m.	n.b.	n.b.
		♀	n.m.	n.m.	n.b.	n.b.
	17 Wochen	♂	n.m.	n.m.	n.b.	n.b.
		♀	n.m.	n.m.	n.b.	n.b.
	31 Wochen	♂	n.m.	n.m.	n.b.	n.b.
		♀	n.m.	n.m.	n.b.	n.b.
BN	7 Wochen	♂	n.m.	0,35	n.b.	17650,46
		♀	0,4	0,3	19921,27	10981,14
	17 Wochen	♂	n.m.	n.m.	n.b.	n.b.
		♀	n.m.	n.m.	n.b.	n.b.
	31 Wochen	♂	n.m.	n.m.	n.b.	n.b.
		♀	n.m.	n.m.	n.b.	n.b.

Tabelle 9.2: Plasma-Kreatininwerte und die daraus berechnete Kreatinin-Clearance.

Die Plasma-Kreatininwerte für männliche und weibliche Mäuse mit NMRI-Hintergrund lagen unterhalb des Schwellenwerts. Für einige Mäuse mit BN-Hintergrund im Alter von sieben Wochen (♂: n=0/2; ♀: n=1/2) konnten Plasma-Kreatininwerte bestimmt und so auch die Clearance berechnet werden. Gezeigt sind die Mittelwerte; (n.m. = nicht messbar; n.b. = nicht bestimmbar).

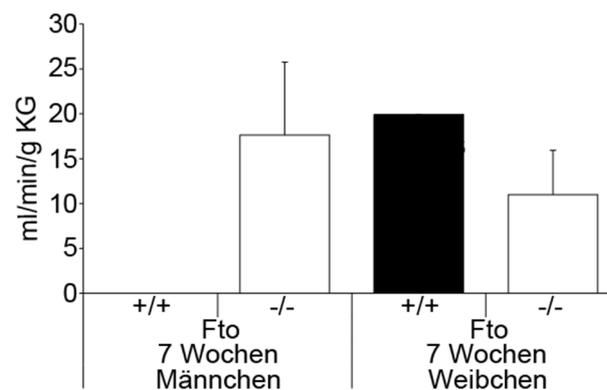


Abbildung 9.6: Kreatinin-Clearance sieben Wochen alter Mäuse mit BN-Hintergrund.

Hier sind die in Tabelle 9.2 gezeigten Werte der Kreatinin Clearance in Milliliter pro Minute und Gramm Körpergewicht (KG) für sieben Wochen alte männliche (n=0/2) und weibliche (n=1/2) Mäuse mit BN-Hintergrund graphisch dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

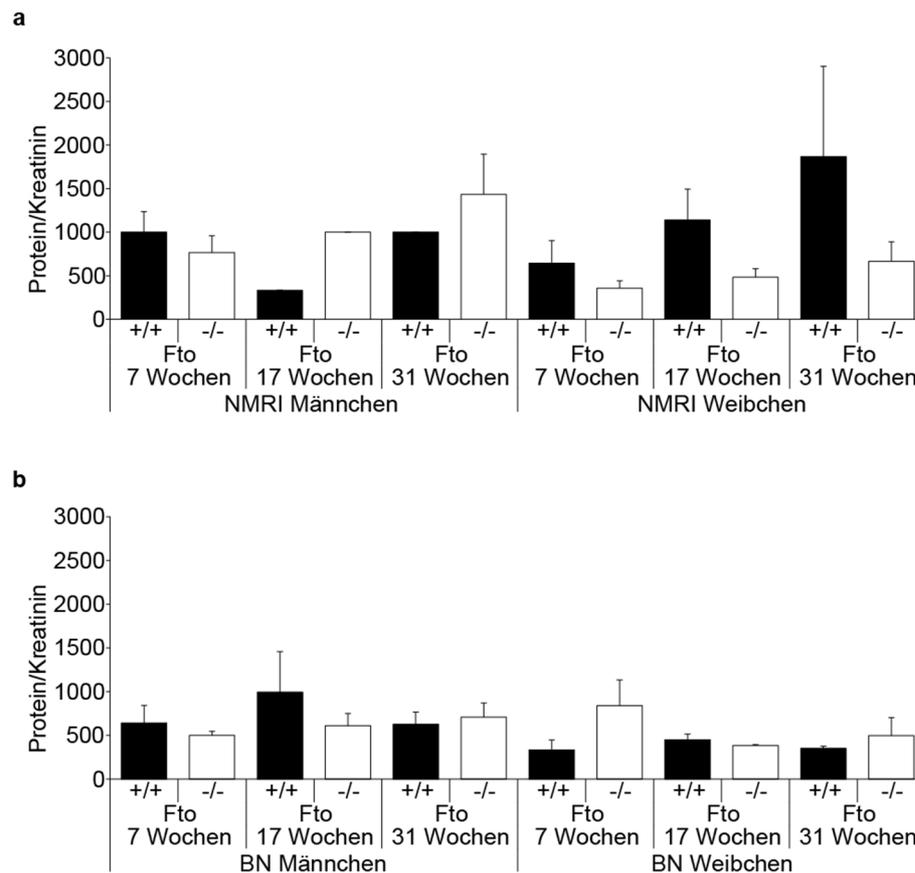


Abbildung 9.7: Protein/Kreatinin-Quotient.

Hier wurde der aus den in Abbildung 9.3 gezeigten Werten von für Protein- und Kreatininkonzentrationen berechnete Quotient aufgetragen. Gezeigt ist in (a) der Protein/Kreatinin-Quotient männlicher und weiblicher sieben ($n=3/3$; $n=6/6$), 17 ($n=2/3$; $n=5/4$) und 31 Wochen ($n=2/3$ $n=2/3$) alter Mäuse mit NMRI-Hintergrund und in (b) der Protein/Kreatinin-Quotient männlicher und weiblicher sieben ($n=5/5$; $n=4/4$), 17 ($n=5/5$; $n=4/2$) und 31 Wochen ($n=5/4$; $n=4/4$) alter Mäuse mit BN-Hintergrund. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

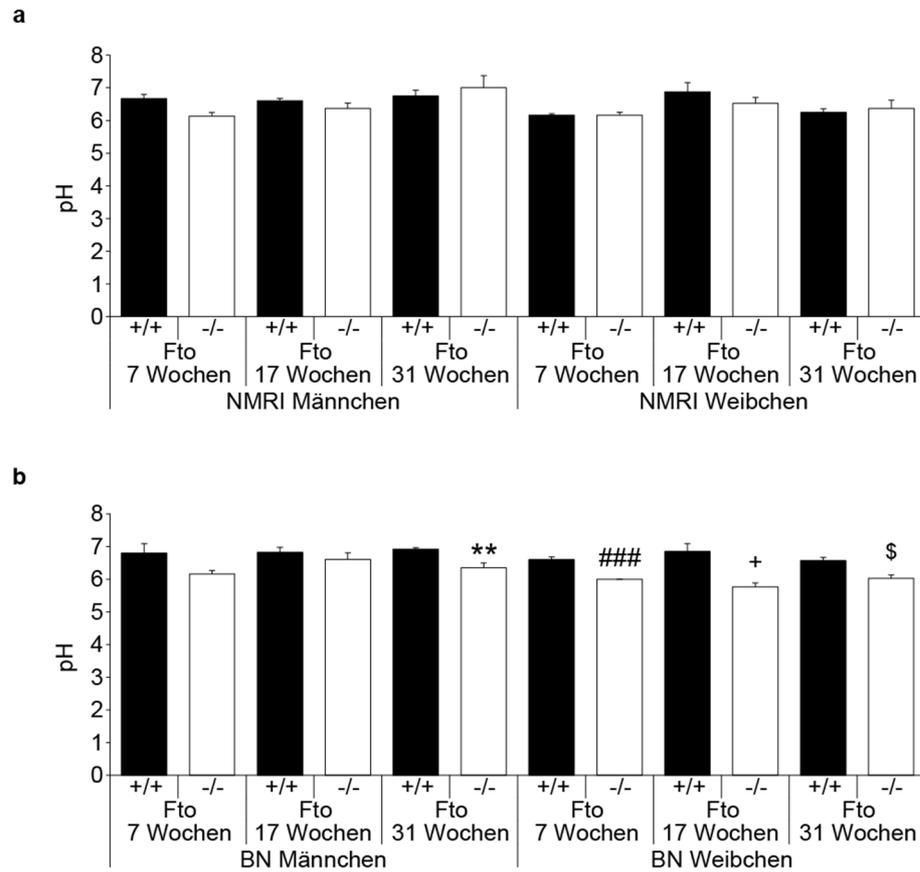


Abbildung 9.8: Urin-pH-Werte für einzelne Altersgruppen.

(a) zeigt die pH-Werte des Urins männlicher und weiblicher sieben ($n=3/3$; $n=6/6$), 17 ($n=2/3$; $n=5/4$) und 31 Wochen ($n=2/3$; $n=2/3$) alter Mäuse mit NMRI-Hintergrund. In (b) sind die Urin-pH-Werte männlicher und weiblicher sieben ($n=5/5$; $n=4/4$; $*p=0,0006$), 17 ($n=5/4$; $n=4/3$; $+p=0,03$) und 31 Wochen ($n=5/4$; $**p=0,01$; $n=3/4$; $\$p=0,03$) alter Mäuse mit BN-Hintergrund dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte und SEM.

10. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Ulrich Rüter für die Überlassung des interessanten Themas sowie die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik.

Bei Prof. Dr. Klein möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Für die Bereitstellung des Blutdruckmessgerätes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kojda. Ganz besonders aber bei seiner Mitarbeiterin Frau Dr. Tatsiana Suvorava für die Einweisung in die und die Unterstützung bei der Arbeit mit diesem oft widerwilligen Gerät.

Ein großer Dank geht außerdem an Kristina Behnke für die unterhaltsamen Ausflüge in die medizinische Mikrobiologie und das Zur-Verfügung-Stellen von „Tante Mildrid“.

Auch geht mein Dank an Herrn Dr. med. Sebastian Potthoff und Blanka Duvniak für die großzügige Bereitstellung benötigter Utensilien.

Besonderer Dank gilt Stefanie Kuschel für die Unterstützung bei der Arbeit mit „meinen“ Mäusen und auch Dr. Kathrin Ikels für die vielen hilfreichen Denkanstöße.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Julia Dronka für ihre Hilfe bei der elenden Schleppei der Mausekisten bedanken.

Ich danke auch allen EMT-Mitarbeitern für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die große Unterstützung.

Ein ganz besonderer und großer Dank gilt Frank Wiege, der in den vergangenen Jahren immer hinter mir gestanden und mich nach allen Kräften unterstützt hat.

Widmen möchte ich diese Arbeit meiner Mutter, die mir genug emanzipierten Ehrgeiz verlieh und ohne deren Unterstützung ich das alles nicht geschafft hätte; meinem Vater, der mir beigebracht hat zu hinterfragen und unsichtbare Dinge auf der anderen Seite des Blattes zu sehen; und meiner Anna Oma, weil sie Schnecken aufgeschnitten hat, um nach Knochen zu suchen.

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit „Der Verlust von FTO in der Maus führt zu einer erhöhten Glomerulidichte und beeinflusst die Nierenfunktion“ selbstständig verfasst und unter Berücksichtigung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Fassung noch keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

(Rebecca Zingsem)