TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Molekulare Ernährungsmedizin

Kandidatengene für Adipositas -

Einfluss von Adipositas-Genen auf Komponenten des Energiehaushalts der Labormaus

Nadine Rink

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Schemann

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Martin Klingenspor

2. Prof. Dr. Hannelore Daniel

Die Dissertation wurde am 27.02.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.05.2018 angenommen

MAN MUSS NICHTS IM LEBEN FÜRCHTEN,
MAN MUSS NUR ALLES VERSTEHEN.

Marie Skłodowska Curie (1867 - 1934)

VERZEICHNISSE

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnisse III
Zusammenfassung X
Summary XI
1 Einleitung 1
1.1 Adipositas 1
1.2 Komponenten des Energiehaushaltes 1
1.3 Regulation der Energieaufnahme 2
1.4 Genetisch bedingte Adipositas 3
1.5 Kandidatengene für Adipositas 4
1.5.1 Melanocortin 4 Rezeptor - *Mc4r* 4
1.5.2 Fat mass and obesity associated - *Fto* 5
1.6 Ziele und Fragestellung der vorliegenden Arbeit 6
2 Material und Methoden 8
2.1 Mauszucht und Versuchstiere 8
2.1.1 Haltungsbedingungen 8
2.2 *In vivo* Untersuchungen 9
2.2.1 Föten 9
2.2.2 Jungtier- und Adult-Gewichte 9
2.2.3 Körperzusammensetzung 9
2.2.4 Körpertemperatur 9
2.2.5 Indirekte Kalorimetrie 9
2.2.6 Direkte Kalorimetrie 11
2.2.7 Feeding-Drinking-Activity und Futterwahlversuch 12
2.2.8 Gewebeentnahme und Körperlänge 13
2.3 *In vitro* Untersuchungen 13
2.3.1 Polymerase Kettenreaktion Anwendungen 13
2.3.2 SDS-PAGE und Western Blot 16
2.3.3 Urin-Protein Bestimmung 18
2.3.4 mRNA-Isolation und cDNA-Synthese 18
2.3.5 Histologische Untersuchungen 19
2.4 Statistik 19
3 Ergebnisse 21
3.1 Melanocortin 4 Rezeptor – *Mc4r* 21

3.1.1 *Mc4r*^{W16X} – Metabolische Bilanzierung heranwachsender Mäuse 21
3.1.2 *Mc4r*^{W16X} - Screening an der GMC..... 29
3.2 Fat mass and obesity associated - *Fto* 33
3.2.1 *Fto* - basale Körperkenndaten und Vergleich der Modelle..... 33
3.2.2 *Fto* - Nachweis von *Fto* mRNA und Protein 34
3.2.3 *Fto*^{tm1b} – Ursache und Entwicklung des kleinwüchsigen Phänotyps..... 36
3.2.4 *Fto*^{tm1b} - Metabolische Messungen 44
3.2.5 *Fto*^{tm1b} - Aktivitätsmessung 49
3.2.6 *Fto*^{tm1b} - fettreiche Fütterung..... 51
4 Diskussion..... 56
4.1 Hintergrund der Arbeit 56
4.2 Adoleszente *Mc4r*-defiziente Mäuse sind hyperphag und hypermetabol 57
4.3 Fat mass and obesity associated - *Fto* 59
4.3.1 *Fto*^{tm1a} - Ein Mausmodell für eine reduzierte Expression von FTO 59
4.3.2 Kleinwüchsig und fettleibig durch Wachstumsverzögerung in früher Welpenphase 60
4.3.3 *FTO*-Defizienz führt zu veränderter Energiepartionierung 62
4.3.4 *FTO* beeinflusst das dopaminerge Belohnungssystem 63
4.4 Nahrungsaufnahme als entscheidender Faktor in der Regulation des Körpergewichtes 64
5 Referenzen 66

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Langzeit- und Kurzzeit-Sättigungssignale zur Regulation der Nahrungsaufnahme 3
Abbildung 2 Modifizierter GreenLine Haltungskäfig für indirekte Kalorimetrie 11
Abbildung 3 Genkonstrukt der EUCOMM Mauslinien am Beispiel von *Fto*$^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ 15
Abbildung 4 Körpergewicht und -zusammensetzung heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse 22
Abbildung 5 Körpertemperatur heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse 22
Abbildung 6 Durchschnittliche Futteraufnahme heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse..... 23
Abbildung 7 Adjustierte Energieaufnahme heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse..... 24
Abbildung 8 Verlaufskurven zum Energieumsatz juveniler *Mc4r*^{W16X} Mäuse über 24 Stunden 25
Abbildung 9 Adjustierter täglicher Energieumsatz heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse 26
Abbildung 10 Ruhestoffwechselrate heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse..... 27
Abbildung 11 Zeitlicher Verlauf der Respiratorischen Austauschrate juveniler *Mc4r*^{W16X} Mäuse..... 28
Abbildung 12 Sauerstoffverbrauch von *Mc4r*^{W16X} Mäusen 31
Abbildung 13 Körpergewichte von *Fto*^{tm1a} und *Fto*^{tm1b} Mäusen im Alter von 8 Wochen..... 33
Abbildung 14 Körperzusammensetzung und –länge von Männchen beider *Fto*-Linien 34
Abbildung 15 Western Blot mit Proteinisolationen aus murinem Hypothalamus und HEK 293 Zellen 34
Abbildung 16 Bindestellen der Primer sowie Nachweis für alternatives Spleißen in *Fto*^{tm1a}-Mäusen . 35
Abbildung 17 Nachweis von MUP im Mausurin 28 Tage alter *Fto*^{tm1b} Männchen 36
Abbildung 18 Relative mRNA Expressionsspiegel verschiedener Regulatoren des Muskelwachstums 37
Abbildung 19 Körpergewichtsverlauf, Körpergewicht und Körpertemperatur von *Fto*^{tm1b} Welpen 38
Abbildung 20 Genotypverteilung und Überlebensrate abgesetzter *Fto*^{tm1b} Mäuse..... 39
Abbildung 21 Körpergewichtsverläufe heranwachsender *Fto*^{tm1b} Mäuse..... 40
Abbildung 22 Körperzusammensetzung und Körpergewicht ausgewachsener *Fto*^{tm1b} Mäuse 41
Abbildung 23 Adjustierte fettfreie und Fettmasse ausgewachsener *Fto*^{tm1b} Mäuse 42
Abbildung 24 Korrelation des Organgewichtes mit dem Körpergewicht in der Mauslinie *Fto*^{tm1b} 43
Abbildung 25 Energieumsatz von *Fto*^{tm1b} Mäusen im zeitlichen Verlauf 44
Abbildung 26 Ruhestoffwechsel von *Fto*^{tm1b} Mäusen 45
Abbildung 27 Energieumsatz von *Fto*^{tm1b} Mäusen nach Lichtphase und Geschlecht 46
Abbildung 28 Adjustierter täglicher Energieumsatz von *Fto*^{tm1b} Mäusen 46
Abbildung 29 Respiratorischen Austauschrate von *Fto*^{tm1b} Mäusen im zeitlichen Verlauf..... 47
Abbildung 30 Assimilierte Energie der *Fto*^{tm1b} Mäuse..... 48
Abbildung 31 Bewegungsaktivität in x-Richtung über 48 Stunden 49
Abbildung 32 Aufricht-Aktivität im zeitlichen Verlauf über 48 Stunden..... 50
Abbildung 33 Energieaufnahme von *Fto*^{tm1b} Mäusen im Futterwahlversuch 51
Abbildung 34 Körpergewichtsanstieg über 7 Wochen fettreicher Fütterung..... 52
Abbildung 35 Dermatitis homozygoter, fettreich gefütterter *Fto*^{tm1b} Mäuse 53

Abbildung 36 Histologie von Hautproben fettreich gefütterter Mäuse 53
Abbildung 37 Aktivität im Tagesdurchschnitt während der Umstellung auf ein fettreiche Diät 54
Abbildung 38 Leberhistologie von repräsentativen Gewebeschnitten..... 55

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Primer zur Genotypisierung:..... 13
Tabelle 2 Verwendete PCR-Protokolle zur Genotypisierung..... 13
Tabelle 3 Primer zum Ausschluss alternativer Spleißstellen 15
Tabelle 4 Verwendetes PCR-Protokoll zum Nachweis alternativer Transkripte in Fto^{tm1a} Mäusen..... 15
Tabelle 5 Verwendete Primer zur Quantifizierung muskelspezifischer Transkripte 16
Tabelle 6 Verwendetes qPCR-Protokoll 16
Tabelle 7 Verwendete Antikörper 17
Tabelle 8 Abfolge und Dauer der Schritte Gewebeinfiltrationsautomaten 19
Tabelle 9 Abfolge und Dauer der Schritte im Färbeautomaten 19
Tabelle 10 Vergleich von Energieaufnahme und Körperenergiezuwachs junger $Mc4r^{W16X}$ Mäuse 24
Tabelle 11 Phänotypische Auffälligkeiten der $Mc4r^{W16X}$ Mutanten im GMC-Screen 30
Tabelle 12 Wachstumsrate heranwachsender Fto^{tm1b} Mäuse im zweiten Wachstumsschub 40
Tabelle 13 Körpertemperatur und Energieaufnahme adulter Fto^{tm1b} Mäuse..... 47

ABKÜRZUNGS- UND FREMDWORTVERZEICHNIS

AGRP	*agouti-related peptide*; orexigenes Neuropeptid das in den NPY-Neuronen des *Nucleus arcuatus* produziert wird.
ANCOVA	*analysis of covariance*; Kovarianzanalyse
ANOVA	*analysis of variance*; Varianzanalyse
ARC	*Nucleus arcuatus*, Kerngebiet im Hypothalmus das vor allem an der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Wachstums beteiligt ist.
BMI	Body-Mass-Index, Maßzahl für die Bewertung des Körpergewichtes in Relation zum Quadrat der Körpergröße. BMI=kg*$(m^2)^{-1}$
browning	Vermehrte Bildung brauner Fettzellen im weißen Fettgewebe.
CCK	Cholecystokinin, Peptidhormon des Magen-Darm Trakts und Neurotransmitter, beteiligt an der Vermittlung von Sättigungssignalen.
d	*day*, Tag
DEE	*daily energy expenditure*, täglicher Energieumsatz [kJ/d]
Deleter-Linie	Mauslinie die eine Rekombinase (Cre, Flp o. a.) unter anderem in der Keimbahn exprimiert. Durch Rekombination der Erkennungssequenzen in der Keimbahn tragen alle Nachkommen mit erfolgreicher Rekombination einen *knockout* des Zielgens.
DIO	*diet-induced obesity*; diät-induzierte Adipositas
EE	*energy expenditure*, Energieumsatz
FDA	*feeding-drinking-activity*, Messanlage zur Analyse von Nahrungs- und Wasseraufnahme und gleichzeitiger Aufzeichnung der Bewegungsmuster.
FFM	fettfreie Masse
FM	Fettmasse
Fto/FTO	f*at mass and obesity associated* bzw. *alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase, Gen*- bzw. Proteinsymbol der N6-Methyladenosin Demethylase FTO.
Fto^{tm1a}	FTO-defiziente Mauslinie mit *knockout-first* Konstrukt
Fto^{tm1b}	FTO-defiziente Mauslinie mit *knockout* des 3. Exons und zusätzlicher Expression einer Reporterkassette.
GH	*growth hormone*, Wachstumshormon Somatotropin, Synthese im Hypothalamus
GHSR	*growth hormone secretagogue receptor*, Wachstumshormon Secretagogue Rezeptor, Rezeptor für das orexigene Peptidhormon Ghrelin, welches von der Magenschleimhaut und der Bauchspeicheldrüse sezerniert wird.
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
het	heterozygot
HFD	Hochfett Diät, fettreiche Fütterung
HP	*heat production*, Wärmeproduktion bzw. Energieumsatz
IGF	*insulin-like growth factor*, Somatomedin C bzw. insulinähnlicher Wachstumsfaktor, Synthese in der Leber und dem Muskel durch Stimulation mit Somatotropin.
ki	*knockin,* zielgerichtetes Einbringen neuer Nukleotide in eine Nukleinsäuresequenz. hier: Einfügen der Punktmutation W16X in den murinen Melanocortin 4 Rezeptor.

ko	*knockout,* zielgerichtetes Entfernen von Nukleotiden oder Genabschnitten aus einer Nukleinsäuresequenz oder Einbringen von irrelevanten Nukleinsäuresequenzen welche den Funktionsverlust des betroffenen Genes zur Folge haben. hier: Cre-vermittelte Deletion von Exon 3 des *Fto*-Gens.
ko^{1st}	*knockout-first*, Konstrukt der Internationalen *knockout*-Maus Konsortien welches nach Integration in die genomische Sequenz des Zielgens zum Funktionsverlust des Selben durch vorzeitigen Abbruch der Translation führt. Die vollständige genomische Sequenz des Zielgens bleibt erhalten.
LD	*linkage disequilibrium,* Von einem LD spricht man, wenn Allele unterschiedlicher Genloci häufiger oder seltener gemeinsam vererbt als dies durch Zufall möglich wäre.
MC4R	Melanocortin 4 Rezeptor, G-Protein gekoppelter Rezeptor der an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt ist.
MM	metabolisch aktive Körpermasse (fettfreie Masse + 0,2 * Fettmasse)
MYOD	Myogener Faktor 3, Transkriptionsfaktor der an der Myoblastendifferenzierung beteiligt ist.
NPY	Neuropeptid Y, orexigenes Neuropeptid, das unter anderem an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt ist.
NTS	*Nucleus tractus solitarii*, Kerngebiet in der *Medulla oblongata* des Stammhirns dass unter anderem mit dem *Nervus vagus* verbunden ist.
PCR	*polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
polyA	Polyadenylierung, posttranskriptionale Modifikation von mRNA die deren Stabilisierung dient.
POMC	Proopiomelanocortin, Protein und Prohormon, welches durch posttranslationale Modifikation durch Prohormonkonvertasen zu über 10 weiteren aktiven Peptidhormonen prozessiert werden kann.
PVN	*Nucleus paraventricularis*, Kerngebiet des Hypothalamus welches unter anderem von den Neuronen des ARC angesteuert wird und durch Projektionen in den NTS und die *Eminentia mediana* Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und den Energiehaushalt hat.
QTL	*quantitative trait locus*, Region eines quantitativen Merkmals, sie wird in Assoziationsstudien bestimmt und ist gekennzeichnet durch einen oder mehrere SNP der in Kombination mit einem bestimmten Merkmal häufiger auftritt als es durch Zufall möglich wäre (LD).
RER	*respiratory exchange ratio*, Respiratorische Austauschrate, Verhältnis zwischen CO_2-Produktion und O_2-Verbrauch. Die RER gibt Aufschluss über das verwendete Energiesubstrat eines Organismus.
RMR	*resting metabolic rate*, Ruhestoffwechselrate
RT	Raumtemperatur
SNP	*single nucleotide polymorphism*, Einzelnukleotid-Polymorphismus bei dem eine Base im Vergleich zu einer Referenz-Nukleotidsequenz verändert ist. Im Vergleich zu einer Punktmutation spricht man von einem Polymorphismus wenn sich die Basenveränderung erfolgreich in einer Population etabliert hat und häufig zu finden ist.
UTR	*untranslated region*, untranslatierter Bereich der mRNA der nicht für das Protein codiert.
VCO_2	Kohlendioxidproduktion [ml/h]

VO_2	Sauerstoffverbrauch [ml/h
W16X	Punktmutation des MC4R bei der es an Aminosäureposition 16 zum Austausch von Tryptophan durch ein Stoppkodon kommt, welches in einem funktionslosen MC4R resultiert.
wt	wildtypisch

ZUSAMMENFASSUNG

Die steigende Zahl adipöser Menschen wird zu einer immer größer werdenden Aufgabe für Gesellschaft, Forschung und Gesundheitssystem. Die Neigung zur Entwicklung eines adipösen Phänotyps wird zum einen durch den sesshaften Lebensstil der Bevölkerung in Industrieländern begünstigt. Zum anderen beeinflusst eine genetische Prädisposition die Verwertbarkeit der aufgenommenen Nahrung oder Komponenten des Energiehaushaltes. Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei Mauslinien mit gentechnischen Veränderungen in Kandidatengenen für Adipositas untersucht. Ziel war es, den Einfluss dieser Gene auf den Energiehaushalt und deren Rolle bei der Entwicklung von Übergewicht zu analysieren.

Das erste untersuchte Modell war eine *knockin* Mauslinie mit einer Punktmutation im Melanocortin 4 Rezeptor (*Mc4r*^{W16X}) (Bolze et al., 2013). Der Leptin-Melanocortin-Signalweg ist eine zentrale Komponente in der Regulation der Nahrungsaufnahme. Defekte in diesem Signalweg sind mit einem adipösen Phänotyp verbunden. Die Mauslinie wurde während des Heranwachsens engmaschig untersucht und es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Futteraufnahme ursächlich für die Entwicklung des adipösen Phänotyps im untersuchten Entwicklungsfenster war. Zusätzlich zum Anstieg des Körpergewichtes wurde gegen Ende des Untersuchungszeitraums eine erhöhte Stoffwechselrate gemessen. Eine ergänzende Untersuchung der Mauslinie an der Deutschen Mausklinik (GMC) deckte einige weitere Merkmale der Mauslinie auf, die sich unabhängig vom adipösen Phänotyp, durch den defekten MC4R entwickeln. Hierzu zählte unter anderem ein ängstlicherer Phänotyp, erhöhte Steroidspiegel, sowie genotypspezifische Unterschiede in der Atemgasanalyse (Kistler et al., 2016). Aus den eigenen Untersuchungen lässt sich schließen, dass für die Entwicklung des adipösen Phänotyps zuerst Unterschiede in der Energieaufnahme beobachtet wurden, welche zu einem Anstieg des Körpergewichtes führten und im weiteren Verlauf Auswirkungen auf den Energieumsatz hatten.

Das *fat mass and obesity associated* (*Fto*) Protein ist eine Demethylase für einsträngige Nukleinsäureketten und nimmt vermutlich Einfluss auf die weitere Prozessierung von Transkripten. Polymorphismen im humanen *FTO*-Lokus sind mit einem erhöhten BMI assoziiert, der Zusammenhang zwischen den identifizierten *FTO*-Polymorphismen und der Neigung zu Adipositas ist bisher weitestgehend unklar. Zum Kandidatengen *Fto* wurden zwei Mauslinien untersucht. Die *knockout-first* Mauslinie *Fto*^{tm1a}, bei der eine Genfalle in das *Fto*-Gen eingefügt wurde, sowie die daraus hervor gegangene *knockout* Mauslinie *Fto*^{tm1b}. Es konnte gezeigt werden, dass die eingefügte Genfalle in der Mauslinie *Fto*^{tm1a} nicht zum gewünschten *knockout* führte, sondern reduzierte Spiegel an FTO produziert wurden. Das Modell ist zur Untersuchung eines FTO-*knockouts* in der Maus somit ungeeignet. In der Mauslinie *Fto*^{tm1b} wurde durch Cre-vermittelte Rekombination Exon 3 des Fto-Gens deletiert, welches eine Verschiebung des Leserasters und ein stak verkürztes Protein zur Folge hatte. Diese Mauslinie spiegelte im Wesentlichen den bereits publizierten kleinwüchsigen Phänotyp anderer Mausmodelle mit FTO-Defizienz wieder. Zusätzlich hatten diese Mäuse eine verringerte fettfreie Masse, einen erhöhten Energieumsatz und ein ängstlicheres Verhalten als ihre wildtypischen Wurfgeschwister. Die beobachteten Phänotypen waren vermutlich Folge des Funktionsverlustes von FTO. Fehlende Demethylierung von Transkripten resultierte in veränderter Prozessierung, die resultierenden Proteine nahmen wiederum auf unterschiedlichen Ebenen Einfluss auf den Energiehaushalt.

SUMMARY

The increasing number of obese patients is a burden for the society and the health system and it challenges research to counteract this development. The changes are caused by riskfactors such as a sedentary lifestyle of the people mainly in industrial countries and genetic predisposition. They influence usability of nutrients but also components of the energy balance. In the context of this thesis three mouse strains were analysed, that carried genetic modifications in candidate genes for obesity with the aim to analyse the influence of the mutated genes on energy balance and their role in the development of overweight and obesity.

The first model was a knockin mouse strain that carries a point mutation in the melanocortin 4 receptor gene (*Mc4r*^{W16X}) (Bolze et al., 2013). The leptin-melanocortin-signaling pathway is a central component in the regulation of food intake. Defects in this pathway are associated with an obese phenotype. The mice were monitored frequently during the second growth spurt and we could show, that the development of an obese phenotype during this time window was caused by an increased food consumption. In addition we observed an increased metabolic rate at the end of the investigation period. An additional analysis of the mice at the German Mouse Clinic revealed the *Mc4r*^{W16X} mice develop some more characteristics that are independent of the obese phenotype caused by the mutated MC4R. We observed increased anxiety and steroid levels as well as genotype specific differences in breath gas analysis (Kistler et al., 2016). From the own results we conclude that the development of obesity in young *Mc4r*^{W16X} mice is mainly caused by an increased energy consumption, which lead to an increase in body mass followed by changes in energy expenditure over time.

The fat mass and obesity associated (*Fto*) protein is a demethylase for single stranded nucleic acid chains and thereby influences the further processing of transcripts. Polymorphisms in the human *FTO*-locus are associated with an increased BMI, the correlation between the identified polymorphisms and the susceptibility for obesity are more or less unknown. For the candidate gene *Fto* two mouse strains were analysed. First the knockout-first strain *Fto*^{tm1a}, which carries a gene trap in the *Fto*-locus, followed by the resulting knockout strain *Fto*^{tm1b}. We could show that the gene trap did not lead to a *knockout* in *Fto*^{tm1a}, instead mice had reduced levels of FTO. Therefore this is not a suitable model to study a knockout of FTO. The mouse strain *Fto*^{tm1b} was generated by Cre-recombinase mediated deletion of exon 3 in the *Fto* gene, which resulted in a shift of the open reading frame and a truncated protein. This mouse strain reflects the growth retarded phenotype of published FTO-knockout models. In addition we observed a reduced lean mass and an increased energy expenditure in the mice as well as an anxious behaviour in knockout mice compared to their wildtype littermates. Presumably the observed phenotypes where a result of the loss of function of FTO. Lacking demethylation of transcripts lead to changes in transcript processing and defective protein function which thereby affected energy balance regulation and other metabolic pathways.

1 EINLEITUNG

1.1 ADIPOSITAS

Die heutige westliche Gesellschaft ist von einem sesshaften und schnelllebigen Lebensstil geprägt. Sowohl die tägliche Arbeit als auch die Fortbewegungsgewohnheiten der Bevölkerung in Industrieländern sind zunehmend mit reduzierter körperlicher Anstrengung verbunden und somit einem geringeren Energieumsatz. Dem steht ein Überangebot an schmackhafter und energiereicher Nahrung gegenüber. In Folge eines daraus resultierenden Ungleichgewichtes der Energiebilanz nimmt die Zahl übergewichtiger und fettleibiger Menschen stetig zu. Seit 1980 hat sich weltweit die Zahl der Fettleibigen laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*; WHO) verdoppelt (Finucane et al., 2011), die Tendenz ist weiterhin steigend. Als Maß für die Unterscheidung zwischen Normalgewicht, Übergewicht und Fettleibigkeit (Adipositas) wird der sogenannte *body-mass-index* (BMI) verwendet. Die WHO definiert Übergewicht als BMI ≥ 25 kg/m^2 und bei einem BMI ≥ 30 kg/m^2 spricht man von Adipositas. Neben ästhetischen Gesichtspunkten und möglicher psychischer Belastung für die Betroffenen ist Adipositas vor allem Risikofaktor für die Entwicklung weiterer Erkrankungen, allen voran Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes und Krebs (Jung, 1997). Leidet ein Patient neben Adipositas zusätzlich an Bluthochdruck, erhöhten Blutfett- und Blutzuckerwerten bzw. einer gestörten Glukosetoleranz, so spricht man vom Metabolischen Syndrom. Durch diesen Zusammenhang von Adipositas und damit assoziierenden Folgeerkrankungen ist das Mortalitätsrisiko adipöser Patienten erhöht und zusätzlich wird das Gesundheitssystem durch notwendige Folgebehandlungen mehr belastet und sowie.

1.2 KOMPONENTEN DES ENERGIEHAUSHALTES

Eine Körpergewichtszunahme resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieumsatz, einer sogenannten positiven Energiebilanz. Sind beide in einem Gleichgewicht, bleiben auch Körpergewicht und -zusammensetzung eines Organismus stabil. Ein gesunder Erwachsener ist in der Lage, kurzzeitige Änderungen in der Energieaufnahme sehr gut zu kompensieren, ohne dass sich das Körpergewicht verändert. Eine dauerhaft positive Energiebilanz ist dahingegen unweigerlich mit der Entstehung von Übergewicht und Adipositas verknüpft, vielschichtig im Ursprung und stark von der individuellen, genetischen Prädisposition beeinflusst.

In Ruhe und in thermoneutraler Umgebung ist der Grundumsatz die größte Komponente, die zum Energieumsatz beiträgt. Dieser dient der Aufrechterhaltung der Grundfunktionen eines Organismus. Hinzu kommen weitere energieverbrauchende Komponenten wie Reproduktion, Wachstum, Thermogenese oder Aktivität. Die meisten Komponenten der Energiebilanz sind in der Labormaus mit unterschiedlichen Methoden messbar. Energieaufnahme über die Nahrung, ausgeschiedene Energie und daraus abgeleitet, die im Körper verbleibende metabolisierbare Energie (E_{met}), können durch einfache, direkte kalorimetrische Methoden bestimmt werden. Auch Körpertemperatur, Körpergewicht und Körperzusammensetzung sind Parameter mit denen ein Ungleichgewicht in der Energiebilanz leicht untersucht werden kann. Die Komponenten des Energieumsatzes werden dagegen über indirekte Kalorimetrie erfasst. Der tägliche Energieumsatz (*daily energy expenditure*; DEE) umfasst sowohl den Grundumsatz als auch alle anderen energieverbrauchenden Prozesse. Es wird dabei nicht die Wärme-/Energieabgabe direkt gemessen, sondern über Sauerstoffverbrauch (VO_2) und Kohlendioxidproduktion (VCO_2) indirekt berechnet. Dabei wird die Grundvermutung zugrunde gelegt,

dass alle energieverbrauchenden Prozesse im Organismus durch Oxidation der Makronährstoffe zu Kohlendioxid und Wasser ablaufen (Ferrannini, 1988). Zusätzlich lässt sich durch den Quotienten aus VCO_2/VO_2 die respiratorischen Austauschrate (*respiratory exchange ratio*; RER) berechnen, welche wiederum Rückschlüsse auf die verstoffwechselten Makronährstoffe zulässt.

1.3 REGULATION DER ENERGIEAUFNAHME

Die Energieaufnahme dagegen ist das Gegengewicht zum Energieumsatz. Sie wird durch ein enges Zusammenspiel von Signalen aus der Peripherie und zentralnervösen Arealen reguliert. Hierzu zählt nicht nur Start und Ende einer Mahlzeit, sondern auch Mahlzeitgröße und deren Verwertung. Die Regulation der Energieaufnahme ist demnach ein komplexer Prozess, der hauptsächlich in zentralnervösen Arealen wie dem Hypothalamus erfolgt. Während Beginn und Termination einer Mahlzeit vorwiegend über die Darmhormone Ghrelin, Cholecystokinin (CCK), Peptid YY (PYY) und Glucagon-like Peptid (GLP1) gesteuert werden, wird der eigentliche Energiebedarf über die zirkulierenden Hormone Insulin und Leptin reguliert (Morton et al., 2014). Neben humoralen Informationen werden im Hypothalamus zusätzlich Signale aus anderen Hirnarealen integriert und so zusätzlich die Regulation des Energiehaushalts im zentralen Nervensystem beeinflusst. Dies sind Informationen über Umweltfaktoren wie Photoperiode oder Umgebungstemperatur (Barsh und Schwartz, 2002).

Der Hypothalamus erhält durch die Peptidhormone Insulin und Leptin u.a. Informationen darüber, inwieweit periphere Energiespeicher wie das weiße Fettgewebe gefüllt sind. Insulin wird in den β-Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet und reguliert im Wesentlichen den Zuckerhaushalt. Leptin dagegen ist ein Hormon des Fettgewebes. Die im Blut zirkulierende Leptin-Menge ist abhängig von der Größe der Fettdepots (Maffei et al., 1995; Morton et al., 2014). Für eine normale Glukosehomöostase ist ein Zusammenspiel beider Hormone und deren Signalvermittlung nötig (Hill et al., 2010). Im Hypothalamus stimuliert Leptin Neuronen im Kerngebiet des *Nucleus arcuatus* (ARC), die das Protein Pro-Opiomelanocortin (POMC) exprimierten und posttranslational modifizieren, u. a. zu Melanocortin-Peptiden (α-, β- und γ-Melanozytenstimulierendes Hormon; MSH). Vor allem die Ausschüttung von α-MSH stimuliert in Neuronen des *Nucleus paraventrucularis* (PVN) den Melanocortin 4 Rezeptor (MC4R), welcher wiederum weitere Signalwege aktiviert die zur Reduktion der Nahrungsaufnahme führen. Zusätzlich wird bei geringem Füllstand der Fettspeicher das Sättigungsempfinden reduziert, um über eine gesteigerte Nahrungsaufnahme und einen verminderten Energieumsatz die Energiereserven wieder aufzufüllen. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus wird hauptsächlich durch das Stammhirn vermittelt. Vom Fettgewebe sezerniertes Leptin sensibilisiert hier im *Nucleus tractus solitarii* (NTS) die Neurone für die Sättigungshormone des Darmes (siehe Abbildung 1) (Morton et al., 2014).

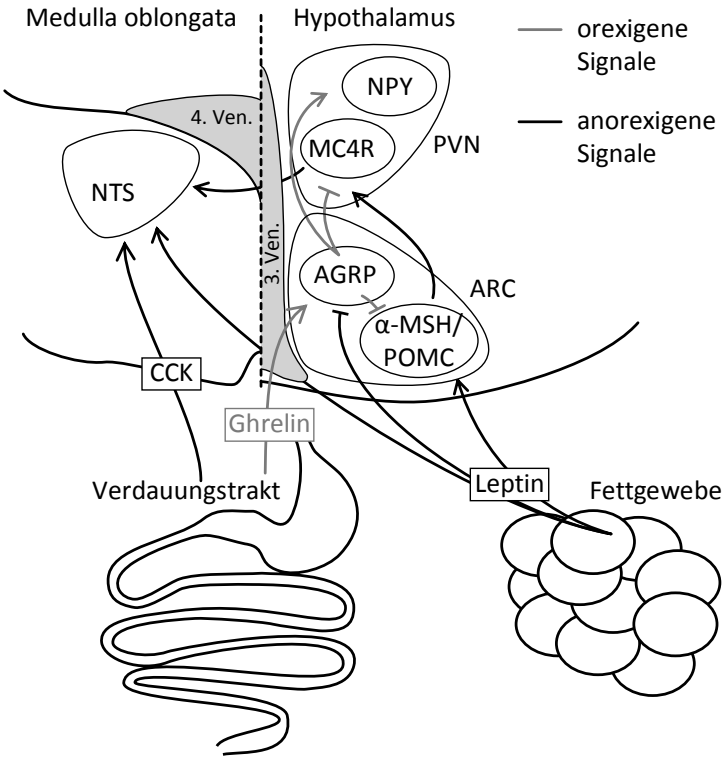

Abbildung 1 Langzeit- und Kurzzeit-Sättigungssignale zur Regulation der Nahrungsaufnahme
Signalverarbeitung und Weiterleitung der Kurzzeitsignale Ghrelin (Hungerhormon)und Cholecystokinin (CCK) sowie des Langzeitsignals Leptin in der Regulation der Nahrungsaufnahme. Leptin gilt als direkter Marker für die Energiereserven des Körpers, da es proportional zur Größe der Fettdepots ausgeschüttet wird. Das Hungerhormon Ghrelin initiiert den Beginn einer Mahlzeit und CCK sorgt für dessen Termination. Der Hypothalamus sorgt für die langfristige Regulation des Energiehaushaushaltes, während die Medulla oblongata im Stammhirn über die direkte Nähe zum Nervus vagus für die kurzfristige Regulation verantwortlich ist. ARC: *Nucleus arcuatus*; PVN: *Nucleus paraventricularis*, NTS: *Nucleus tractus solitarii*; AGRP: Agouti-related Peptid; POMC: Proopiomelanocortin; MSH: Melanocyten stimulierendes Hormon; MC4R: Melanocortin 4 Rezeptor; NPY: Neuropeptid Y; 3./4. Ven.: 3. bzw. 4. Hirnventrikel

Gegenspieler der anorexigenen Leptin-Signale sind das orexigene Agouti-related Peptid (AGRP) sowie das Hungerhormon Ghrelin. Die AGRP-Neurone sind ebenfalls im ARC lokalisiert. Sie werden durch Ghrelin über den Wachstumshormon Secretagogue Rezeptor (GHSR) aktiviert, der vermutlich ein Heterodimer mit dem MC3R bildet (Rediger et al., 2012). Auf den MC4R sowie POMC-Neurone wirkt AGRP inhibierend, gleichzeitig aber aktiviert es Neuropeptid Y Neurone (NPY), welches wiederum die Nahrungsaufnahme anregt. Sind die Leptinspiegel im Blut hoch, inhibieren diese die orexigenen AGRP Neurone und aktivieren zusätzlich zu den POMC Neuronen des ARC eine Neuronenpopulation im NTS des Stammhirns. Die Neurone des NTS liegen in unmittelbarer Nähe zum *Nervus vagus* und regulieren vermutlich die Mahlzeitengröße, deren genaue Funktion ist noch nicht vollständig geklärt.

1.4 GENETISCH BEDINGTE ADIPOSITAS

Die Verwertbarkeit von Makronährstoffen oder die Einlagerung überschüssiger Energie kann durch genetische Prädisposition beeinflusst werden (Dokas et al., 2013). Welche Rolle Gene bei der Entwicklung von Adipositas spielen, wird vor allem durch Zwillingsstudien deutlich (Wardle et al., 2008). Hier zeigt sich, dass 50-90% der Variation im BMI eine genetische Ursache haben (Maes et al., 1997) und sowohl die Neigung zur Gewichtszunahme, als auch zum Gewichtsverlust vererbt werden

(Bouchard et al., 1996; Bouchard et al., 1990). Diese Studien zeigen allerdings auch, dass eine negative Energiebilanz unter einer stärkeren biologischen Kontrolle steht als eine positive Energiebilanz.

Mutationen in Genen die an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind (Leptin, *POMC, MC4R*) sind beim Menschen mit schwerwiegender Adipositas verbunden, die sich meist bereits im Kindesalter manifestiert (Farooqi et al., 2003; Farooqi et al., 2007; Krude et al., 1998; Montague et al., 1997). In all diesen Fällen begünstigt der Defekt eines einzelnen Gens die Entwicklung der Fettleibigkeit, man spricht aus diesem Grund von sogenannter monogener Adipositas. In etwa 30% der Fälle sind Mutationen im Leptin-Melanocortin-Signalweg oder nachfolgender Kaskaden die Ursache für monogene Adipositas (Saeed et al., 2015). Dabei sind Mutationen im *MC4R* Gen am Häufigsten zu finden (Farooqi et al., 2000; Hinney et al., 2013).

Monogen bedingte Adipositas ist selten. Nur 3-5% der adipösen Bevölkerung leidet an einer solchen Form der Adipositas (Farooqi und O'Rahilly, 2008; Froguel und Blakemore, 2008). Viel häufiger sind Genvarianten zu finden, die einen kleinen Effekt auf das Körpergewicht bewirken (0,5-1 kg/m^2) und deren Effekte sich in der Summe addieren. Man spricht in diesem Fall von polygener Adipositas. Wegen der geringen Effekte dieser Genvarianten auf den BMI werden genomweite Assoziationsstudien (GWAS) genutzt um Genvarianten zu identifizieren, die beispielsweise mit einem erhöhten BMI korrelieren. Untersucht werden Polymorphismen einzelner Nukleotide (*single nucleotide polymorphisms*; SNP) und deren Häufigkeit bzw. Assoziation mit dem gewählten Merkmal. Tritt ein SNP bei Trägern des dieses Merkmals innerhalb der untersuchten Population gehäuft auf, spricht man von einer Assoziation des SNP mit dem zuvor gewählten Phänotyp. Die untersuchten SNPs liegen oft in nichtkodierenden Bereichen wie Introns oder regulatorischen Regionen. Die ersten Genvarianten für die eine Assoziation mit dem BMI beschrieben wurden, waren SNPs in den Genen für *MC4R* und *fat mass and obesity associated* (*FTO)* (Chambers et al., 2008; Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007; Loos et al., 2008; Scuteri et al., 2007). Im Laufe der Jahre wurden diese Loci bestätigt und durch immer größere Kohorten und Metaanalysen weitere neue Loci identifiziert (Locke et al., 2015; Speliotes et al., 2010; Willer et al., 2009).

1.5 KANDIDATENGENE FÜR ADIPOSITAS

1.5.1 Melanocortin 4 Rezeptor - *Mc4r*

Auf Grund seiner Bedeutung für die Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energieumsatzes ist der MC4R sehr gut charakterisiert (Tao, 2010). Der MC4R wird von einem 1-Exon-Gen codiert und hat 332 Aminosäuren. Die höchste Bindungsaffinität seiner natürlichen Liganden besitzt β-MSH, gefolgt von α-MSH. Die klassische Signalweiterleitung erfolgt über einen G_s-Protein gekoppelten Rezeptor der nur als Dimer seine volle Funktionalität hat (Rediger et al., 2012). Die Bindung eines Liganden führt zu einer erhöhten cAMP Produktion und Aktivierung der Proteinkinase A, aber auch G_q- und $G_{i/o}$-Protein gekoppelte Signalweiterleitungen wurden für den MC4R beschrieben (Tao, 2010). Zur Gruppe der Melanocortin-Rezeptoren gehören vier weitere Rezeptoren (MC1R - MC5R). Sie sind im ganzen Körper verteilt und erfüllen verschiedenste Aufgaben. An der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt und im Gehirn exprimiert sind nur MC3R und MC4R (Begriche et al., 2011). Die Rolle des MC3R ist nicht vollständig geklärt, eventuell steuert er einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf den MC4R (Butler et al., 2017), unter Umständen erfolgt dies durch ein Heterodimer des MC3R mit dem GHSR (Rediger et al., 2012). Der teilweise oder vollständige Funktionsverlust des MC4R führt sowohl beim

Menschen, als auch bei anderen Säugetieren zu einem adipösen Phänotyp, Hyperphagie und verstärktem Längenwachstum (Bolze et al., 2013; Farooqi et al., 2003; Huszar et al., 1997).

Mutationen und Variationen im MC4R-Gen sind eine der häufigsten Ursachen für monogen bedingte Adipositas (Farooqi et al., 2000; Hinney et al., 2013). Die Art der Mutationen ist vielgestaltig, so sind für 105 der 332 Aminosäuren des Rezeptors Veränderungen bekannt (Tao, 2010). Nicht alle Veränderungen des MC4R führen zu einem adipösen Phänotyp. Die Mutation $MC4R^{V103I}$ beispielsweise ist negativ mit Adipositas assoziiert (Geller et al., 2004). Die Mutation $MC4R^{W16X}$ wurde erstmals für den humanen MC4R beschrieben (Marti et al., 2003). Die Stoppmutation $MC4R^{W16X}$ führt zu einem frühzeitigen Stopp-Codon an Aminosäureposition 16, wodurch die Translation frühzeitig abgebrochen wird und kein funktionsfähiges MC4R-Protein gebildet wird. Die entsprechende Mauslinie $Mc4r^{W16X}$ entwickelt einen adipösen Phänotyp, wie er auch für *Mc4r knockout* Mauslinien beschrieben ist (Bolze et al., 2013). Die Mauslinie $Mc4r^{W16X}$ wurde im Hinblick auf die Therapie von Erkrankungen hergestellt, die durch den Funktionsverlust eines Proteins durch frühzeitige Stoppmutationen gekennzeichnet sind. Hierzu zählen beispielsweise Muskeldystrophie oder zystische Fibrose. Der Therapieansatz beruht auf dem Einsatz von Nonsens-Supressoren und wurde bereits sowohl in Zellkultur, als auch im Mausmodell erforscht (Bolze et al., 2013). Ein weiteres Mausmodell für Adipositas, das eine Stoppmutation im Leptin Gen trägt ist Lep^{R105X}, die weit verbreitete ob/ob-Maus (Zhang et al., 1994).

1.5.2 Fat mass and obesity associated - *Fto*

Das Produkt des *fat mass and obesity associated* Gens (*Fto*) wurde erstmals unter der Bezeichnung FATSO beschrieben (Peters et al., 1999). Es ist ubiquitär exprimiert und mit 502 Aminosäuren ein sehr großes Protein. Gefunden wurde es in der Mauslinie *Fused toes (Ft)*, bei der durch Transgen-Integrations-Mutagenese 1,6 Megabasen des Chromosoms 8 deletiert wurden (Peters et al., 2002). Das mit über 400 Kilobasen größte getroffene Gen wurde *Fatso* genannt. Neben Fatso/*Fto* wurden in der Mauslinie *Ft* die Gene Fantom (*Ftm*) und *Fts* sowie das komplette Iroquios B Gencluster deletiert. In GWAS zu Diabetes und erhöhtem BMI wurde etwas später für SNPs im ersten der neun Introns des Gens eine Assoziation beschrieben (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007; Scuteri et al., 2007). In Folge dessen wurde das Gen von *Fatso* zu *fat mass and obesity associated* umbenannt, da die Funktion des Proteins zwar weiterhin unklar war, nun aber eine Verbindung zu einem Krankheitsbild bestand. Die stärksten genomweiten Assoziationssignale liegen in den Introns 1 und 2 des Gens (Region des quantitativen Merkmals; QTL) und stehen in einem großen *Linkage Disequilibrium* (LD) (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007). Aus diesem Grund ist es sehr schwer zu sagen, welche Mutationen innerhalb des QTL ausschlaggebend für die Assoziation mit dem BMI in den GWAS ist. Meist liegen SNPs in nicht kodierenden Bereichen wie Introns oder regulatorischen Bereichen wie dem Promotor. Somit kann nicht immer davon ausgegangen werden, dass das nächstgelegene Gen ausschlaggebend für den beobachteten Phänotyp ist. Die Gen-Regulation durch Transkriptionsfaktoren kann entweder die Transkription aktivieren (Aktivator) oder hemmen (Repressor). Im Fall von *FTO* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch den SNP rs1421085 (T zu C) ein konserviertes Bindungsmotiv für den Repressor des Proteins AT-reiche interaktive Domäne 5B (ARID5B) zerstört wird. Somit beeinflusst ein SNP im *FTO*-Gen die Expression von *ARID5B*. Durch die fehlende transkriptionelle Regulation durch den *ARID5B*-Repressor kommt es so zur vermehrten Expression von *ARID5B*. In der frühen Adipozyten-Differenzierung hat dies zur Folge, dass sich Fettzellen nicht in energieverbrauchende, Beige Fettzellen (Braune Fettzelle im Weißen Fettgewebe), sondern zu

energiespeichernden Weiße Fettzellen entwickeln (Claussnitzer et al., 2015). Diese Publikation hat gezeigt, dass womöglich nicht nur die Genexpression und Funktion von *FTO* für die Assoziation der SNPs innerhalb des QTL mit dem BMI ursächlich sind, sondern auch eine veränderte Expression und Regulation anderer Gene innerhalb dieses Genclusters. *FTO* kodiert für eine Demethylase mit hoher Substrataffinität zu N^6-Methyladenosin, wodurch die oxidative Demethylierung von einsträngiger DNA und RNA vermittelt wird (Gerken et al., 2007; Jia et al., 2011; Jia et al., 2008). Methylierung zählt neben Histonmodifikationen und MikroRNAs zu den epigenetischen Regulationsmechanismen, die Stabilität, Transkription und Spleißen von DNA bzw. RNA beeinflussen.

Die SNPs in den ersten beiden Introns von FTO sind somit zwar unter anderem mit dem BMI assoziiert, in welchem mechanistischen Kontext die Demethylaseaktivität von FTO zu physiologischen Zuständen steht oder ob es die veränderte Expression anderer Gene ist die durch die SNPs reguliert wird, ist bisher noch nicht aufgeklärt. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Funktion von FTO und der Entstehung körpergewichtsassoziierter Phänotypen ist dagegen bereits belegt. So führt ein Funktionsverlust von FTO bei Mensch oder Maus zu einem kleinwüchsigen Phänotyp, erhöhter postnataler Sterblichkeit, verringerter Muskelmasse und verringerter Fettmasse (Boissel et al., 2009; Church et al., 2009; Fischer et al., 2009; Gao et al., 2010), während Überexpression von *Fto* in der Maus einen adipösen Phänotyp zur Folge hat (Church et al., 2010). Bislang wurde der Einfluss eines *knockouts* auf die Hauptkomponenten des Energiehaushaltes, Nahrungsaufnahme und Energieumsatz, untersucht. Neue Erkenntnisse zeigen, dass FTO eine Rolle bei der Differenzierung von Myoblasten spielt (Wang et al., 2017). Der induzierte *knockout* von *Fto* in heranwachsenden Mäusen stützt diese Hypothese zusätzlich, da hier ein verringertes Muskelwachstum ohne den kleinwüchsigen Phänotyp zu beobachten ist (McMurray et al., 2013). Auch für die Proliferation und Differenzierung anderer Zelltypen wie z. B. neuronaler Stammzellen, scheint FTO eine wichtige Rolle zu spielen (Li et al., 2017).

1.6 ZIELE UND FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Genomweite Assoziationsstudien sind die Grundlage um neue Kandidatengene für Adipositas zu identifizieren und in deren Folge neue Behandlungsansätze zur Bekämpfung von Adipositas und deren Folgekrankheiten zu finden. Die Arbeit wurde im Rahmen des Nationalen Genomforschungsnetzwerks $NGFN^{plus}$ – IG Molekulare Mechanismen der Adipositas durchgeführt. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung dreier Mausmodelle, die jeweils durch gentechnische Veränderung in Kandidatengenen für Adipositas ein funktionsloses Protein exprimieren. Die Untersuchung umfasst den Einfluss der jeweiligen Mutation auf den Energiehaushalt. Bei den Mausmodellen handelt es sich zum einen um ein *knockin* Mausmodell mit einer Punktmutation im *Mc4r*-Gen ($Mc4r^{W16X}$). Durch die Punktmutation wird kein funktionsfähiger MC4R mehr gebildet, und es kommt zur Ausprägung eines adipösen Phänotyps. Das Modell wird in der vorliegenden Arbeit als Beispiel für monogen bedingte Adipositas verwendet. Der Fokus der vorliegenden Arbeit soll auf der Untersuchung und Charakterisierung des Energiehaushaltes im Jugendalter der Mäuse liegen, bevor sich der adipöse Phänotyp manifestiert. Es soll weiter geklärt werden, welchen Einfluss der Energieumsatz junger MC4R-defizienter Mäuse auf die Entwicklung des adipösen Phänotyps hat. Darüber hinaus wurde der Phänotyp dieses Mausmodells, im Kontext des NGFN, im Primärscreen der Deutschen Mausklinik (German Mouse Clinic; GMC) sowie im Sekundärscreen des metabolischen Labors an der GMC eingehend charakterisiert (Kistler et al., 2016).

Zur Untersuchung eines Kandidatengens für polygene Adipositas wurde *Fto* gewählt. Zu Beginn dieser Arbeit war die Rolle von FTO, die zu einer starken Assoziation der SNPs im *FTO*-Gen mit Adipositas geführt hat noch weitgehend unklar. Untersucht wurden zwei Mauslinien. Bei der einen handelte es sich um ein Modell das zum *knockdown* von *Fto* führte. Zum anderen wurde eine *knockout*-Mauslinie für *Fto* untersucht. Die eingehende metabolische Charakterisierung fand hauptsächlich mit dem *knockout* Modell statt. Ziel war es, den Einfluss des *knockouts* auf die einzelnen Komponenten der Energiebalance zu untersuchen und die Mauslinien grundlegend zu charakterisieren, um die Rolle von FTO auf die Entwicklung von Adipositas besser zu verstehen. Des Weiteren bilden diese Mausmodelle sowie deren Untersuchungen die Grundlage für weitere, organspezifische und induzierbare *knockouts*, zur weiteren Charakterisierung von FTO und dessen Einfluss auf den Energiehaushalt.

Mit der Untersuchung und metabolischen Charakterisierung der hier vorgestellten Mauslinien soll ein weiterer Beitrag dazu geleistet werden, die komplexen Regulationsmechanismen, die der Entwicklung von Adipositas und damit assoziierten Folgeerkrankungen zugrunde liegen besser zu verstehen und in der Folge Angriffspunkte für neue Therapieansätze zu finden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MAUSZUCHT UND VERSUCHSTIERE

Die basale Phänotypisierung zum Einfluss von *fat mass and obesity associated (Fto)* auf den Stoffwechsel wurde an den Mauslinien *Fto*$^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ (*Fto*^{tm1a}) und *Fto*^{tm1b} durchgeführt. Beide Mauslinien hatten einen C57BL/6N Hintergrund. Der Stamm *Fto*^{tm1b} wurde aus einer Kreuzung der Mausstämme *Fto*^{tm1a} und C57BL/6NTac-Gt(ROSA)26Sor$^{tm16(cre)Arte}$ (Cre-*deleter*) generiert (vgl. Abbildung 3).

Der Einfluss des Melanocortin 4 Rezeptors (*Mc4r*) auf den Energieumsatz wurde am Mausmodell *Mc4r*$^{tm1.1Fbz}$ (*Mc4r*^{W16X}) (Bolze et al., 2013) untersucht. Bei dieser Mauslinie kommt es durch eine Punktmutation an Aminosäureposition 16 zur Austausch eines Tryptophan gegen ein Stopcodon, wodurch kein funktionsfähiger Rezeptor mehr gebildet werden kann. Der Phänotyp der Mauslinie ähnelt demnach dem der klassischen *knockout* Modelle. Die Messungen von Energieumsatz und Energieaufnahme erfolgten in unterschiedlichen Kohorten der vierten Rückkreuzungsgeneration auf C57BL/6J (N4). Für die Analysen im Primärscreen der Deutschen Mausklinik (GMC) fand eine weitere Rückkreuzung bis zur Generation N6 statt.

2.1.1 Haltungsbedingungen

Alle Versuche wurden in der institutseigenen spezifiziert pathogenfreien Maushaltung, des Kleintierforschungszentrums Weihenstephan durchgeführt. Hier erfolgten Zucht und Aufzucht aller Mäuse in individuell ventilierten Käfigen (Sealsafe plus Maus Greenline, TECNIPLAST S.p.A, Buguggiate (VA); Italien) unter Standardhaltungsbedingungen (22°C, 50-65% rH, 12h Licht-Dunkel-Wechsel). Der Käfigwechsel erfolgte wöchentlich. Alle Jungtiere wurde im Alter von 21±1 Tagen abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt in Kleingruppen von bis zu fünf Tieren gehalten, sofern nicht anders beschrieben. Homozygote *Fto*^{tm1b} Mäuse wurden wegen stark verminderter Körpergröße bis zu zwei Wochen länger bei den Elterntieren belassen und zusätzlich mit aufgeweichtem, pulverisiertem Haltungsfutter gefüttert.

Eine Kohorte *Fto*^{tm1b} Mäuse wurde zur Verbesserung der Zuchtausbeute bei Thermoneutralität gezüchtet. Die Haltung erfolgte bei 30 °C in modifizierten Wärmeschränken (HPP749, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach) in offenen Makrolonkäfigen des Typ II. Die Luftfeuchtigkeit im Schrank wurde konstant auf 55 % rH reguliert, die Luftwechselrate des Wärmeschrankes war so eingestellt, dass ein etwa 8-facher Luftwechsel pro Stunde erfolgte. Ab dem Absetzen wurden diese Mäuse ebenfalls in einzelbelüfteten Käfigen bei Raumtemperatur gehalten.

In der Haltung und allen Versuchen stand den Mäusen die Standardhaltungsdiät (M-Z autoklavierbar V1124-3, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) sowie Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Für Versuche mit fettreicher Fütterung wurde gammabestrahltes Experimentalfutter mit Palmöl und Sojaöl als Fettquelle verwendet (48 kJ% Fett; S5745-E712, Ssniff), die Futterumstellung erfolgte im Alter von 20 Wochen als Wahlversuch während der Aktivitätsmessung in der FDA (siehe 2.2.7).

2.2 *IN VIVO* UNTERSUCHUNGEN

2.2.1 Föten

Zur Zyklussynchronisation wurden heterozygote Weibchen für mindestens eine Woche in Großgruppen zu mindestens 5 Mäusen gehalten (Lee-Boot Effekt) (Ma et al., 1998). Am Ende dieser Synchronisationsphase wurde Einstreu eines Männchens in den Käfig gestreut, um das synchrone Einsetzen des Zyklus zu stimulieren (Whitten-Effekt) (Gangrade und Dominic, 1983). Drei Tage nach Stimulation wurden maximal zwei Weibchen mit einem ebenfalls heterozygoten Männchen verpaart, das zuvor für mindestens eine Woche einzeln gehalten wurde. In der darauffolgenden Nacht fand der Deckakt statt und am nächsten Morgen wurden die Weibchen wieder in Kleingruppen von maximal drei Mäusen zusammengesetzt. Bei sichtbarer Trächtigkeit wurden die Weibchen am 19. Tag der Embryonalentwicklung (E18,5) per Genickbruch getötet, die Föten einzeln aus den Uterushörnern entnommen und sofort mit einer Feinwaage gewogen. Anschließend wurde Teile des Schwanzes zur Genotypisierung verwendet. Die Tötung der Föten erfolgte durch Dekapitation.

2.2.2 Jungtier- und Adult-Gewichte

Für die Gewichtsentwicklung im Nestlingsalter wurden alle Welpen eines Wurfes mehrmals pro Woche gewogen. Die Gewichte wurden nach Geschlechtern getrennt notiert und unter der Annahme, dass leichte Tiere leicht und schwere Mäuse schwer bleiben, aufsteigend den Welpen zugeordnet. Mit dem Setzen der Ohrmarkierungen im Alter von etwa 10 Tagen wurden die Gewichte individuellen Tieren zugeordnet. Ab dem Absetzen wurden die Mäuse wöchentlich gewogen.

2.2.3 Körperzusammensetzung

Die Kernspin-Magnet-Resonanz-Spektroskopie (qNMR) bietet die Möglichkeit, die Körperzusammensetzung am nicht-narkotisierten Tier minimalinvasiv zu bestimmen. Verwendet wurde hierfür ein Bruker Minispec mq7.5 LF50H mit entsprechendem Messzylinder (Bruker Optics, Rheinstetten) für Mäuse. Die verwendete Kalibrierung basierte auf Spektren, die mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Mausfett und Hähnchenbrust aufgezeichnet wurden. Berechnet wurde dem entsprechend die geschätzte Fettmasse sowie fettfreie Masse der Versuchsmäuse.

2.2.4 Körpertemperatur

Die rektale Körpertemperatur der Mäuse wurde mit einem Präzisionsthermometer (Almemo 2490, Ahlborn Mess- und Regelungstechnik, Holzkirchen) mit Rektalfühler (Novodirect GmbH, Kehl) gemessen. Die Messung erfolgte in jeder Versuchsgruppe immer etwa zur gleichen Tageszeit. Absetzlinge wurden zur Messung per Nackengriff fixiert. Ausgewachsene Mäuse wurden auf eine Futterraufe gesetzt und an der Schwanzwurzel leicht angehoben um den Stress während der Messung zu minimieren.

2.2.5 Indirekte Kalorimetrie

Die indirekte Kalorimetrie ist eine Methode, mit der mittels des Sauerstoffverbrauch (VO_2) und Kohlendioxidproduktion (VCO_2) die Stoffwechselrate berechnet wird. Ausgangspunkt dafür ist die Annahme, dass ein Organismus alle notwendige Energie für Stoffwechselprozesse durch die Oxidation von Kohlenhydraten, Fetten oder Proteinen zu Kohlendioxid und Wasser gewinnt. Je nach

Makronährstoff variiert dabei das oxikalorische Äquivalent. Für Kohlenhydrate liegt dieser Wert bei 21,1 $kJ*l^{-1}$ O_2, für Fette dagegen bei 19,8 $kJ*l^{-1}$ O_2 (Ferrannini, 1988). In Form der respiratorischen Austauschrate (*respiratory exchange ratio*; RER) wird dieser Unterschied in der weiteren Berechnung des Energieumsatzes berücksichtigt.

Die Berechnung von VO_2 und VCO_2 erfolgte als Produkt aus Flussrate und der jeweiligen Gasdifferenz (Δvol% O_2/CO_2) zwischen Referenzkanal und Tierkanal. Hieraus die respiratorische Austauschrate (RER) berechnet:

$$RER = \frac{VCO_2}{VO_2}$$

Die RER variiert je nach verstoffwechseltem Substrat zwischen 0,7 bei reinem Fettstoffwechsel und 1,0 bei reinem Glukosestoffwechsel. Bei Proteinen liegt der Wert etwas über 0,84. Somit kann mittels der RER und bekanntem Sauerstoffverbrauch der Energieumsatz (*heat production*; HP) von Lebewesen berechnet werden (Heldmaier 1975):

$$HP_{22°C,\ ad\text{-}lib}\ [mW] = (4{,}44 + 1{,}43 * RER) * VO_2 \left[\frac{ml}{h}\right].$$

Der tägliche Energieumsatz (*daily energy expenditure*; DEE) ist die Summe von 24 aufeinanderfolgenden Stundenwerten. Alle Messungen zum Energieumsatz wurden über mindestens 48 Stunden durchgeführt. Der erste Messtag diente der Akklimatisation und wurde stets verworfen, die nachfolgenden Tage weiter ausgewertet. Zur Kalkulation des Ruheumsatzes (*resting metabolic rate*; RMR) wurde manuell der niedrigste VO_2-Wert am Tag und in der Nacht herausgesucht. Hierzu wurden die Daten zuvor geglättet, d. h. Mittelwerte aus 20-Minutenintervallen gebildet sowie deren Standardabweichung berechnet. Die RMR wurden aus dem niedrigsten geglätteten Sauerstoffverbrauchswert mit Variationskoeffizient <5% und der dazugehörigen RER berechnet.

Gemessen wurden VO_2, VCO_2 und RER mit einem TSE LabMaster-Modul (CaloSys; TSE Systems GmbH; Bad Homburg) mit Saugprinzip. Aufgezeichnet, gesteuert und berechnet wurden die Werte über die TSE LabMaster Software 2.8.3. Aus VO_2, VCO_2 und RER abgeleitete Berechnungen wie HP oder DEE wurden manuell durchgeführt.

Die Anlage enthielt werksseitig einen Siemens Ultramat/Oxymat, der im paramagnetischen Wechseldruckverfahren die O_2-Konzentration und via Infrarotspektroskopie den CO_2-Gehalt der Luft analysierte. Die Kalibrierung der Anlage erfolgte etwa halbjährlich mittels zweier Referenzgase mit definierten Konzentrationen von CO_2 und O_2 in Stickstoff. Die Nullpunktreferenz (~20,9% O_2; ~0,05% CO_2) diente außerdem der permanenten, internen Driftkorrektur des Analysators während der laufenden Messungen. Das zweite Referenzgas spiegelte die Spannbreite des Messbereichs wieder (~20% O_2, ~1% CO_2). Durch den Aufbau der Messanlage mit einer Siemens-Einheit, acht parallelen Messkanälen und einem Referenzkanal ergab sich ein Probenintervall von neun Minuten. Bei geringerer Käfigbestückung verkürzte sich das Messintervall folglich pro Käfig um eine Minute. Der Referenzkäfig wurde, in allen Messungen ebenfalls mit einer Wasserflasche bestückt. Des Weiteren wurde in allen Messungen die Kammertemperatur mit aufgezeichnet.

Vorversuche in Typ I Messkäfigen, die im Aufbau den verwendeten Stoffwechselkäfigen an der Deutschen Mausklinik ähneln, haben gezeigt, dass sie für die Analyse fettleibiger Mäuse ungeeignet sind. Der Käfig unterschied sich sowohl im Tränkensystem, als auch in den Futterraufen vom

gewohnten Haltungskäfig. Bei den untersuchten Mäusen wurden eine reduzierte Futter- und Wasseraufnahme sowie bei Leptin-defizienten B6.Cg-Lep^{ob}/J Mäusen 50% torpide Mäuse verzeichnet. Zusätzlich zur Einzelhaltung wurden diese Ergebnisse als Stressoren für die Mäuse bewertet. Des Weiteren wurde eine große Varianz im Energieumsatz gemessen. Aus diesen Gründen haben wir uns für die Entwicklung und Etablierung modifizierter Haltungskäfige (Abbildung 2, GreenLine; Tecniplast) im spezifiziert pathogenfreien Untersuchungslabor entschieden, die zudem hochdurchsatzkompatibel waren. Für die Dauer der Messungen wurden die Mäuse einzeln, mit *ad libitum* Zugang zu Wasser und Haltungsfutter (ca. 50 g), in den modifizierten Haltungskäfigen mit diagonalem Luftstrom und luftdichter Filtermembran, gehalten. Das Futter wurde in einem abgetrennten, nicht direkt unter dem Luftabsaugstutzen gelegenen Teil der Raufe angeboten. In jedem Käfig wurde zusätzlich eine Schale mitgeführt, in dem zur Feuchtigkeitskorrektur ca. 10 g Futter mitgewogen wurden. Außerdem wurden jeder Maus ein paar uringetränkte Späne Nistmaterial aus dem alten Haltungskäfig in den Messkäfig gelegt. Dieser Gruppenduft erleichterte nach der Messung die Rückführung der Mäuse in die ursprünglichen Kleingruppen.

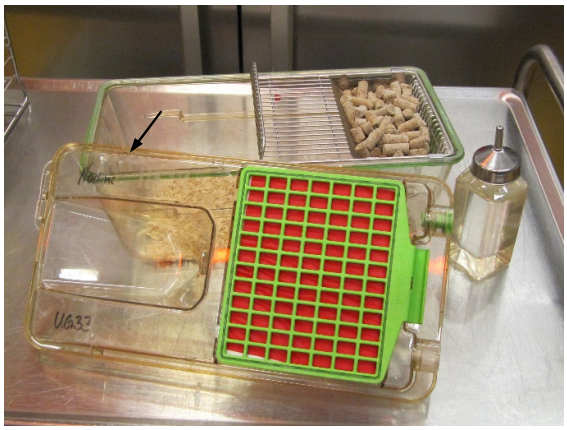

Abbildung 2 Modifizierter GreenLine Haltungskäfig für indirekte Kalorimetrie
Zur Messung des Energieumsatzes in der indirekten Kalorimetrie wurden die HEPA-Filter im Käfigdeckel handelsüblicher GreenLine-Käfige mit signalroter Folie abgedichtet. Für einen diagonalen Luftfluss und die Frischluftzufuhr in den Käfig wurde einer der Verbindungsstutzen im rückwärtigen Deckelteil entfernt und mit der Messanlage verbunden. In die Käfigunterschale wurde zusätzlich am gegenüberliegenden, linken unteren Käfigrand (Pfeil) ein Loch (ca. 3 mm) gebohrt. In der laufenden Messung wurden immer Trennbleche (nicht abgebildet) in der Futterraufe verwendet, damit das Futter nicht im direkten Luftstrom lag und Feinstäube in die Filter und das Messsystem getragen wurden.

Alle Messungen wurden mit einem konstanten Luftfluss von 0,7 l*min^{-1} und in einem Messvolumen (Teilprobe) von 0,55 l*min^{-1} durchgeführt. Der tägliche Energieumsatz wurde bei 22 °C gemessen. Alle Messungen erfolgten über mindestens 48 Stunden, jeder Messtag startete um 9.00 Uhr. Täglich gegen 9.00 Uhr sowie am Ende der Messungen wurden Körpergewicht, Futteraufnahme und Körpertemperatur der Mäuse aufgezeichnet. Die komplette Einstreu mit Kot wurde für die Verwendung in der direkten Kalorimetrie (siehe 2.2.6) gesammelt. Die Mäuse wurden nach den Messungen wieder in denselben Kleingruppen zusammengeführt, die bereits vor dem Versuch Bestand hatten.

2.2.6 Direkte Kalorimetrie

Im Gegensatz zur indirekten Kalorimetrie wird bei der direkten Kalorimetrie der Energieumsatz eines Lebewesens oder die gespeicherte Energie eines Stoffes über dessen Wärmeabgabe gemessen.

Während der Energieumsatz heutzutage mittels indirekter Kalorimetrie, ist die Verbrennung von Proben zu Bestimmung des physikalischen Brennwertes eine weit verbreitete Standardmethode.

Der Energiegehalt von Futter und Kot wurde mit einem isoperibolen Bombenkalorimeter bestimmt (Parr 6300; Parr Instrument GmbH; Frankfurt). Sämtlicher Kot aus der dreitägigen indirekten Kalorimetrie sowie Futterproben wurden luftgetrocknet und anschließend bei 55 °C zur Minimierung des Wassergehaltes weitergetrocknet. Der Kot wurde anschließend mit einer Kugelmühle (Tissue Lyser II, Retsch) in 5 ml Behältern und etwa der gleichen Menge Stahlkugeln (5 mm) zu Pulver vermahlen, zu 1 g schweren Pellets gepresst und bei 30 bar in reiner Sauerstoffatmosphäre vollautomatisch verbrannt. Aus der Gesamtmenge des ausgeschiedenen Kots sowie dessen Energiegehalt wurde der Energieverlust durch den Kot ($E_{Fäzes}$) berechnet.

Futterpellets wurden direkt als ca. 1g schwere Proben verwendet und dessen Brennwert bestimmt. Die Energieaufnahme (E_{in}) wurde aus der feuchtigkeitskorrigierten Futteraufnahme und dem gemessenen Brennwert des Futters bestimmt. Zu jeder Futtercharge wurden separate Brennwertbestimmungen durchgeführt. Für die Kalkulation der metabolisierbaren Energie (E_{met}) wurden pauschal 2% der aufgenommenen Energie (E_{in}) abgezogen um Energieverluste durch Urin zu berücksichtigen (Elvert et al., 2013; Schutz, 1997; Street et al., 1964). Zur Kalkulation einer Energiebilanz wurden E_{met} und EE aus der indirekten Kalorimetrie gegenübergestellt.

2.2.7 Feeding-Drinking-Activity und Futterwahlversuch

Spontanaktivität und Fressverhalten wurden in einer *Feeding-Drinking-Activity*-Anlage (FDA) gemessen. Hierbei handelt es sich um offene Haltungskäfige vom Typ III, die von Lichtsensor-Rahmen (ActiMot2, TSE Systems, Bad Homburg) umgeben waren und über drei Wägeeinheiten für Futter und Wasser verfügten (Phenomaster, TSE Systems, Bad Homburg). Die Mäuse wurden für die Dauer der Messung einzeln gehalten. Für alle Messreihen wurde die Analysesoftware TSE LabMaster verwendet und das Messintervall auf fünf Minuten festgelegt. Für die Standardmessung wurde ausschließlich einer der Futter-Wägesensoren verwendet, die Wasserflasche des Systems wurde durch die Wasserflasche der Haltungskäfige ersetzt.

Die Futteraufnahme wurde als Differenz zwischen zwei Messzeitpunkten bestimmt, die Bewegung als kumulative Unterbrechung von Lichtschranken bewertet. Die Aufzeichnung der Bewegung erfolgte in drei Ebenen: vorwärts/rückwärts und seitwärts (x-y-Achse) sowie in die Höhe (z-Achse). Die z-Achsen-Bewegung wird auch als Aufrichte- und Erkundungsverhalten bezeichnet. Der erste Messtag wurde in allen Messungen nicht analysiert, da er der Akklimatisierung der Mäuse diente.

Mit den unter thermoneutralen Bedingungen geborenen *Fto*^{tm1b} Mäuse wurde in der FDA-Anlage ein Futterwahlversuch mit fettreicher Diät (HFD) durchgeführt. Auf eine Kontrollgruppe mit Standard- oder Kontrolldiät wurde wegen der geringen Zahl an homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäusen verzichtet. Während des Futterwahlversuchs wurde den Mäusen in den ersten drei Tagen ausschließlich die Standardhaltungsdiät angeboten. Nach drei Tagen wurde in einer der Raufen alternativ HFD angeboten. Nach drei Tagen Futterwahl wurden beide Raufen mit HFD gefüllt und für weitere drei Tage Futteraufnahme und Aktivität gemessen. Die fettreiche Fütterung wurde für sieben Wochen in Einzelhaltung fortgesetzt und abschließend erneut fünf Tage in der FDA-Anlage gemessen. Am Versuchsende wurden die Mäuse zur Organentnahme getötet.

2.2.8 Gewebeentnahme und Körperlänge

Zur Gewebeentnahme wurden alle Mäuse mit CO_2 getötet. Die entnommenen Gewebe wurden direkt nach der Entnahme mit einer Feinwaage gewogen, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert oder in Paraformaldehyd fixiert. Die Körperlänge wurde als Schnauzen-Anus-Länge *post mortem* mit einem handelsüblichen Lineal gemessen.

2.3 *IN VITRO* UNTERSUCHUNGEN

2.3.1 Polymerase Kettenreaktion Anwendungen

Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurden ab einem Alter von 10 Tagen <1 mm große Schwanzbiopsien entnommen und Ohrmarkierungen zur Kennzeichnung der Mäuse gesetzt. Die Biopsien wurden in 200 µl Lysepuffer mit 0,2 mg/ml Proteinase K (Thermo Scientific) für mindestens 4 h bei 65 °C verdaut und zur weiteren Verwendung hitzeinaktiviert. Für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1 µl des inaktivierten Lysats in 20 µl Reaktionsansatz eingesetzt.

Lysepuffer für direkte PCR: 10 mM TRIS, 50 mM KCl, 0,45 % Nonidet™ P40 Ersatz, 0,45 % Tween 20; pH 8,3

PCR-Reaktionsmix (20µl): 2x ImmoMix (Bioline), je 10pmol/l *Primer* (stammspezifisch), 1µl Lysat, Rest nukleasefreies H_2O

Tabelle 1 Primer zur Genotypisierung:

Stamm	Primer vorwärts	Primer rückwärts	Produktgröße (bp) Wildtyp	Produktgröße (bp) Mutante
Fto^{tm1a}/ *Fto*^{tm1b}	AGCCAGACACTGAAGCCCAG	AAACCAACGCCCAGACACTC TCGTGGTATCGTTATGCGCC	386	148
Mc4r^{W16X}	CTACAGGCATACAGACTGGGAG	GTACATGGGTGAGTGCAGGTTC	132	278
Cre Deleter	ATGCCCAAGAAGAAGAGGAAGGT	GAAATCAGTGCGTTCGAACGCTAGA		447

Tabelle 2 Verwendete PCR-Protokolle zur Genotypisierung

	Fto^{tm1a}/*Fto*^{tm1b}		*Mc4r*^{W16X}		Cre Deleter	
Schritt	**Temp.**	**Dauer**	**Temp.**	**Dauer**	**Temp.**	**Dauer**
Initiale Denaturierung	94 °C	7 min	95 °C	7 min	94°C	7 min
Denaturierung	94 °C	30 sec	95 °C	10 sec	94°C	30 sec
Anlagerung der Primer	60 °C	30 sec	60 °C	20 sec	58°C	30 sec
Verlängerung	72 °C	45 sec	72 °C	30 sec	72°C	45 sec
Finale Verlängerung	72 °C	5 min	72 °C	3 min	72 °C	5 min
Zyklen	35		35		35	

Ausschluss alternativer Spleißstellen im Mausmodell Fto^{tm1a}

Im Rahmen des *European Conditional Mouse Mutagenesis* Programms (EUCOMM) wurde durch eine einheitliche Targeting-Strategie ein Archiv an Mausmutantenlinien erstellt. Ziel des Programms sollte sein, für jedes bekannte Gen des Mausgenoms einen konditionalen *knockout* mit einheitlichem

genetischem Hintergrund (C57BL/6N) erzeugen zu können. In Kombination mit einer einheitlichen Phänotypisierungsplattform (European Mouse Disease Clinic; EUMODIC) sollte so die Funktionsweise dieser Gene analysiert werden. Im Fokus des EUCOMM Programms standen zunächst Gene, die für humane Erkrankungen relevant waren, wie z. B. *Fto*. Die einheitliche Targeting-Strategie kombinierte dabei die Vorteile einer Genfalle mit einem konditionalen *knockout (Auwerx et al., 2004; Schnutgen, 2006)*. Die aus den embryonalen Stammzellen generierten Mäuse tragen eine Genfalle, die einen sogenannten *knockout-first* (tm1a) genieriert. Phänotypisch entsprechen diese Mäuse somit einem *knockout* (Abbildung 3). Erreicht wird dies dadurch, dass über homologe Rekombination die Genfalle in ein Intron des Zielgens eingefügt wird. Diese besteht aus einem Selektionsmarker und einem Reportergen ohne eigenen Promotor. Im Fall der EUCOMM Mutanten sind dies Neomycinphosphotransferase und Betagalaktosidase (βgeo). Die ßgeo-Kassette wird zusätzlich von einem Spleißakzeptor (SA; 5‘) und einer Transkriptions-Terminationssequenz (polyA-Signal; 3‘) flankiert. Durch die Integration der SA-ßgeo-polyA-Kassette in das exprimierte Zielgen kommt es bei aktiviertem Promotor des Zielgens zur Transkription der Kassette und dem vorzeitigen Abbruch am polyA-Signal der Genfalle. Flankiert wird die Genfalle von FRT-Sequenzen. Eine erfolgreiche Rekombination mittels FLP-Rekombinase führt zur Deletion der Genfalle sowie einer FRT-Sequenz aus dem Genom. Das entstandene Allel entspricht dem wildtypischen Allel (Abbildung 3 tm1c). Das eingefügte Allel enthält zudem zwei loxP-Sequenzen, die ein oder mehrere sogenannte kritische Exone flankieren. Das kritische Exon ist so gewählt, dass eine Cre-vermittelte Rekombination zum Versatz des offenen Leserahmens führt und dadurch ein verkürztes und funktionsloses Protein entsteht (Schnutgen, 2006). Wird die *knockout-first* Mauslinie demnach mit einer Cre-Mauslinie verpaart, kann ein ubiquitärer oder gewebsspezifischer *knockout* erzeugt werden, der nach wie vor unter dem Promotor des Zielgens die Selektionsmarker/Reportergen-Kassette exprimiert (Abbildung 3 tm1b). Die Verpaarung der tm1c-Mauslinie mit einer Cre-Linie führt dagegen zu einer Expression des verkürzten, funktionslosen Proteins ohne zusätzliche Expression des Reportergens (klassischer *knockout*).

Für Linien mit dem *knockout-first* Konstrukt (tm1a) aus dem EUCOMM-Programm ohne eigenen Promotor für die Selektionskassette kann nicht ausgeschlossen werden, dass alternative Spleißstellen in einem Teil der Transkripte nicht zum planmäßigen Abbruch der Transkription hinter der Neomycin-Kassette führen (Skarnes et al., 2011; Testa et al., 2004). Dies wurde während der laufenden Untersuchungen deutlich. Aus diesem Grund wurde nach Vorversuchen entschieden, für die weitere Phänotypisierung die Mauslinie Fto^{tm1b} zu verwenden. Zum Nachweis alternativer Transkripte wurden homozygote Träger des Fto^{tm1a}-Allels gezüchtet (siehe Abbildung 3) und Protein sowie mRNA aus Hypothalamus-Proben isoliert (siehe 2.3.4). Die mRNA wurde vor der weiteren Verwendung in cDNA konvertiert (siehe 2.3.4). Die verwendeten *Primer* wurden intronüberspannend gewählt um die Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden (Abbildung 3, Tabelle 3). Die Bindestellen *Primer* wurden so gewählt, dass sie vor oder nach der eingebrachten Kassette lagen (Tabelle 3, ergänzend siehe Abbildung 16). Zusätzlich wurde ein *Primer*paar gewählt, dessen Bindestelle des rechter *Primers* in der βGalaktosidase-Neomycin-Kassette des Fto^{tm1a}-Allels lag.

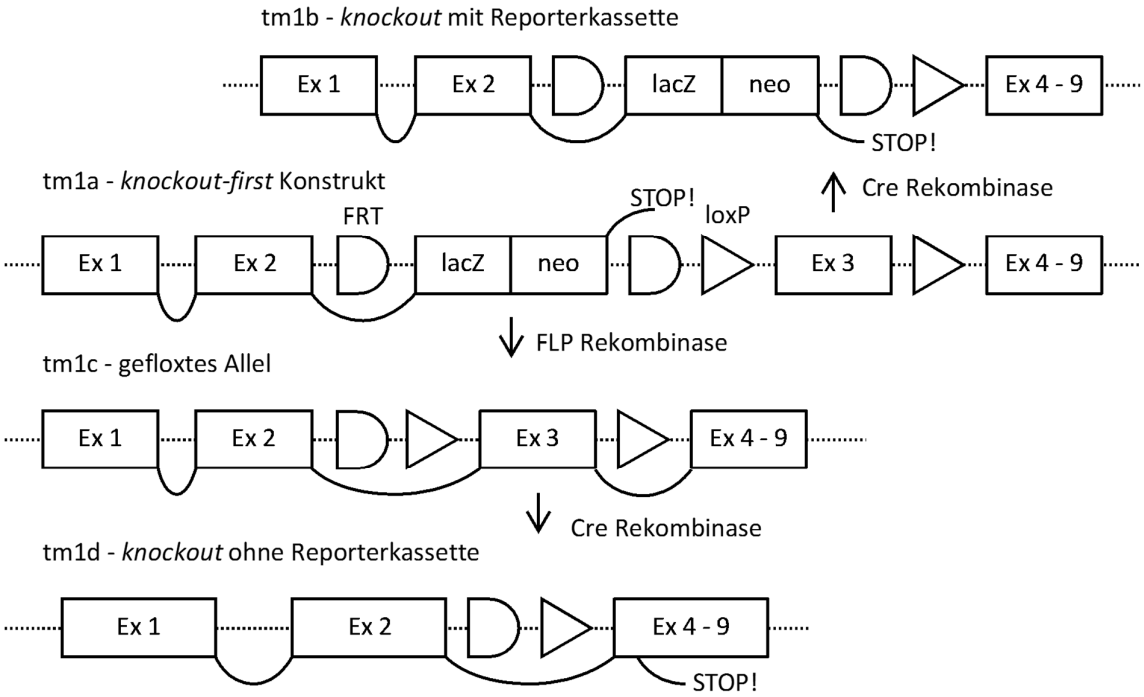

Abbildung 3 Genkonstrukt der EUCOMM Mauslinien am Beispiel von *Fto*$^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$
Die Mauslinie *Fto*$^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ (*Fto*^{tm1a}), die über das EUCOMM-Programm generiert wurde, bietet die Möglichkeit das Genkonstrukt durch Verpaarung mit Deleter-Linien (Cre oder FLP) weiter zu modifizieren. Abgeleitete Linien tragen entweder eine Selektions- & Reporter-Kassette (lacZneo) (*tm1b*) oder entsprechen einem klassischen *knockout* (*tm1d*). Die Linie *tm1c* trägt ein gefloxtes Allel und entspricht phänotypisch dem Wildtyp.

Tabelle 3 Primer zum Ausschluss alternativer Spleißstellen
Verwendete *Primer* zum Ausschluss alternativer Spleißstellen zur Anwendung auf cDNA mit den jeweils erwarteten Produktgrößen. Aus den Primernamen ergeben sich die Bindestellen des 5‘ und 3‘ Primers im jeweiligen Exon.

Name	Primer vorwärts	Primer rückwärts	Produktgröße (bp)	
			Wildtyp	Mutante
Fto Ex2LacZ	GGAGCTTGAAGACACTTGGC	ACATCGGGCAAATAATATCG	-	281
Fto Ex2Ex3		TCTTTGCCTTGGATCCTCAC	204	4415
Fto Ex8Ex9	ATTCTGTCTGCCATCCTGGT	GGAAACCACGTCTGTGAGGT	183	-

Tabelle 4 Verwendetes PCR-Protokoll zum Nachweis alternativer Transkripte in Fto^{tm1a} Mäusen

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	7 min	
Denaturierung	97 °C	10 sec	45x
Anlagerung der Primer	55 °C	15 sec	
Verlängerung	72 °C	20 sec	
Finale Verlängerung	72 °C	5 min	

Quantitative Real-Time PCR

Die Quantifizierung der Transkriptmenge wurde mit isolierter mRNA aus dem Quadrizepsmuskel homozygoter *Fto*^{wt} und *Fto*^{tm1b} Mäuse durchgeführt. Alle Proben wurden als technische Triplikate gemessen. Alle Primer wurden intronüberspannend gewählt. Zur Normalisierung der Daten wurden die Expressionsspiegel von β-Aktin und Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) verwendet.

Tabelle 5 Verwendete Primer zur Quantifizierung muskelspezifischer Transkripte

Transkript	Primer vorwärts	Primer rückwärts
MyoD	GAAGTCGTCTGCTGTCTCAAAGG	CGCCACTCCGGGACATAG
MyoG	CCTAAAGTGGAGATCCTGCG	ACGATGGACGTAAGGGAGTG
Mstn	AACAGCCTGAATCCAACTTA	GTGTGTCTGTCACCTTGACTT
Igf1	ATGCTCTTCAGTTCGTGTGT	CTGCTTTTGTAGGCTTCAGT
Igf1r	CTTTCACTCTGTACCGCATC	TAAAAAGATGGAGTTTTCGG
Hsp90	AGGAGGGTCAAGGAAGTGGT	TTTTTCTTGTCTTTGCCGCT
Actb	CACCACACCTTCTACAATGA	GTACGACCAGAGGCATACAG

Alle Analysen wurden auf einem 384-Well-System durchgeführt (LightCycler 480, Roche Applied Science, Penzberg). Die PCR wurde entsprechend dem in Tabelle 6 dargestellten Temperaturverlauf durchgeführt. Zur Quantifizierung der Expressionsdaten wurde in jedem Ansatz eine Standardkurve mitgemessen in der alle cDNA Proben zu gleichen Teilen vermischt und in zweier Schritten verdünnt wurden.

PCR-Reaktionsmix (12,5µl): 2x SensiMix (Bioline), je 5 pmol/l *Primer*, 1 µl cDNA (1:10 verdünnt), Rest nukleasefreies H_2O

Tabelle 6 Verwendetes qPCR-Protokoll

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	7 min	
Denaturierung	97°C	10 sec	45x
Anlagerung der Primer	53°C	15 sec	
Verlängerung	72°C	20 sec	
Schmelzkurve	60°C – 95°C	0,11°C/sec	

2.3.2 SDS-PAGE und Western Blot

Für die weitere Verwendung im Western Blot wurde Protein aus Hypothalami von homozygoten *Fto*^{tm1a} und *Fto*^{tm1b} Mäusen sowie deren Wurfgeschwister extrahiert um die FTO-Defizienz in den Mauslinien nachzuweisen. Die entnommenen Hypothalami wurden hierzu in Radioimmunopräzipitations-Assay-Puffer (RIPA) homogenisiert und aufbereitet. Die anschließende Proteinbestimmung erfolgte entsprechend den Herstellervorgaben mittels Bicinchoninsäure (BCA) Testsystem (Thermo Fisher Scientific). Die Photometrische Quantifizierung des Tests wurde mit einem Microplatten Lesegerät (Tecan Infinite M200) bei einer Absorptionswellenlänge von 562nm durchgeführt. Aufgereinigte Proteine wurden, ihrer Größe entsprechend, mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli, separiert. Es wurden Gele mit einem Acrylamidgehalt von

10 % verwendet. Aufgetragen wurden 10 - 50 µg Protein. Die Proben wurden mit 2x Probenpuffer versetzt und 3 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die gelelektrophoretische Separierung erfolgte in senkrechten Gelkammern umgeben von Laufpuffer.

Der Proteintransfer aus dem Acrylamidgel erfolgte mittels Western Blot im *semidry*-Verfahren. Hierzu wurde das Gel aus der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran (LI-COR) geblottet und anschließend mit Antikörpern (siehe Tabelle 7) inkubiert. Zur Vorbereitung auf die Antikörperinkubation wurde die Membran für 3 Stunden in TBS mit 3% bovinem Serumalbumin bei Raumtemperatur inkubiert um unspezifische Protein-Bindestellen zu blockieren. Die Inkubation der Membran mit dem FTO-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Als interne Kontrolle wurde ein Anitkörper gegen pan-Aktin für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper wurden bei Raumtemperatur für ca. 1,5 Stunden koinkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde die Membran mehrmals mit TBST gewaschen. Die Fluoreszenzsignale der Sekundärantikörper wurden mit einem Infrarot-Scanner (Odyssey®, LI-COR) aufgenommen und die Scans mit der dazugehörigen Software ausgewertet.

Tabelle 7 Verwendete Antikörper
Verdünnungen und Herkunft der verwendeten Antikörper. Der Primäre Antikörper gegen das murine FTO wurde freundlicherweise von Ulrich Rüther (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Zielprotein	Größe [kDa]	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
Primäre Antikörper					
Fto	58	Meerschweinchen	1 : 2 000	Rüther, Düsseldorf	
pan-Aktin	43	Maus	1 : 5 000	Millipore	MAB1501
Sekundäre Antikörper					
Maus IgG		Esel	1 : 20 000	LI-COR	926-32212
Meerschweinchen IgG		Esel	1 : 20 000	LI-COR	926-32411

RIPA-Puffer: 50mM TRIS, 1% Nonidet™ P40 Ersatz, 0,25% Natrium-Desoxycholat, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,1% Proteaseinhibitor-Cocktail (Sigma Aldrich), 0,1% Phosphataseinhibitor-Cocktail (Sigma Aldrich); pH 7,4

2x Probenpuffer: 0,5 M TRIS-HCl, 10% (w/v) SDS, 16% Glycerol, 200 mM DTT, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol

Sammelgel (5%): 5% (v/v) Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 30, Carl Roth), 0,1% SDS, 125 mM TRI-HCl, 0,1% TEMED, 0,06% AMPS

Trenngel (10%): 10% (v/v) Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 30, Carl Roth), 0,1% SDS, 375 mM TRIS, 0,05% TEMED, 0,05% AMPS

1x Laufpuffer: 25 mM TRIS, 250 mM Glycin, 0,1% SDS; pH 8,3

TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS): 20mM TRIS, 140 mM NaCl; pH 7,6

TBST: wie TBS, zusätzlich 0,1% Tween® 20

2.3.3 Urin-Protein Bestimmung

Die murinen *Major-Urinary-Proteins* (MUP) sind eine Proteinfamilie, bestehend aus 30-35 Produkten, die unter anderem dem Transport von Pheromonen dienen (Cavaggioni und Mucignat-Caretta, 2000). Sie werden in der Leber unter der Kontrolle verschiedenster Hormone gebildet, unter anderem Wachstumshormon (GH) und über den Urin ausgeschieden. Bei Individuen mit gestörter GH-Ausschüttung konnte nachgewiesen werden, dass sich im Urin weniger MUP befindet als bei gesunden Individuen (Meyer et al., 2004). Des Weiteren wird die Ausschüttung möglicherweise durch Östrogene verringert, weswegen bei weiblichen Tieren niedrigere MUP-Spiegel gemessen werden als bei Männchen. Die Proteine haben eine Größe von ca. 20 kDa und können im SDS-Gel mit einer Coomassie-Färbung nachgewiesen werden.

Von 28 Tage alten männlichen Mäusen wurden Urinproben gesammelt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe auch 2.3.1). Zur Probengewinnung wurden die Mäuse per Nackengriff fixiert, worauf hin sich die Blase reflexartig entleerte und der Urin in einem Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Für die SDS-PAGE wurde 1 µl Urin mit 2x Probenpuffer versetzt, bei 95°C denaturiert und auf ein 12,5%iges Acrylamidgel aufgetragen (siehe hierzu auch 2.3.1). Das fertige Gel wurde 30 Minuten in Coomassie-Lösung inkubiert und anschließend bis zur sichtbaren Klärung mit Entfärbe-Lösung behandelt. Der Scan des fertigen Gels erfolge an einem Durchlichtscanner, die densitometrische Auswertung der Gele wurde mit ImageJ durchgeführt.

Coomassie-Lösung: Methanol 40%, Eisessig 10%, Coomassie Brilliant Blue (R-250) 0,035%

Entfärbe-Lösung: Methanol 40%, Eisessig 10%

2.3.4 mRNA-Isolation und cDNA-Synthese

Zur Transkriptanalyse in *Fto*^{tm1a} und *Fto*^{tm1b} Mäusen wurde mRNA aus Hypothalamus (*Fto*^{tm1a}) und Quadrizepsmuskel (*Fto*^{tm1b}) isoliert. Es wurde eine Kombination aus Phenol-Isolation und Säulen-Aufreinigung durchgeführt. Das gefrorene Gewebe wurde dabei in 1 ml (Muskel; M) bzw. 0,8 ml (Hypothalamus; H) TRIsure (Bioline) homogenisiert. Nach Inkubation bei RT für 5 Minuten wurde dem Homogenat 200 µl/160 µl (M/H) Chloroform zugefügt, kräftig geschüttelt und weitere 2-3 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch zur Phasenseparation 15 Minuten mit 12.000 g bei 4°C zentrifugiert. Die obere, farblose RNA-haltige Phase wurde anschließend mit 500 µl/400 µl (M/H) Ethanol in DEPC-Wasser (75%) gemischt und schrittweise auf die Säulen transferiert (SV Total RNA Isolation System, Promega). Nach der Hälfte der Probenmenge wurden die Säulen kurz zentrifugiert (15 sek, 8.000 g), anschließend der Rest der Probe hinzugefügt und 1 min bei 12.000 g abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die weitere Aufreinigung erfolgte gemäß Protokoll zur Säulenaufreinigung von Promega. Die Qualität (Integrität) der aufgereinigten RNA wurde in einem Formaldehyd-Agarosegel (1%) überprüft. Es wurden nur Proben weiterverarbeitet, bei denen zwei klare Banden erkennbar waren (18S und 28S rRNA). Die Konzentration der Proben wurde photometrisch bestimmt (TECAN, infinite M200).

Zur weiteren Analyse der Transkripte wurde eine Konvertierung der mRNA in cDNA durchgeführt (cDNA-Synthese). Hierfür wurde ein Synthese-System verwendet (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen). Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng mRNA in 10 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Sowohl cDNA als auch Reste der mRNA wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.5 Histologische Untersuchungen

Leber und Wangenhautproben fettreich gefütterten *Fto*^{tm1b} Mäuse wurden für histologische Untersuchungen aufbereitet. Die Proben wurden für maximal eine Woche in einer 4%igen Paraformaldehydlösung mit Pikrinsäure (0.0024 %) fixiert, in Einbettkassetten im Gewebeinfiltrationsautomat (Leica TP1020, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch) in einer Alkoholreihe entwässert (Tabelle 8) und in Paraffin vorfixiert. Am nächsten Tag wurden alle Proben in Paraffin gebettet (Leica EG115C, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch). Nach dem Aushärten des Paraffins wurden für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) 5µm dicke Schnitte angefertigt (Mikrotom Leica RM 2255, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch), im Wasserbad geglättet auf Objektträger (SuperFrost®) aufgezogen und bei 37°C im Inkubator getrocknet.

Tabelle 8 Abfolge und Dauer der Schritte Gewebeinfiltrationsautomaten
Die Inkubationszeit der einzelnen Schritte betrug jeweils 60 Minuten und wurde mit einer unterschiedlichen Zahl an Wiederholungen durchgeführt, so dass am Schluss 12 Behälter mit Lösungen durchlaufen wurden.

Schritt	Lösung	Wiederholungen
1	70% Ethanol	2
2	80% Ethanol	1
3	96% Ethanol	2
4	100% Ethanol	3
5	Xylol	2
6	Paraplast plus	2

Die Schnitte wurde in einem Färbeautomaten (Leica ST 5020, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch) zuerst entwachst, dann rehydriert. Basophile Zellkompartimente wurden mit Hämatoxylin, eosinophile mit Eosin angefärbt und erneut mit Ethanol in steigenden Konzentrationen und Xylol entwässert. Gefärbte Schnitte wurden vor der lichtmikroskopischen Untersuchung mit Objektgläsern und Einschlussmittel (Roti-Histokitt, Carl Roth) versiegelt und konserviert.

Tabelle 9 Abfolge und Dauer der Schritte im Färbeautomaten

Schritt	Lösung	Dauer [sec]
1/2	Xylol	180
3	100% Ethanol	120
4	96% Ethanol	120
5	70% Ethanol	60
6	Wasser	60
7	Hämalaun	240
8	Wasser	120
9	Eosin	120
10	70% Ethanol	60
11	96% Ethanol	60
12/13	100% Ethanol	60/90
14	Xylol/Ethanol	90
15/16	Xylol	120

2.4 STATISTIK

Alle Ergebnisse sind als Messwerte der Einzeltiere oder Gruppenmittelwerte mit Standardabweichung dargestellt sofern nicht anders angegeben. Als Signifikanzgrenze diente ein p-Wert <0,05.

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mit SigmaPlot 12.5. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden einfaktorielle oder zweifaktorielle Varianzanalysen (ANOVA; Genotyp und Geschlecht) mit anschließender Korrektur für multiples Testen nach Holm-Sidak durchgeführt. Zeitliche Verläufe wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen statistisch ausgewertet (Genotyp und Zeit).

Lag bei den Messergebnissen keine Normalverteilung vor oder war der Grundsatz der gleichen Varianz innerhalb der Stichproben nicht gegeben, wurde eine ANOVA nach Rängen durchgeführt. Die anschließende Korrektur für multiples Testen erfolgte nach Kruskal-Wallis oder Dunn. Dargestellt sind in diesen Fällen der Median sowie die 25./75. Perzentile bzw. zusätzlich zum Median die Einzelwerte.

Für die Kovarianzanalysen (ANCOVA) zur Energiebilanz wurde zusätzlich ein Microsoft Excel basierendes Verfahren verwendet, welches auf einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) zwischen den Genotypen für jeden untersuchten Parameter aufbaut. Als Kovariaten der ANCOVA wurden Körpergewicht, fettfreie Masse oder metabolisch aktive Körpermasse (Even und Nadkarni, 2012) verwendet. Auf Basis der ANOVA sowie einer gruppenübergreifenden Ausgleichsgeraden wurden individuelle Residuen berechnet und unter Berücksichtigung des Stichprobenmittelwertes die zu adjustierende Variablen für jedes Einzeltier neu kalkuliert.

Der Beitrag des Fettgewebes zum gesamten Energieumsatz ist wesentlich geringer als der von Muskeln, Leber, Herz oder anderen metabolisch aktiven Organen. Aus diesem Grund erfolgte teilweise eine Adjustierung des Energieumsatzes auf die metabolisch aktive Körpermasse gemäß folgender Formel (Even und Nadkarni, 2012):

$$\text{Metabolisch aktive Körpermasse [g]} = \text{fettfreie Masse [g]} + 0{,}2 \times \text{Fettmasse [g]}$$

3 ERGEBNISSE

3.1 MELANOCORTIN 4 REZEPTOR – *MC4R*

Als monogenes Modell für Adipositas wurde die Melanocortin 4 Rezeptor *knockin* Maus *Mc4r*$^{tm1.1Fbz}$ (*Mc4r*^{W16X}) untersucht. Durch einen Basenaustauch an Aminosäureposition 16 des Rezeptors wird ein Tryptophan durch ein vorzeitiges Stopcodon ersetzt, welches zum Funktionsverlust des Rezeptors und frühe Entwicklung von Übergewicht führt (Bolze et al., 2013). Im Fokus dieser Arbeit stand der jugendliche Wachstumsschub der Mäuse in dem sich das Übergewicht beginnt zu manifestieren. Es sollte geklärt werden, welche Komponente des Energiehaushaltes Ursache des frühen Körpergewichtsanstieges ist. Des Weiteren sollten die Untersuchungen der Mauslinie *Mc4r*^{W16X} an der German Mouse Clinic (GMC) weitere Mechanismen aufklären an denen der MC4R beteiligt ist und die über seine Rolle in der Regulation des Energiehaushaltes hinausgehen.

3.1.1 *Mc4r*^{W16X} – Metabolische Bilanzierung heranwachsender Mäuse

Die basale Charakterisierung der Linie *Mc4r*^{W16X} erfolgte mit Mäusen im Alter von vier bis neun Wochen, da sich das Übergewicht der Mäuse während des jugendlichen Wachstumsschubes manifestiert. Der gesamte Untersuchungszeitraum wurde nach Daten aus Vorversuchen ausgewählt (Bolze et al., 2013). Mit vier, sechs und neun Wochen erfolgte eine umfassende Phänotypisierung der Mäuse. Als Vergleichsgruppe wurden wildtypische Wurfgeschwister mit untersucht (*Mc4r*^{wt}).

Jede Maus wurde innerhalb des Untersuchungszeitraums mindestens einmal pro Woche gewogen und für die gesamte Versuchsdauer die individuelle Futteraufnahme der Mäuse bestimmt. Zu den festgesetzten Zeitpunkten wurden zudem Körperzusammensetzung und Körpertemperatur bestimmt und über drei Tage hinweg fand eine tägliche Untersuchung der Mäuse statt. Die Versuchsperiode umspannte den jugendlichen Wachstumsschub der Mäuse. In Folge dessen wurden alle Mäuse während des Versuches schwerer, die *Mc4r*^{W16X} Mäuse mehr als *Mc4r*^{wt} (Abbildung 4). Innerhalb der Männchen war bereits im Alter von vier Wochen ein signifikanter Gewichtsunterschied erkennbar (Abbildung 4A). Bei den Weibchen zeichnete sich lediglich ein Trend zu erhöhtem Körpergewicht ab (Abbildung 4D). Im Laufe des Versuchs nahmen *Mc4r*^{W16X} Mäuse mehr Gewicht zu als *Mc4r*^{wt} und waren mit neun Wochen zwischen 30% und 50% schwerer. Im Versuchsverlauf blieb die Fettmasse von *Mc4r*^{wt} Mäusen beider Geschlechter annähern konstant, wohingegen sie sich bei *Mc4r*^{W16X} Mäusen verdreifachte. Bei beiden Geschlechtern hatten *Mc4r*^{W16X} Mäuse zudem eine erhöhte fettfreie Masse im Vergleich zu *Mc4r*^{wt} Mäusen. Diese erklärte teilweise das erhöhte Körpergewicht der *Mc4r*^{W16X} Mäuse, der größere Anteil daran resultierte aber aus einer Zunahme an Fettmasse, die innerhalb des fünfwöchigen Untersuchungszeitraums kontinuierlich anstieg.

Ergänzend zur Körperzusammensetzung wurde regelmäßig die Körpertemperatur aller Mäuse gemessen (Abbildung 5). Bei den Männchen wurde im fünfwöchigen Untersuchungszeitraum ein sukzessives Absinken der Körpertemperatur beobachtet. Die Körpertemperatur der Weibchen war zu allen Zeitpunkten tendenziell etwas höher als bei den Männchen. Außer bei neun Wochen alten Männchen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb eines Geschlechts. Eine reduzierte Körpertemperatur konnte somit als Ursache für das Übergewicht junger *Mc4r*^{W16X} Mäuse ausgeschlossen werden.

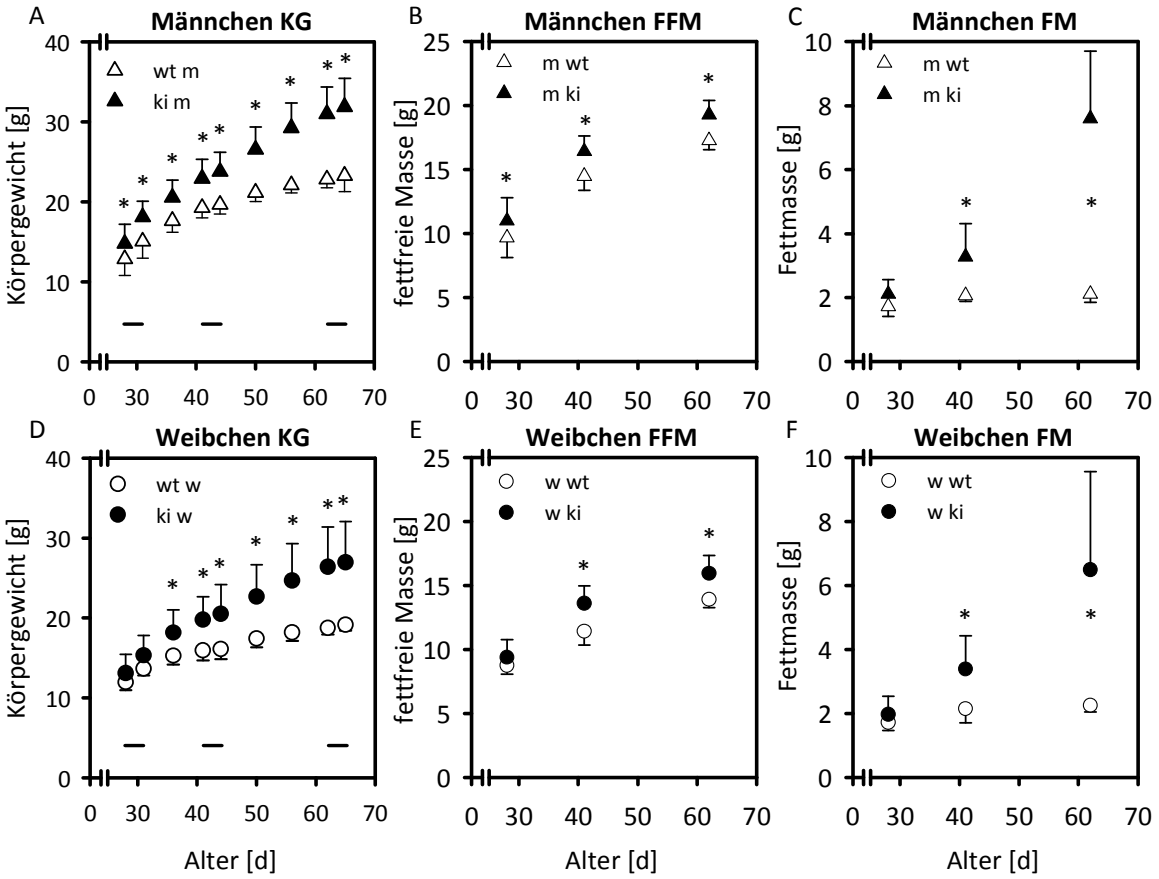

Abbildung 4 Körpergewicht und -zusammensetzung heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse
Körpergewicht (KG; A, D) von *Mc4r*^{wt} (wt) und *Mc4r*^{W16X} (ki) Mäusen im Alter von vier bis neun Wochen. Mit vier, sechs und neun Wochen wurde zusätzlich die Körperzusammensetzung bestimmt. Dargestellt sind fettfreie Masse (FFM; B, E) sowie Fettmasse (FM; C, F) im jeweiligen Alter. Männchen (m) und Weibchen (w) sind separat und nach Genotypen getrennt dargestellt (m wt n=16; w wt n=16; m ki n=13; w ki n=14). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholungen, dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Sterne markieren einen signifikanten Genotypeffekt (* p<0,05). Die Balken markieren den Zeitraum in dem eine tägliche, intensive Untersuchung der Mäuse erfolgte.

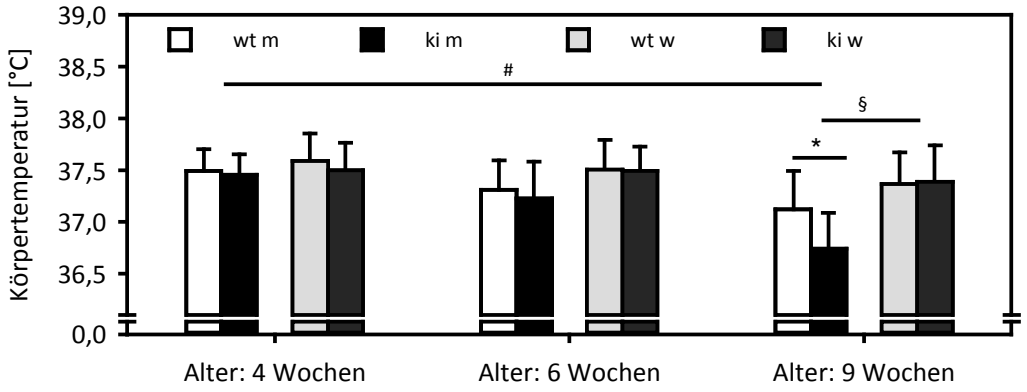

Abbildung 5 Körpertemperatur heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse
Körpertemperatur der Mäuse im Alter von vier, sechs und neun Wochen. Dargestellt sind *Mc4r*^{wt} (wt; m n=16; w n=16) und *Mc4r*^{W16X} (ki; m n=13; w n=14) Mäuse aufgeteilt nach Männchen (m) und Weibchen (w). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholungen, dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung. Der Stern markiert einen signifikanten Genotypeffekt (* p <0,05), das Paragraphenzeichen einen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern (§ p <0,05) und die Raute einen signifikanten Unterschied über die Zeit (# p <0,05).

Im Versuchsverlauf konnte bei *Mc4r*^{W16X} Mäusen ein Anstieg in der Futteraufnahme sowie eine Hyperphagie im Vergleich zu *Mc4r*^{wt} Mäusen festgestellt werden (Abbildung 6).Im Alter von vier, sechs und neun Wochen wurden alle Mäuse über drei Tage hinweg täglich untersucht. Neben Körpergewicht, Futteraufnahme und Körpertemperatur wurde zu Beginn die Körperzusammensetzung der Mäuse bestimmt. Die intensive Untersuchung der Mäuse führte vor allem bei *Mc4r*^{W16X} Mäusen zu einer verringerten Futteraufnahme im Beobachtungszeitraum. In Phasen der Ruhe nahm die tägliche Futteraufnahme der Mäuse wieder zu.

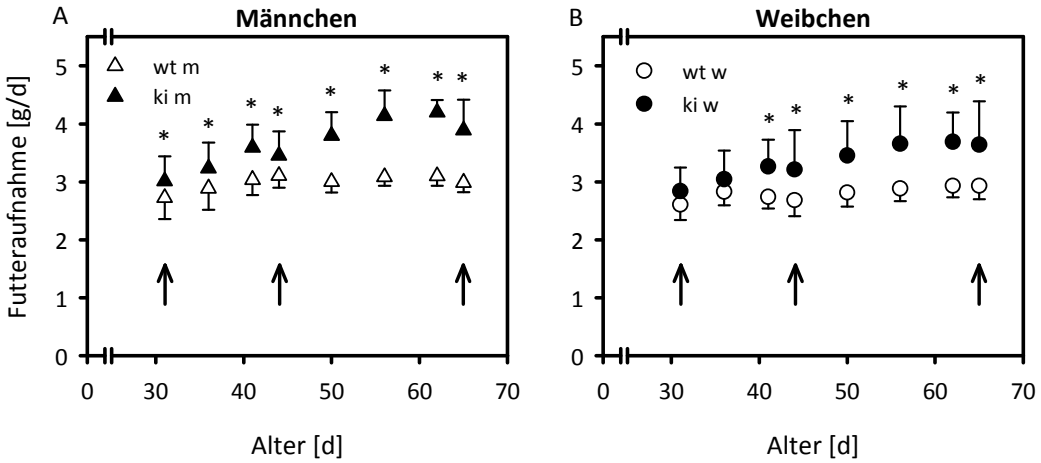

Abbildung 6 Durchschnittliche Futteraufnahme heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse
Über die gesamte Versuchsdauer hinweg wurde die Futteraufnahme der Versuchsmäuse aufgezeichnet. Dargestellt ist die mittlere Futteraufnahme über drei bis sechs Tage vor dem Messzeitpunkt, aufgeteilt nach männlichen (m, A) und weiblichen (w, B) Mäusen. Die Pfeile markieren den dreitägigen Versuchszeitraum im Alter von vier, sechs und neun Wochen in dem eine intensive tägliche Untersuchung der Mäuse erfolgte. In den Abbildungen sind jeweils *Mc4r*^{wt} (wt; m n=16; w n=16) und *Mc4r*^{W16X} Mäuse (ki; m n=13; w n=14) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholungen, dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Sterne markieren einen signifikanten Genotypeffekt (* $p < 0{,}05$).

Die statistische Auswertung des Zusammenhangs von Körpergewicht und Futteraufnahme erfolgte mittels Kovarianzanalyse (ANCOVA) mit dem Körpergewicht bzw. der metabolisch aktiven Körpermasse als Kovariate (Abbildung 7). Für beide Kovariaten konnte während der Phasen intensiven Handlings kein statistisch signifikanter Genotypeffekt auf die Energieaufnahme festgestellt werden. Die körpergewichtsadjustierte Futteraufnahme der *Mc4r*^{W16X} und *Mc4r*^{wt} Mäuse war in der Wachstumsphase vergleichbar und alle Mäuse nahmen eine ihrem Körpergewicht entsprechende Energiemenge auf (Abbildung 7A). Weibliche Mäuse neigten in der Jugendentwicklung zu einer höheren Futteraufnahme im Vergleich zu Männchen. Mit der metabolisch aktiven Körpermasse als Kovariate wurde diese Beobachtung gestärkt (Abbildung 7B). Nach Adjustierung der Daten konnte im Alter von neun Wochen eine Hyperphagie der *Mc4r*^{W16X} Mäuse gemessen werden. In einem weiteren Vergleich wurden kumulative Energieaufnahme und Körpergewichtszunahme während des gesamten Versuchszeitraumes gegenüber gestellt. Hierzu wurden beide Variablen in Kilojoule umgerechnet. Um das Wachstum aller Mäuse während des Versuchs zu berücksichtigen wurden die Ergebnisse der *Mc4r*^{wt} Mäuse als Referenz von den *Mc4r*^{W16X} Mäusen abgezogen. Der Körpergewichtsanstieg wurde primär als Zunahme von Fettmasse und einem Energieäquivalent von 30 kJ/g (Thomas, 1962; Wishnofsky, 1958) bewertet. Heranwachsende *Mc4r*^{W16X} Mäuse hatten demnach über den Versuchszeitraum hinweg eine erhöhte Energieaufnahme, die sich zum Teil in einem Anstieg des Körpergewichtes wieder spiegelt (Tabelle 10).

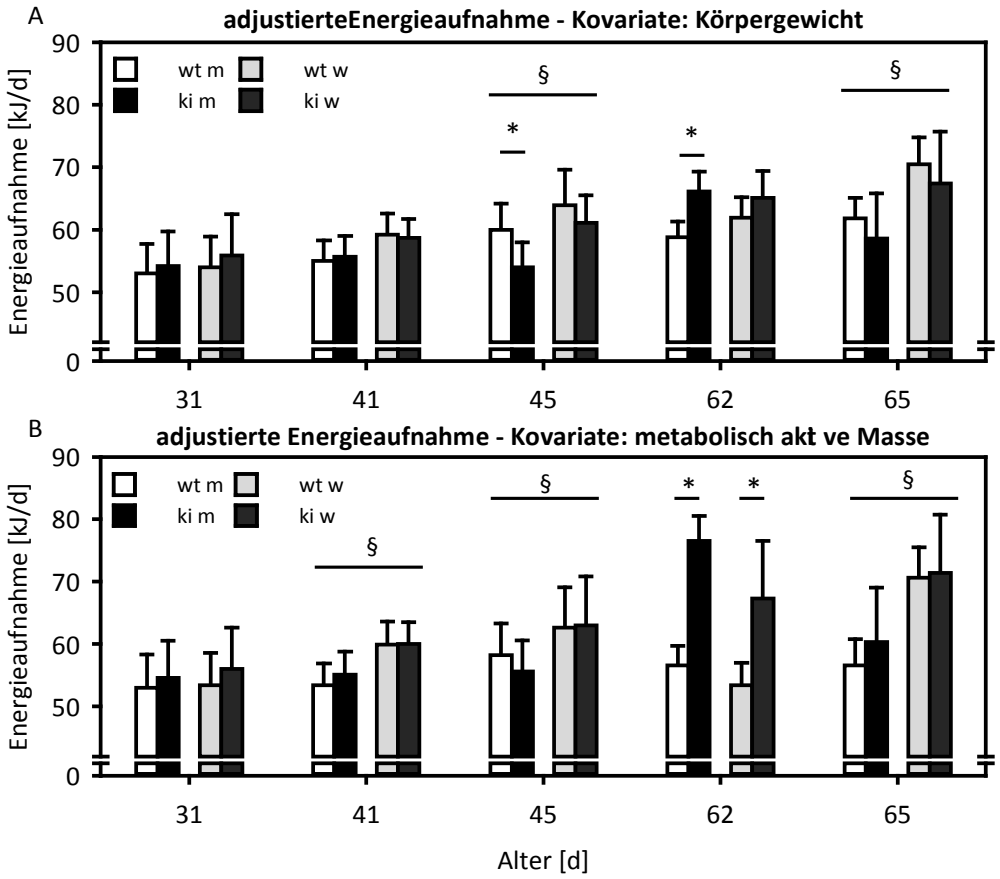

Abbildung 7 Adjustierte Energieaufnahme heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse
Adjustierte Futteraufnahme über drei Tage mit dem Körpergewicht (A) oder der metabolisch aktiven Körpermasse (B) als Kovariate. Es handelt sich um die Mäuse aus Abbildung 6. Die Energieaufnahme im Alter von 31, 45 und 65 Tagen repräsentiert Phasen intensiven Handlings, mit 41 und 62 Tagen wurde lediglich Körpergewicht und Nahrungsaufnahme der Mäuse bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholungen nach vorheriger ANCOVA. Dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung. Der Stern markiert einen signifikanten Genotypeffekt (* $p < 0{,}05$), das Paragraphenzeichen einen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern (§ $p < 0{,}05$).

Tabelle 10 Vergleich von Energieaufnahme und Körperenergiezuwachs junger *Mc4r*^{W16X} Mäuse
Aus der Differenz zur kumulativen Energieaufnahme der *Mc4r*^{wt} Mäuse wurde die zusätzliche Energieaufnahme von *Mc4r*^{W16X} Mäusen während des Versuchszeitraumes berechnet. Vergleichend dazu wurde der Körpergewichtsanstieg aller Mäuse in Kilojoule umgerechnet (Energiezuwachs) und ebenfalls gegen der der wildtypischen Mäuse verrechnet. Dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung.

Geschlecht	Genotyp	zusätzliche Energieaufnahme	täglicher Energiezuwachs
Männchen	ki	10,92 kJ/d + 5,53	5,56 kJ/d + 2,73
Weibchen	ki	8,60 kJ/d + 7,43	4,97 kJ/d + 2,44

Zusammenfassend ergibt sich somit, dass heranwachsende *Mc4r*^{W16X} Mäuse eine leicht erhöhte Nahrungsaufnahme hatten, die stressbedingten Schwankungen unterlag. Das Übergewicht der *Mc4r*^{W16X} Mäuse im entwickelte sich allerdings bevor eine Hyperphagie der Mäuse beobachtet wurde. Die Ursache für die initiale Gewichtszunahme der Mäuse konnte anhand der hier durchgeführten Messungen nicht festgestellt werden. Die Gewichtszunahme bzw. der Energiezuwachs der Mäuse über den gesamten Zeitraum entsprach zudem nicht vollständig der erhöhten Energieaufnahme. Die Mäuse

entwickelten über die Versuchsdauer hinweg einen kompensatorischen Mechanismus, überschüssig aufgenommene Nahrungsenergie zu verbrauchen.

Der Melanocortin 4 Rezeptor beeinflusst neben der Energieaufnahme auch den Energieumsatz (Balthasar et al., 2005). Zur vollständigen Charakterisierung der Mauslinie *Mc4r*^{W16X} wurde zusätzlich zur Energieaufnahme der Energieumsatz der Mäuse gemessen um dessen Beitrag zur initialen Gewichtszunahme zu bestimmen. Körpergewicht und Körperzusammensetzung haben einen unmittelbaren Einfluss auf den Energieumsatz. Zu den Untersuchungszeitpunkten bestand zwischen den Genotypen, ein minimaler (4 Wochen, 6 Wochen) oder ein großer Körpergewichtsunterschied (9 Wochen). Der Energieumsatz wurde mittels indirekter Kalorimetrie gemessen (siehe Abschnitt 2.2.5). Zusätzlich dazu wurde aus dem Quotienten von Kohlendioxidproduktion und Sauerstoffverbrauch die respiratorische Austauschrate (RER) bestimmt, die eine Aussage über die verstoffwechselten Makronährstoffe zulässt.

Bei allen Mäusen wurde ein diurnaler Rhythmus, mit erhöhtem Energieumsatz in der nächtlichen Aktivitätsphase im Vergleich zur Ruhephase am Tag, beobachtet (Abbildung 8). In Abhängigkeit vom steigenden Körpergewicht hatten ältere sowie *Mc4r*^{W16X} Mäuse ein höherer Energieumsatz als jüngeren oder *Mc4r*^{wt} Mäuse.

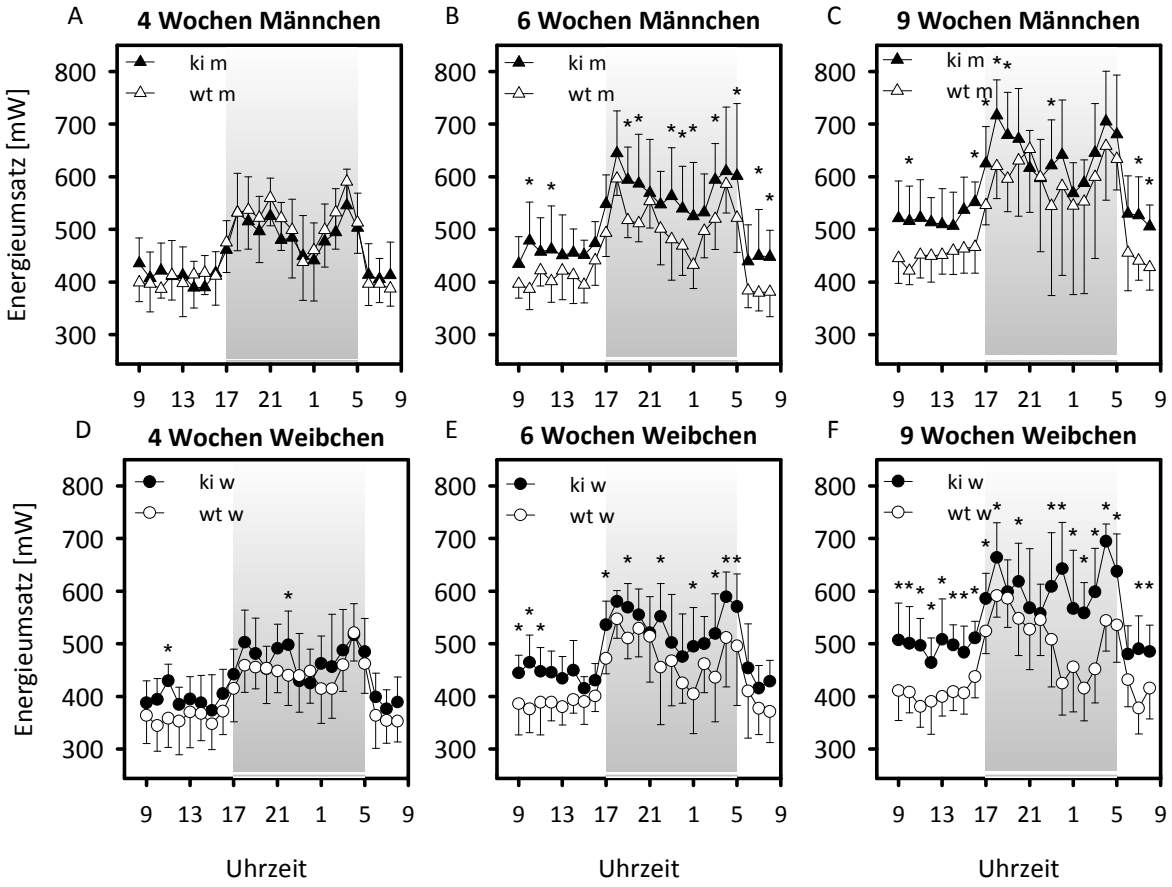

Abbildung 8 Verlaufskurven zum Energieumsatz juveniler *Mc4r*^{W16X} Mäuse über 24 Stunden
Energieumsatz von Männchen (A, B, C; wt n=9; ki n=11) und Weibchen (D, E, F; wt n=10; ki n=8) der Mauslinie *Mc4r*^{W16X} zu drei Zeitpunkten über 24 h. Grau hinterlegte Bereiche markieren die Nacht. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholungen, dargestellt sind Stundenmittelwerte + Standardabweichung. Sterne markieren einen signifikanten Genotypeffekt (* p <0,05).

In der Energiebalance ist der tägliche Energieumsatz (*daily energy expenditure*; DEE) das Gegengewicht zur täglichen Energieaufnahme. Wie bereits beim Verlauf des Energieverbrauches über 24 h angedeutet, hatten *Mc4r*^{W16X} Mäuse einen erhöhten DEE, der mit deren erhöhtem Körpergewicht korrelierte (Daten nicht gezeigt). Unter Berücksichtigung des Körpergewichtes (KG; Abbildung 9A) oder der metabolisch aktiven Masse (MM; Abbildung 9B) als Kovariate war bei Mäusen im Alter von vier oder sechs Wochen war kein Unterschied im DEE zwischen den Genotypen erkennbar. Im Alter von neun Wochen war der DEE nach Adjustierung auf die MM bei *Mc4r*^{W16X} Weibchen erhöht.

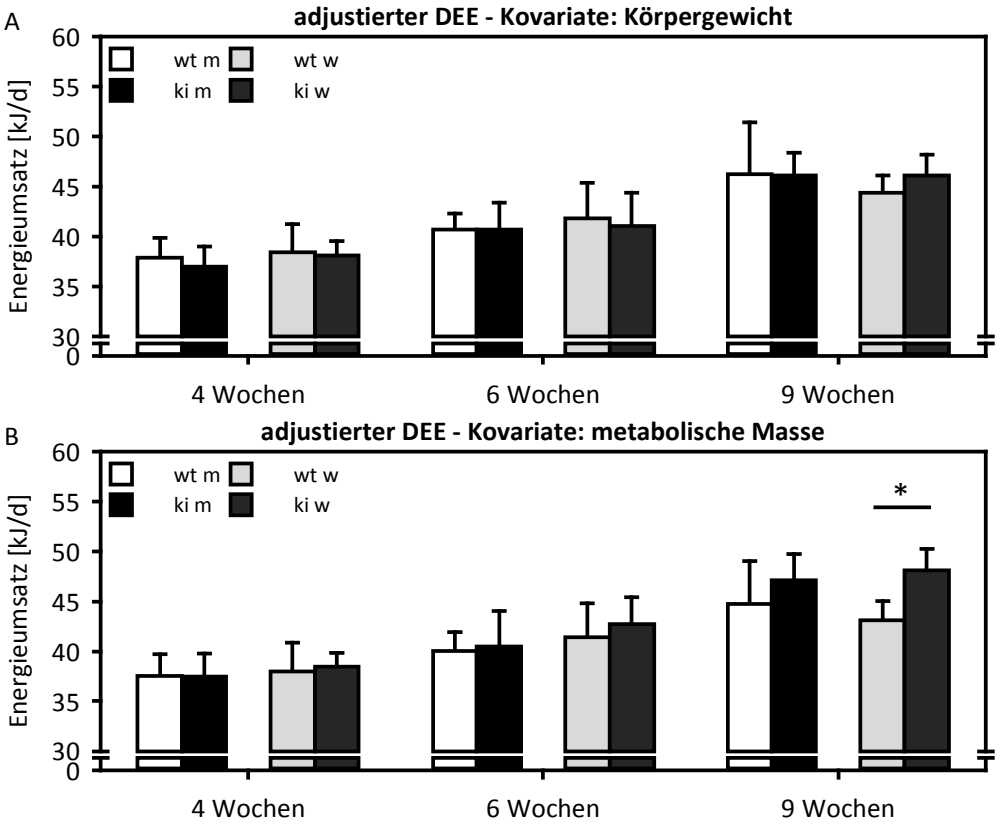

Abbildung 9 Adjustierter täglicher Energieumsatz heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse
Adjustierter täglicher Energieumsatz (DEE) nach ANCOVA aufgeteilt nach Männchen (wt: n=9; ki: n=11) und Weibchen (wt: n=10; ki: n=8) sowie dem Alter entsprechend. Körpergewicht (A) oder metabolisch aktive Masse (B) des jeweiligen Tieres dienten als Kovariate. Die statistische Auswertung der adjustierten Daten erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA, dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung. Der Stern markiert einen signifikanten Genotypeffekt (* $p < 0{,}05$).

Die im vorangegangenen Abschnitt gemessene Hyperphagie der *Mc4r*^{W16X} Mäuse könnte somit zum Teil durch einen erhöhten täglichen Energieumsatz kompensiert werden. Darüber hinaus zusätzlich aufgenommene Nahrungsenergie resultierte in einem Anstieg des Körpergewichtes der Mäuse. Die Anpassung des Energieumsatzes erfolgte allerdings erst nach Einsetzen der Gewichtszunahme.

Eine Komponente des täglichen Energieumsatzes ist die Ruhestoffwechselrate (*resting metabolic rate*; RMR). Sie spiegelt den Energieumsatz wieder der zur Aufrechterhaltung der basalen Körperfunktionen notwendig ist und beinhaltet unter anderem thermoregulatorische Mechanismen. Da unter anderem die Körpertemperatur tageszeitlichen Schwankungen unterliegt, wird im Folgenden die RMR für Tag und Nacht getrennt betrachtet. Sowohl in der Nacht, als auch am Tag war die Ruhestoffwechselrate neun Wochen alter *Mc4r*^{W16X} im Vergleich zu *Mc4r*^{wt} Mäusen erhöht (Abbildung 10A). Dieser Effekt resultierte in erster Linie aus dem erhöhten Körpergewicht der Mäuse, was wiederum auch den

Geschlechtsunterschied in der Ruhestoffwechselrate erklärt. Nach Adjustierung der RMR auf die metabolisch aktive Masse blieb vor allem in der Nacht ein Genotypeffekt bestehen (Abbildung 10B). In Ruhe hatten heranwachsende *Mc4r*^{W16X} Mäuse beider Geschlechter somit nachts eine erhöhte Stoffwechselrate. Ursache eines erhöhten täglichen Energieumsatzes heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse scheint somit ein erhöhter Ruheumsatz zu sein. Welche Komponente der RMR zum beobachteten Phänotyp führte konnte mit den durchgeführten Untersuchungen nicht festgestellt werden.

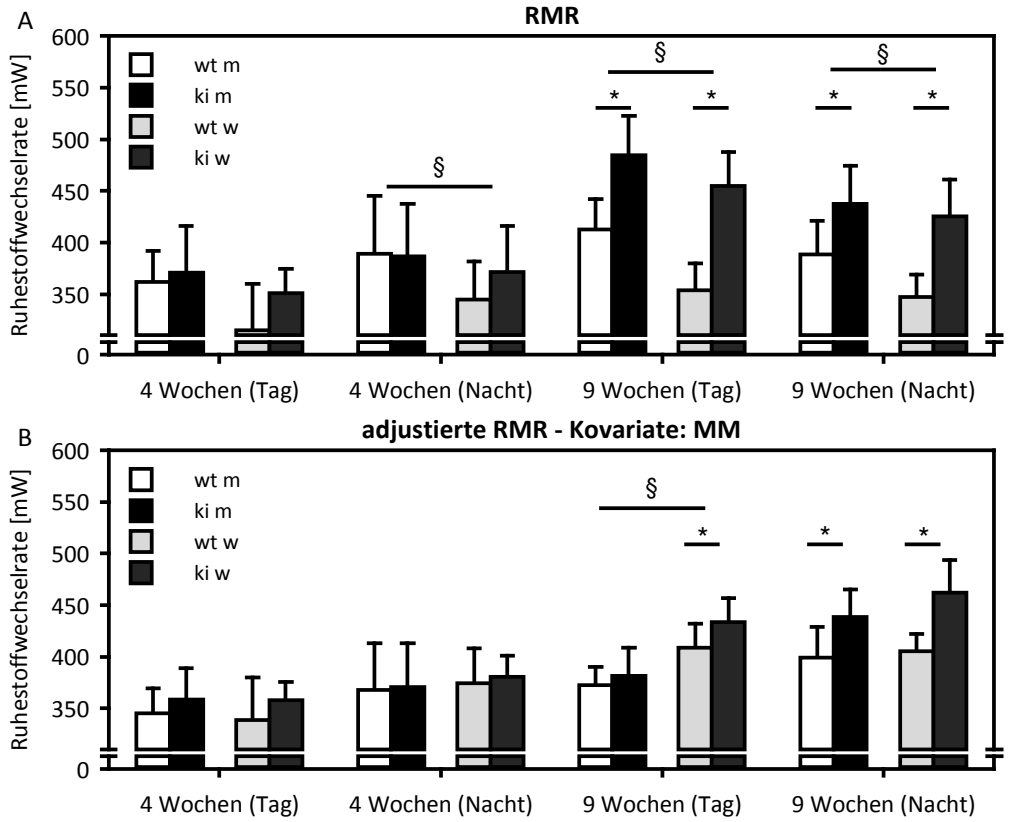

Abbildung 10 Ruhestoffwechselrate heranwachsender *Mc4r*^{W16X} Mäuse
Ruhestoffwechselrate (*resting metabolic rate*; RMR; A) sowie adjustierte RMR (B) von vier und neun Wochen alten *Mc4r*^{wt} (wt) und *Mc4r*^{W16X} (ki) Mäusen beider Geschlechter, aufgeteilt nach Lichtphase und Genotyp (Männchen: m wt n=9; ki n=11; Weibchen: w wt n=10; ki n= 8). Die Adjustierung erfolgte mit der metabolisch aktiven Körpermasse (MM) als Kovariate. Die statistische Auswertung der adjustierten Daten erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA, dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung. Sterne markieren einen signifikanten Genotypeffekt (* $p < 0{,}05$), das Paragraphenzeichen einen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern (§ $p < 0{,}05$).

In Ergänzung zum Energieumsatz wurde die Respiratorische Austauschrate (RER) bestimmt, die Aufschluss über die verstoffwechselten Makronährstoffe eines Organismus gibt. Sie unterliegt physiologischen Schwankungen zwischen 0,7 (Fettstoffwechsel) und 1,0 (Kohlenhydratstoffwechsel) und spiegelt damit Aktivität bzw. Nahrungsaufnahme wieder. Bei Weibchen im Alter von sechs und neun Wochen waren vor allem in der zweiten Nachthälfte signifikante Genotypunterschiede in der RER erkennbar (Abbildung 11E und F). Weitere genotypspezifische Unterschiede konnten nicht festgestellt werden. Die erhöhte RER deutet auf eine länger andauernde Nahrungsaufnahmephase der *Mc4r*^{W16X} Weibchen hin, welche durch eine vermehrte Anzahl von Mahlzeiten zur beobachteten Hyperphagie führen könnte.

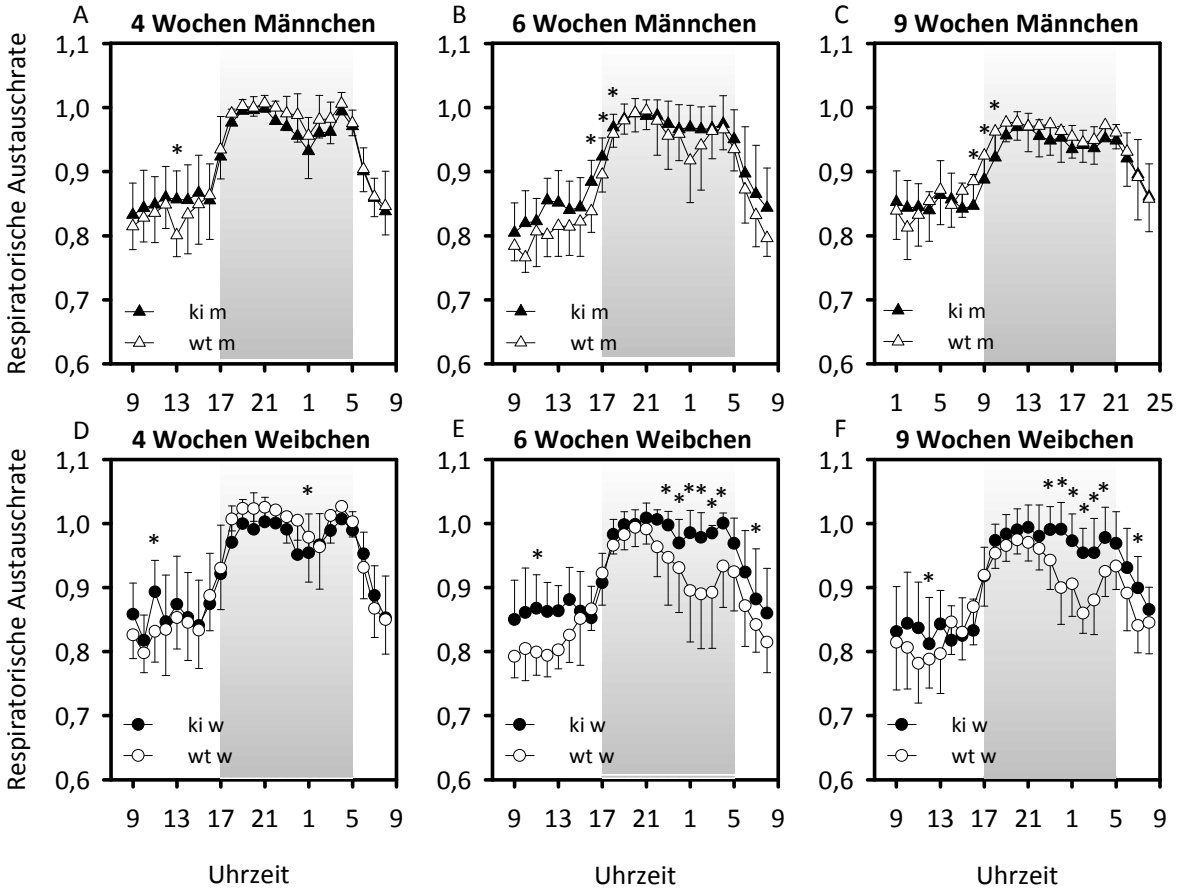

Abbildung 11 Zeitlicher Verlauf der Respiratorischen Austauschrate juveniler *Mc4r*^{W16X} Mäuse
Die Respiratorische Austauschrate (RER) von Männchen (A, B, C; wt n=9; ki n=11) und Weibchen (D, E, F; wt n=10; ki n=8) der Mauslinie *Mc4r*^{W16X} zu drei Zeitpunkten über 24 h. Grau hinterlegte Bereiche markieren die Dunkelphase. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholungen, dargestellt sind Stundenmittelwerte + Standardabweichung. Sterne markieren einen signifikanten Genotypeffekt (* p <0,05).

Die durchgeführten Untersuchungen zur Energiebilanzierung haben gezeigt, dass sich die Adipositas junger *Mc4r*^{W16X} Mäuse schleichend entwickelte. In den durchgeführten Messungen entsprach sowohl die Nahrungsaufnahme, als auch der Energieumsatz dem aktuellen Körpergewicht der Mäuse. Erst durch Adjustierung der erhobenen Daten auf die metabolisch aktive Körpermasse konnte eine erhöhte Energieaufnahme der *Mc4r*^{W16X} Mäuse über den gesamten Versuchszeitraum hinweg festgestellt werden. Diese war jedoch stark stressabhängig. Bei intensivem Handling hatten vor allem *Mc4r*^{W16X} Mäuse eine reduzierte Nahrungsaufnahme. Die Ursache des initialen Körpergewichtsanstieges konnte nicht identifiziert werden. Ihm folgten eine erhöhte Nahrungsaufnahme sowie eine nächtlich erhöhte Ruhestoffwechselrate und sowie ein Anstieg des täglichen Energieumsatzes. Die erhöhte Nahrungsaufnahme könnte durch eine erhöhte Mahlzeitenfrequenz verursacht sein. Um die Quelle der erhöhten Ruhestoffwechselrate sowie die Mahlzeitenfrequenz zu identifizieren würde die kontinuierliche Aufzeichnung von Körpertemperatur, Aktivität sowie Nahrungsaufnahme die hier gewonnenen Erkenntnisse um wertvolle Zusatzinformationen ergänzen. Diese Messungen sind zudem stressfrei für die Mäuse, weswegen wir nur eine geringe Varianz innerhalb der Messwerte erwarten.

3.1.2 *Mc4r*^{W16X} - Screening an der GMC

Bei der Mauslinie *Mc4r*^{W16X} handelt es sich um ein *knockin* Mausmodell mit einer Mutation, die in adipösen Patienten identifiziert wurde. Primär wurde die Mauslinie zur Therapie von Krankheiten generiert, die durch vorzeitige Stoppmutationen verursacht werden. Im Gegensatz zu *Mc4r knockout* Modellen ist die genomische Sequenz des *Mc4r* bei den Mäusen noch vollständig erhalten und die Mauslinie gilt als ein Modell für eine humane Mutation die zu einem beschriebenen Krankheitsbild führt. Unter diesem Aspekt erfolgte die umfassende Charakterisierung der Mauslinie *Mc4r*^{W16X} an der deutschen Mausklinik (German Mouse Clinic; GMC). Des Weiteren dienten die Untersuchungen der Identifizierung von Merkmalen die sich in Folge der Mutation aber unabhängig vom adipösen Phänotyp entwickelten. Die GMC wurde ebenfalls innerhalb des Nationalen Genomforschungsnetzwerks etabliert und gehört einem internationalen Verbund von Mauskliniken an, in dem mit standardisierten Protokollen Mauslinien umfassend charakterisiert und archiviert werden (Fuchs et al., 2009; Gailus-Durner et al., 2005). Die Phänotypisierung erfolgt unentgeltlich im Rahmen einer wissenschaftlichen Kollaboration. Sie umfasst im sogenannten Primärscreen mehr als 550 Parameter pro Maus in den Bereichen Allergie, Auge (Entwicklung und Sicht), Dysmorphie (Knochen und Knorpel), Herz-Kreislauf, Immunologie, klinische Chemie, Lungenfunktion, molekulare Phänotypisierung, Energiehaushalt, Neurologie, Nozizeption, Pathologie, Steroidstoffwechsel und Verhalten. Die Untersuchung von Mäusen an der GMC beginnt im Alter von neun Wochen mit Verhaltenstests und endet im Alter von 21 Wochen mit der pathologischen Untersuchung.

Die Ergebnisse der *Mc4r*^{W16X} Mäuse aus dem Primärscreen bestätigten den adipösen Phänotyp, der durch erhöhtes Körpergewicht, vermehrtes Längenwachstum und erhöhte Fettmasse gekennzeichnet war (Tabelle 11 nach Fuchs et al. (2014)). Im Screen wurden zusätzlich Veränderungen von Knochendichte, Knochenmineralgehalt, Bewegungsfreudigkeit, diverser Blutparameter, Glukosetoleranz und Leberhistologie festgestellt, die alle auf den adipösen Phänotyp der Mutanten und Defekte der Leptin vermittelten Melanocortin 4 Rezeptor Aktivierung zurückzuführen waren. Daneben wurden auch Veränderungen beobachtet, die nicht durch die Fettleibigkeit der Mäuse oder den MC4R-Defekt erklärt werden konnten. Hierzu zählten unter anderem eine verringerte Augengröße der weiblichen Mutanten, Anzeichen einer erhöhten Ängstlichkeit der *Mc4r*^{W16X} Mäuse (z. B. Schwanzaufrichten und verringerter Aufenthalt im Zentrum des *Open Fields*) sowie veränderte Steroid-Spiegel. Im Verhaltensscreen wurde der ängstliche Phänotyp an 5 weiteren weiblichen Mäusen pro Genotyp untersucht. Hierzu wurden die Mäuse für 5 Minuten in enge Röhren gesetzt und anschließend die Aktivität im *Open Field* untersucht. Auch hier zeigten die *Mc4r*^{W16X} Mäuse ein ängstlicheres Verhalten als die Wildtypen. Um einen Effekt des Körpergewichtes sicher ausschließen zu können und die Aussagekraft der genannten Untersuchungen zu stärken wäre eine Kontrollgruppe mit erhöhtem Körpergewicht, vergleichbar mit dem der Mutanten, hilfreich.

Tabelle 11 Phänotypische Auffälligkeiten der *Mc4r*^{W16X} Mutanten im GMC-Screen
Aufgeführt sind ausschließlich Screens bei denen Unterschiede zwischen Mutanten und Wildtypen aufgefallen sind. Die aufgeführten Unterschiede beziehen sich immer, wen nicht anders angegeben, auf die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Ergebnisse entsprechen einer Zusammenfassung von Tabelle 14 und Tabelle 16 des GMC-Abschlussberichtes (Fuchs et al., 2014). Im nachfolgenden sind die Bezeichnungen der abgekürzten Screens zu finden: PPI/ASR: Präpulsinhibition/ akustische Startle-Reaktion; EKG: Echokardiographie; Calo: indirekte Kalorimetrie (TSE)

Screen	Parameter	Phänotypbeschreibung	Alter [d]
Dysmorphie, Knochen und Knorpel	Dexa	Knochenmineraldichte, Knochenmineralgehalt und Knochengehalt bei Weibchen erhöht, Körperlänge, Körpergewicht und Fettmasse beider Geschlechter erhöht, fettfreie Masse bei Weibchen verringert	124
Verhalten	Open Field	geringere Bewegungsfreudigkeit, zurückgelegte Strecke und Aufenthalt im Zentrum, Erkundungsaktivität der Weibchen erhöht, gegenteiliges Verhalten innerhalb der männlichen Mäuse	61
	PPI/ASR	verringerte akustische Startle-Reaktion bei den Mutanten	68
Neurologie	modifizierter SHIRPA	verringerte Bewegungsfreudigkeit, weniger Aufrichten und weniger Aufrichten des Schwanzes	61
	Laktat	niedrigere Laktatspiegel	
Auge	Augengröße	geringere Augengröße bei weiblichen Mutanten	110
Nozizeption	Hitzeplatte	Hypoalgesie	82
Metabolismus	Calo	hypometabol, hypoaktiv	89
	Minispec	erhöhtes Körpergewicht und Körperfettgehalt, fettfreie Masse verringert	89
klinische Chemie und Hämatologie	klinische Chemie (gefüttert)	Plasmalipid-, -glukose- und -proteinspiegel erhöht (nur Weibchen), erhöhte Kalzium-, Phosphat- und Eisen-spiegel, erhöhte Leberenzym- und Amylase-Aktivität in den Mutanten, geschlechtsspezifische Effekte der ALP Aktivität	117
	Hämatologie	verschiedenste Blutwerte vermutlich durch Unterschiede in Osmolarität in Mutanten verändert	117
	ipGTT	Tendenz zu geringerem Körpergewichtsverlust als erwartet, erhöhte Nüchternglukosewerte in Mutanten, verschlechterte Glukosetoleranz bei Männchen, nur geringer Effekt in Weibchen	96
	klinische Chemie (gefastet)	Erhöhte Plasmalipid- und Glukose-Konzentrationen, geschlechtsspezifische Unterschiede in NEFA, Glyzerol, HDL und nicht HDL-Cholesterol	75
Immunologie	Durchfluss-zytometrie	Anzahl der NK Zellen reduziert, mehr Monozyten und veränderte B-Zell-Aufteilung	117
Allergie	TEWL	verringerter transepidermaler Wasserverlust (TEWL)	117
Steroide	Steroidspiegel	Genotypspezifischer Unterschied in Steroidhormonen, geschlechtsspezifischer Unterschied in Corticosteroidspiegeln	117
Herz-Kreislauf	EKG	Geringer Unterschied in dias. Septumdicke und systolischer Hinterwanddicke bei Männchen, dias. Hinterwanddicke bei Weibchen leicht erhöht	103
Pathologie	Makroskopie	signifikant erhöhtes Körpergewicht, Tibialänge, Lebergewicht, Herzgewicht, und Milzgewicht bei Mutanten beider Geschlechter	180
	Mikroskopie	Anzeichen einer Leberverfettung in allen Mutanten, Hyperplasie der pankreatischen Inseln bei einem Weibchen sowie allen Männchen	180

Im Rahmen der GMC-Untersuchungen wurde erneut der Energieumsatz der *Mc4r*^{W16X} Mäuse gemessen. Nach Adjustierung auf das Körpergewicht konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden, mit der metabolisch aktiven Körpermasse dagegen waren *Mc4r*^{W16X} Mäuse hypometabol (Abbildung 12). Für die Auswertung der Daten wurde der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch der Mäuse während der Messung zu Grunde gelegt. Wie in den eigenen Untersuchungen hatten Weibchen einen höheren Sauerstoffverbrauch als Männchen des gleichen Genotyps. In den eigenen Untersuchungen dagegen war der Sauerstoffverbrauch innerhalb der Geschlechter identisch. In der GMC Kohorte wurde zudem eine geringere fettfreie Masse (FFM) gemessen während die eigene Kohorte eine erhöhte FFM hatte. Da der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch in beiden Fällen auf die metabolisch aktive Körpermasse adjustiert wurde, hatten die gemessene FM folglich einen direkten Einfluss auf die adjustierten Werte.

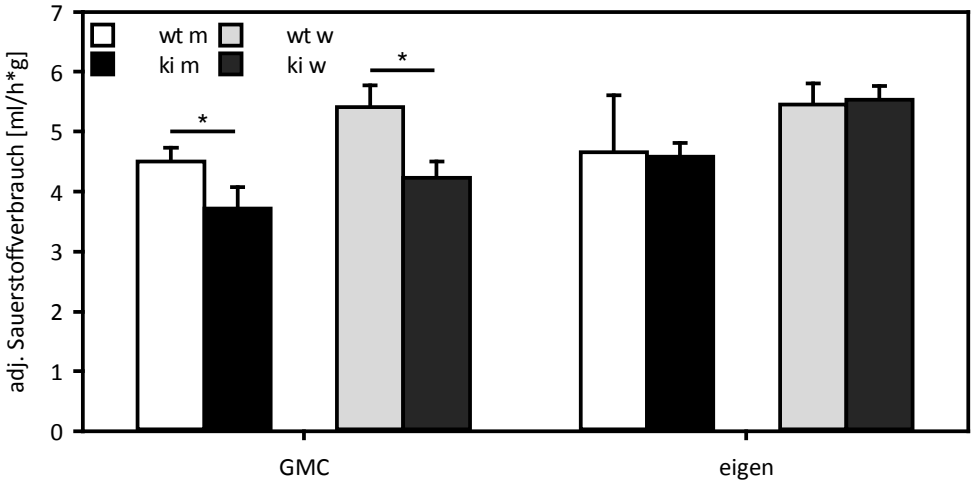

Abbildung 12 Sauerstoffverbrauch von *Mc4r*^{W16X} Mäusen
Im Rahmen des metabolischen Screens der GMC (A) oder in den eigenen Untersuchungen (B; 9 Wochen alte Mäuse) wurde der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch während eines Messtages ermittelt. Für die statistische Auswertung wurden die Werte auf die metabolisch Aktive Körpermasse adjustiert. Die Daten der GMC Messung entsprechen Abbildung 58 des Abschlussberichtes (Fuchs et al., 2014), die Auswertung und grafische Darstellung der eigenen Ergebnisse erfolgte analog zur GMC Auswertung. Abgebildet sind Mittelwert + Standardabweichung. Sterne markieren einen signifikanten Genotypeffekt (* p <0,05).

In den eigenen Untersuchungen wurde bei neun Wochen alten *Mc4r*^{W16X} Mäusen viel mehr eine Tendenz zu einer hypermetabolen Stoffwechsellage erkennbar (Abbildung 10B; Abbildung 9; Abbildung 12). Die Messungen zum Energieumsatz der *Mc4r*^{W16X} Mäuse aus dem metabolischen Screen der GMC und den eigenen Untersuchungen zeigen somit widersprüchliche Ergebnisse.

Des Weiteren konnte an der GMC bei den untersuchten *Mc4r*^{W16X} Mäusen eine geringere Nahrungsaufnahme und ein erhöhter Brennwert des Kotes im Vergleich zu *Mc4r*^{wt} Mäusen festgestellt werden. Die Mäuse schieden demnach während der Messungen in der indirekten Kalorimetrie mehr Energie aus und fraßen zudem weniger. Im Unterschied zu den eigenen Brennwertanalysen wurden die Untersuchungen an der Mausklinik mittels Fourier-Transformation Infrarot-Spektroskopie (FTIR) bestimmt. Die gemessenen FTIR-Spektren können den Makronährstoffen sowie diversen unverdaulichen Futterbestandteilen zugeordnet werden, wodurch mit dieser Methode primär die Zusammensetzung des Kotes bestimmt wird. Durch eine Referenzbibliothek wurde in zweiter Instanz der Brennwert des Kotes kalkuliert. Sowohl in den eigenen Untersuchungen als auch in der Publikation

von Bolze et al. (2013) konnte mittels direkter Brennwertbestimmung in der Bombenkalorimetrie kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden.

Erhöhte Steroidspiegel und einer erhöhten Ängstlichkeit der *Mc4r*^{W16X} Mäuse sind somit wertvolle ergänzende Ergebnisse des GMC Screens. Diese deuten auf eine erhöhte Stressempfindlichkeit der *Mc4r*^{W16X} gegenüber *Mc4r*^{wt} Mäusen hin, die sich voraussichtlich unabhängig vom adipösen Phänotyp der Mäuse sondern auf Grund der MC4R-Defizienz entwickelte. Dies wird gestützt durch die verringerte Nahrungsaufnahme der *Mc4r*^{W16X} Mäuse im metabolischen Screen sowie in den eigenen Untersuchungen während der Phasen intensiven Handlings. Die reduzierte Nahrungsaufnahme wiederum beeinflusste vermutlich den Energieumsatz während der Messungen, woraus eine hypometabole Stoffwechsellage der *Mc4r*^{W16X} Mäuse resultierte.

Die initiale Ursache für den Körpergewichtsanstieg in früher jugend konnte mit den hier durchgeführten Messungen nicht identifiziert werden. Ihm folgte eine erhöhte Nahrungsaufnahme, die stressbedingten Schwankungen unterlag. Ob dieser hormonelle Veränderungen vorausgingen, die zur initialen Akkumulation von Fettmasse führten ist nicht klar. Die GMC Untersuchungen bestätigten, dass *Mc4r*^{W16X} Mäuse empfindlich auf Stress reagieren, was vermutlich auf die erhöhten Steroidspiegel zurückzuführen war. Mit fortschreitendem Übergewicht wurden zudem Anpassungen des Energieumsatzes festgestellt. Auch im metabolischen Screen der GMC zeigten sich *Mc4r*^{W16X} Mäuse als ausgesprochen stresssensitiv. Die ungewohnte Messumgebung führte zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme, was wiederum in einer hypometabolen Stoffwechsellage resultierte. Die untersuchten Mäuse zeigten somit, dass Nahrungsaufnahme nicht nur einer langfristigen Regulation durch das Leptin-Melanocortin-System sondern einer vielfältigen hormonellen Regulation unterliegt, an der unter anderem auch Glucocorticoide beteiligt sind.

3.2 FAT MASS AND OBESITY ASSOCIATED - *FTO*

Polymorphismen im ersten und zweiten Intron des FTO-Gens zeigen eine der stärksten Assoziationen mit erhöhtem BMI (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007). Wie und ob FTO die Entwicklung von Adipositas beeinflusst ist nicht geklärt. Unter diesem Aspekt wurde im Rahmen dieser Arbeit, der Einfluss von FTO auf Komponenten des Energiehaushaltes untersucht, mit dem Ziel den Mechanismus aufzuklären, durch den FTO zur Entwicklung von Adipositas beitragen könnte. Hierzu wurden zwei Mauslinien verglichen und eine davon umfassend phänotypisiert (vgl. Abbildung 3). Bei der Mauslinie *Fto*$^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ (*Fto*^{tm1a}) handelte es sich um eine sogenannte *knockout-first* Mauslinie aus dem europäischen konditionalen Mausmutagenese Programm (EUCOMM). Der *knockout* wird bei dieser Mauslinie durch Insertion einer Genfalle mit Reportergen erreicht, die zum vorzeitigen Abbruch der Transkription führt. Die Mauslinie *Fto*^{tm1b} wurde durch Verpaarung der Mauslinie *Fto*^{tm1a} mit einer Cre-deleter Linie generiert. Die Cre-vermittelte Rekombination führte zur Deletion von Exon 3 und einer Verschiebung des offenen Leserahmens, was eine starke Verkürzung des FTO Proteins und Verlust der funktionellen Domänen zur Folge hatte. Da es sich in beiden Fällen um recht neue Mauslinien handelte, fand im Rahmen dieser Arbeit sowohl eine basale Charakterisierung, als auch eine metabolische Phänotypisierung der geeigneten Mauslinie statt. Untersucht wurden Komponenten des Energieumsatzes sowie die Energieaufnahme der Mäuse.

3.2.1 *Fto* - basale Körperkenndaten und Vergleich der Modelle

Ein Vergleich des Körpergewichtes acht Wochen alter Mäuse beider untersuchten Mauslinien ergab ein signifikant reduziertes Körpergewicht homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse (Abbildung 13). Homozygote *Fto*^{tm1a} Mäuse sowie *Fto*^{wt} und heterozygote *Fto*^{tm1b} Mäuse hatten dagegen ein vergleichbares Körpergewicht sowie eine ähnliche Körperzusammensetzung und Körperlänge (Abbildung 14). Bei homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäusen konnte dagegen eine reduzierte fettfreie Masse sowie eine verringerte Körpergröße festgestellt werden. Insgesamt zeichneten sich *Fto*^{tm1b} Mäuse durch einen kleinwüchsigen Phänotyp aus, deren Körpergröße dem reduzierten Körpergewicht entsprach. Die Fettmasse aller untersuchten Mäuse war identisch. Das reduzierte Körpergewicht der *Fto*^{tm1b} Mäuse konnte somit durch eine geringere fettfreie Masse und eine verringerte Körpergröße erklärt werden.

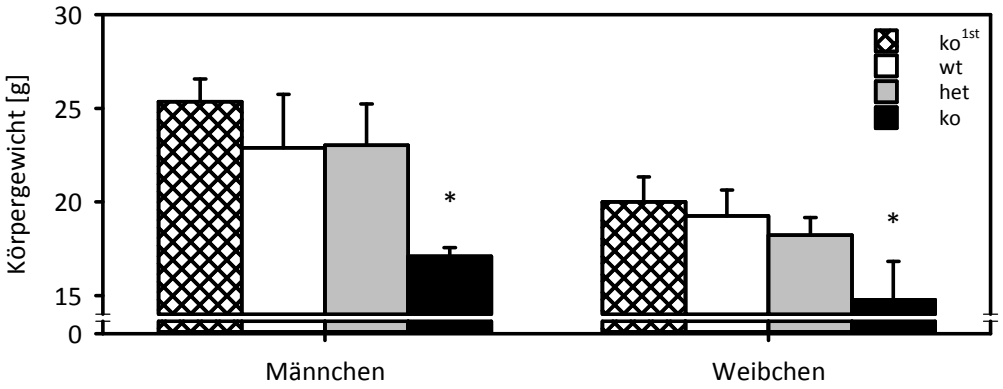

Abbildung 13 Körpergewichte von *Fto*^{tm1a} und *Fto*^{tm1b} Mäusen im Alter von 8 Wochen
Körpergewicht homozygoter *Fto*^{tm1a} (ko^{1st}) Mäuse im Vergleich zu *Fto*^{tm1b} Mäusen (wt, het, ko) beiderlei Geschlechts und aller Genotypen. Die untersuchten Mäuse verteilten sich wie folgt auf Genotyp und Geschlechter: ko^{1st} m n=9; wt m n=3, het m n=3, ko m n=3, ko^{1st}w n=5, wt w n=7, het w n=4, ko w n=6. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Einwege-ANOVA, dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung. Der Stern markiert einen signifikanten Genotypeffekt (* $p < 0{,}05$).

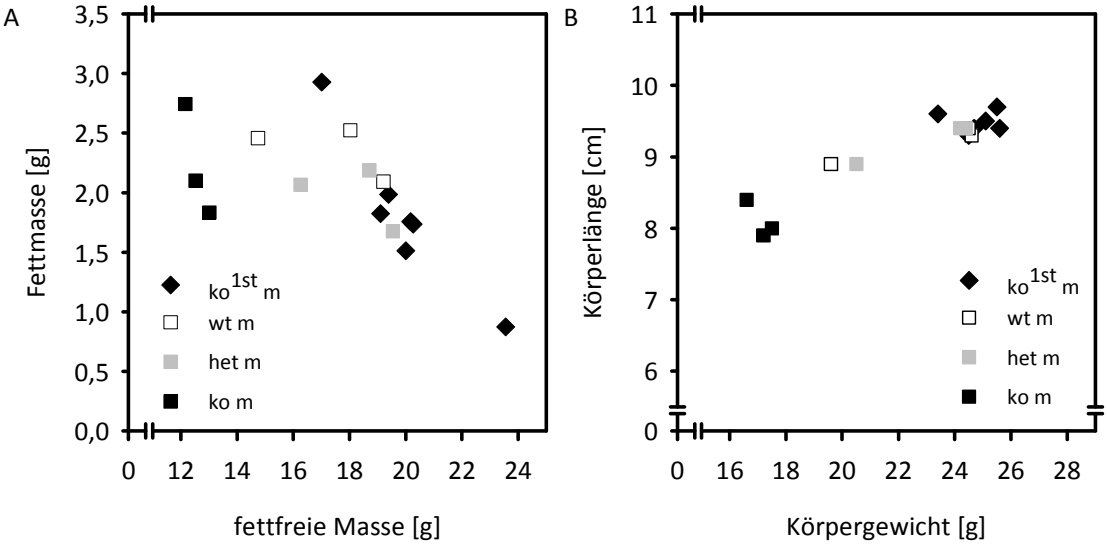

Abbildung 14 Körperzusammensetzung und –länge von Männchen beider *Fto*-Linien
Fettfreie Masse und Fettmasse von Einzeltieren gemäß NMR-Spektroskopie (A) und Körperlänge als Schnauzen-Anus-Länge unmittelbar nach dem Abtöten (B). In beiden Abbildungen sind acht Wochen alte homozygote *Fto*^{tm1a} Männchen (ko^{1st}) zum Vergleich mit *Fto*^{tm1b} Männchen aller Genotypen (wt, het, ko) dargestellt.

3.2.2 *Fto* - Nachweis von *Fto* mRNA und Protein

Die Unterschiede in Körpergewicht und –zusammensetzung zwischen homozygoten *Fto*^{tm1a} und *Fto*^{tm1b} Mäusen ließ die Frage offen, ob das *knockout-first* Konstrukt zum beabsichtigten *knockout* von FTO in der Mauslinie *Fto*^{tm1a} führte. Um den Phänotyp der Mäuse auf molekularer Basis aufzuklären, wurden mRNA und Protein aus Hypothalamus-Proben extrahiert. Im Western Blot zum Nachweis von FTO-Protein konnte in Proben der homozygoten Mäuse beider Linien kein Protein gemessen werden (Abbildung 15).

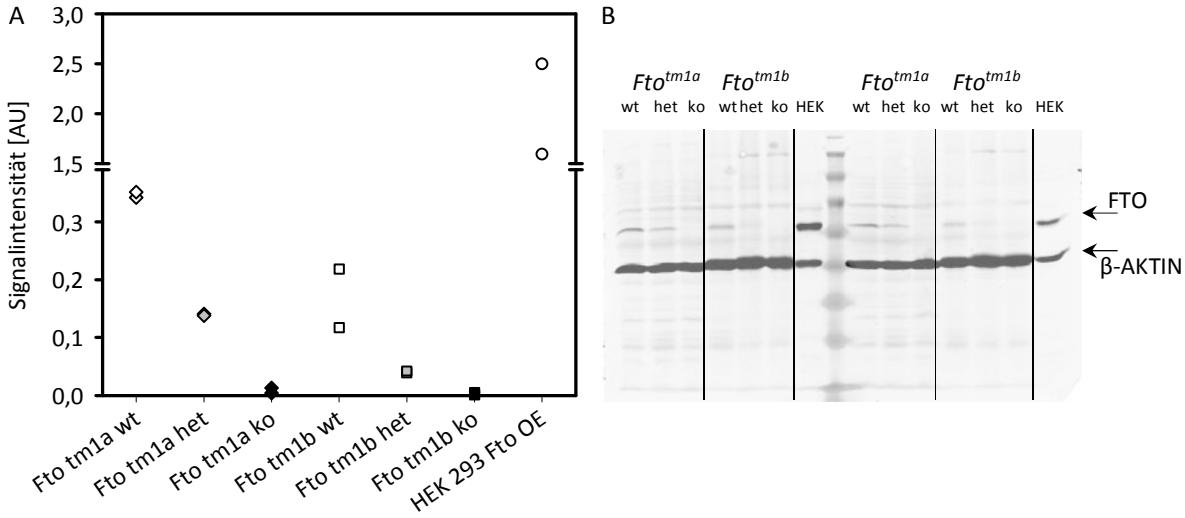

Abbildung 15 Western Blot mit Proteinisolationen aus murinem Hypothalamus und HEK 293 Zellen
Standardisierte und normalisierte Quantifizierung (A) sowie Original Western Blot (B) der Hypothalamusextrakte von 6 Individuen (50 µg Protein) und Proteinextrakt aus HEK 293 Zellen mit FTO Überexpressionsvektor (HEK293 FTO OE; 10 µg Protein). Es handelte sich um technische Duplikate die zu beiden Seiten des Größenmarkers aufgetragen sind. Die Signalstärken wurden auf β-Aktin normalisiert.

Durch das eingefügte *knockout-first* Konstrukt und die Wahl der *Primer* erwarteten wir bei homozygoten *Fto*^{tm1a} Mäusen ausschließlich ein Produkt bei Verwendung der *Primer* A und E, welche in Exon 2 (A) und der eingefügten Genfalle (E) banden (Abbildung 16A). Zur Kontrolle wurden zwei weitere Primerpaare verwendet, die ausschließlich Produkte auf wildtypischer cDNA generierten sollten und deren Bindestellen in Exon 2 (A) und Exon 3 (B) sowie in Exon 8 (C) und Exon 9 (D) lagen. Mit allen drei Primerpaaren konnten in cDNA homozygoter *Fto*^{tm1a} Mäusen Produkte identifiziert werden (Abbildung 16B). Da sich sowohl mit *Primer*paaren AB, als auch mit CD, ein wildtypisches PCR-Produkt im Agarosegel nachweisen ließ, wurde davon ausgegangen, dass in dieser Mauslinie ein alternatives Spleißen stattfand.

Homozygote Träger des *Fto*^{tm1a}-Allels besaßen somit scheinbar eine Rest-Aktivität des FTO-Proteins, die zu einem wildtyp-Phänotyp homozygoter Mäuse führte. Die Menge des gebildeten Proteins war scheinbar ausreichend für ein normales Körperwachstum, lag aber unterhalb der Nachweisgrenze für einen Western Blot. Die Mauslinie entsprach demnach einer *knockdown*-Linie für FTO. Zur Untersuchung eines Gen-*knockouts* und seinen Auswirkungen auf den Energiehaushalt war die Mauslinie somit ungeeignet. Aus diesem Grund wurde für weitere Experimente die Mauslinie *Fto*^{tm1b} verwendet.

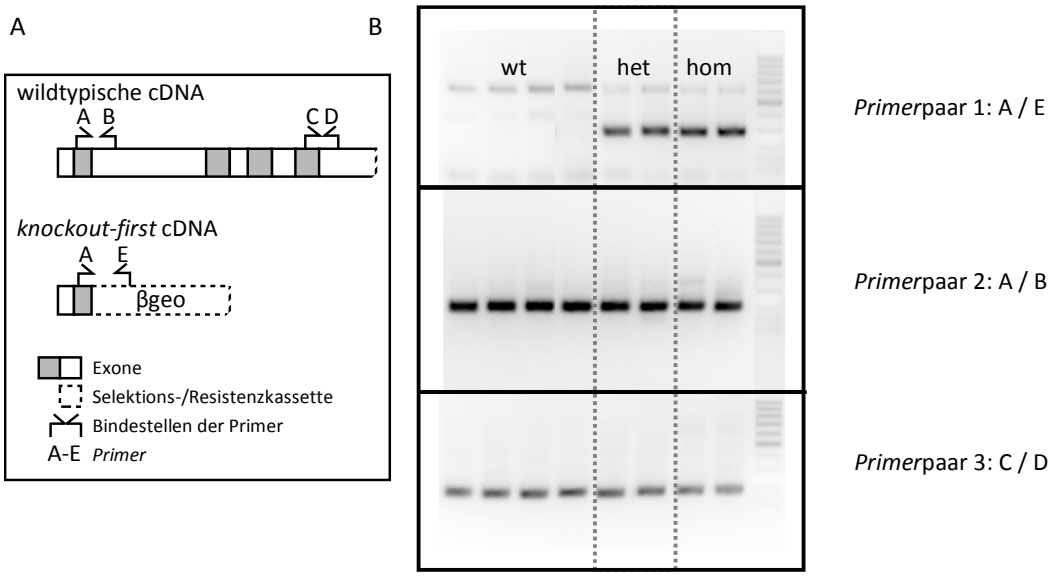

Abbildung 16 Bindestellen der Primer sowie Nachweis für alternatives Spleißen in *Fto*^{tm1a}-Mäusen
Die beiden hypothetischen cDNA Varianten heterozygoter *Fto*^{tm1a} Mäuse (A) inklusive *Primer*-Bindestellen, maßstabsgetreuer Größendarstellung der Exone (grau und weiß markiert), sowie Länge und Lage der eingefügten Genfalle mit Reporter- und Selektionsgen für Beta-Galaktosidase und Neomycinphosphotransferase (βgeo). Abgebildet sind alle Exone der jeweiligen cDNA, Exon 9 und βgeo sind stark verkürzt dargestellt, alle anderen Exone maßstabgetreu. Ergebnisse der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit cDNA aus hypothalamischer mRNA nach Agarosegelelektrophorese (B). Jede Spur stellt ein Individuum und die drei dazugehörigen PCR Produkte dar. Die Bindestellen der verwendeten *Primer* lag in folgenden Exonen: A: Exon 2; B: Exon 3; C Exon 8; D: Exon 9; E: βgeo-Kassette. Für die Sequenzen der *Primer* siehe Tabelle 3.

3.2.3 *Fto*^{tm1b} – Ursache und Entwicklung des kleinwüchsigen Phänotyps

Der *body mass index* (BMI) ist die wichtigste Kenngröße um ein Ungleichgewicht im Energiehaushalt zu erkennen und Grundlage für die Definition von Adipositas. Wegen der starken Assoziation der Kandidaten SNPs innerhalb des *FTO*-Lokus mit dem BMI stand das Körpergewicht der untersuchten Mauslinien im zeitlichen Verlauf im Zentrum der basalen Phänotypisierung. Da sich die Mauslinie *Fto*^{tm1a} als ungeeignetes Modell zur Rolle von FTO an der Regulation des Energiehaushaltes herausstellte, wurden weitere Analysen an der FTO defizienten Mauslinie *Fto*^{tm1b} durchgeführt. Diese Mäuse hatten im Alter von acht Wochen ein geringeres Körpergewicht, waren kleiner und unterschieden sich in der Körperzusammensetzung von gleichgeschlechtlichen Wurfgeschwistern (siehe 3.2.1).

Zur weiteren Abklärung des kleinwüchsigen Phänotyps wurde die Expression der *Major-Urinary*-Proteine (MUP) analysiert. Diese wird in der Leber vor allem durch Wachstumshormone (GH) gesteuert und kann einen ersten Aufschluss über eine gestörte GH-Ausschüttung bzw. Signalverarbeitung geben (Cavaggioni und Mucignat-Caretta, 2000; Meyer et al., 2004). Die MUP transportieren nicht-flüchtige Pheromone und werden abhängig von der sexuellen Reife über den Urin ausgeschieden. Analysiert wurde der Urin 28 Tage alter Mäuse und die Menge der MUP im Coomassie gefärbten SDS-Gel zwischen den Genotypen verglichen. Die nachweisbare Menge MUP homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse war signifikant niedriger als bei *Fto*^{wt} oder heterozygoten Wurfgeschwistern (Abbildung 17). Die geringere MUP-Expression kann ein Hinweis für eine gestörte GH-Signalverarbeitung sein, aber auch Resultat einer Entwicklungsverzögerung.

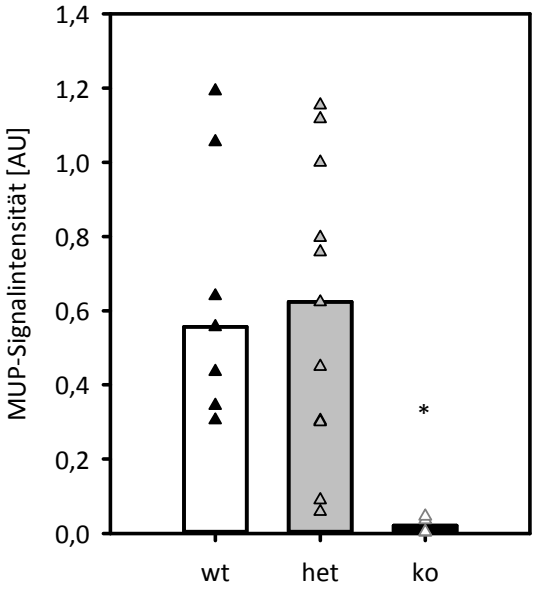

Abbildung 17 Nachweis von MUP im Mausurin 28 Tage alter *Fto*^{tm1b} Männchen
Standardisierte Werte zur Signalintensität von Major Urinary Protein (MUP) in Coomassie gefärbtem SDS-Gel. Zur Standardisierung wurde eine Referenzprobe verwendet, die auf jedes Gel aufgetragen wurde. Dargestellt ist der Median, sowie die Daten für Einzeltiere (wt 7; het 12; ko 4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Einwege-ANOVA nach Rängen. Der Stern markiert einen signifikanten Genotypeffekt (* $p < 0{,}05$).

Die Regulation der MUP wird multihormonell gesteuert, aus diesem Grund wurde zusätzlich der Einfluss von GH auf andere Signalwege untersucht. Der Muskel wurde hierfür als weiteres Zielorgan gewählt, da signifikante Unterschiede in der fettfreien Masse zwischen den Genotypen festgestellt wurden. Im Muskel und der Leber aktiviert GH die Transkription von Somatomedin C (*insulin-like growth factor* 1; *Igf1*), welches das Wachstum und die Differenzierung von Muskelzellen reguliert und somit eine Schlüsselrolle in der infantilen Wachstumsphase und dem Muskelwachstum spielt. Zusätzlich wurden Transkriptionsfaktoren aus der Familie der myogenen Faktoren untersucht, die essentiell für die Ausbildung von Muskelfasern und die Differenzierung von Muskelzellen sind. Beispielhaft wurden hier Myogener Faktor 3 (Myod) und Myogenin (Myog) ausgewählt. Als Gegenspieler von IGF1 wurde Myostatin (Mstn) untersucht, welches einen hemmenden Effekt auf das Muskelwachstum hat. Die Analyse von Quadrizepsmuskel-Proben zeigte, dass die Transkriptspiegel von *Myog* und *Myod*, bei *knockout* Mäusen signifikant geringer waren (Abbildung 18). Die Transkiptmenge der Gegenspieler *Igf1* sowie *Mstn* und des *Igf1-Rezeptor* zeigten dagegen keine Unterschiede in der Expression. Ein Einfluss von GH auf den kleinwüchsigen Phänotyp konnte somit nicht belegt werden. Ursache für die verringerte fettfreie Masse homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse könnte demnach eine reduzierte Muskeldifferenzierung sein. Die niedrigen MUP Spiegel männlicher *Fto*^{tm1b} Mäuse könnten auf den Einfluss anderer Hormone, z. B. der Sexualhormone, zurückzuführen sein.

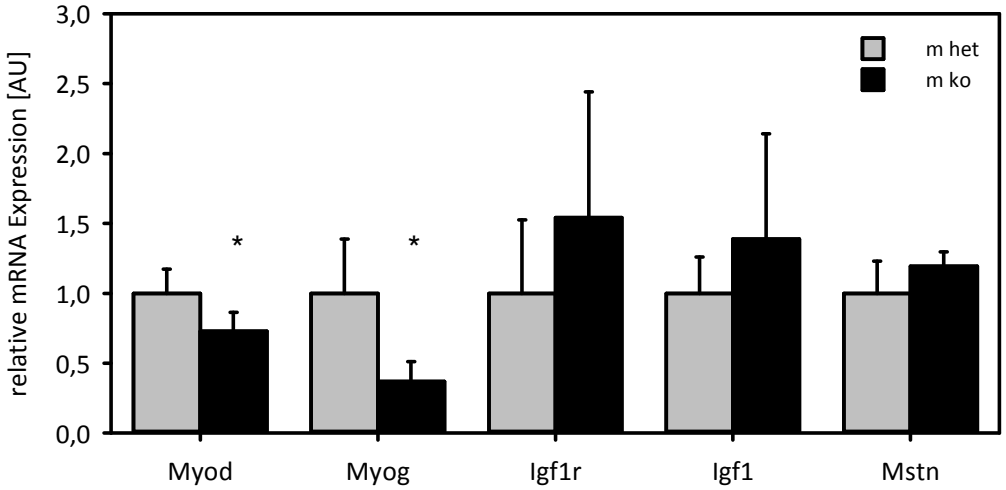

Abbildung 18 Relative mRNA Expressionsspiegel verschiedener Regulatoren des Muskelwachstums
Es handelt sich um standardisierte und normalisierte Werte der relativen mRNA-Expression im Quadrizepsmuskel adulter männlicher *Fto*^{tm1b} Mäuse (ko) und deren heterozygoter Wurfgeschwistern (n=4 pro Genotyp; technische Triplikate). Untersucht wurden die Transkriptionsfaktoren der Muskeldifferenzierung Myogenin (Myog) und Myogener Faktor 3 (Myod), der Inhibitor der Differenzierung Myostatin (Mstn) sowie den Aktivator der Differenzierung Somatomedin C (*Igf1*) und dessen Rezeptor (*Igf1r*). Dargestellt ist der Mittelwert + Standardabweichung. Die Normalisierung der Werte erfolgte mit den mRNA-Spiegeln des Hitzeschockproteins 90. Die statistische Auswertung erfolgte im zweiseitigen T-Test. Der Stern markiert einen signifikanten Genotypeffekt (* $p < 0{,}05$).

Die Entstehung des kleinwüchsigen Phänotyps wurde weiterhin in allen Entwicklungsstufen ausgiebig untersucht um diese zeitlich einzugrenzen. Beginnend mit der Embryonalentwicklung wurden Föten von drei trächtigen Weibchen an Tag E18,5 präpariert und untersucht. Jedes der Weibchen war mit neun Jungtieren trächtig, 26 davon zeigten nach Entnahme Vitalfunktionen. Die Genotypen verteilten sich gemäß der Mendelschen Regeln im Verhältnis von 1-2-1 (wt n=7, het n=13, ko n=7). Zwischen den Genotypen konnte kein Unterschied im Fötalgewicht festgestellt werden.

Der kleinwüchsige Körperbau sowie eine geringere Wachstumsrate wurde bereits bei wenige Tage alten Nestlingen beobachtet (Abbildung 19A & B). Die Welpen waren zudem weniger agil, schlechter genährt und hatten eine höhere Sterblichkeitsrate als gleichaltrige Wurfgeschwister. Bei Standardhaltungsbedingungen starb ein Drittel der *Fto*^{tm1b} Welpen vor dem Absetzen, durch Zucht in Thermoneutralität konnte die Ausbeute abgesetzter *Fto*^{tm1b} Jungtiere verdoppelt werden. Beim Absetzen der Welpen hatten *Fto*^{tm1b} Mäuse ein signifikant geringeres Körpergewicht als Wurfgeschwister der anderen Genotypen (Abbildung 19C), zeigten motorische Aberrationen und hatten eine geringere Körpertemperatur (Abbildung 19D), die vermutlich Folge des schlechten Allgemeinzustandes beim Absetzen war.

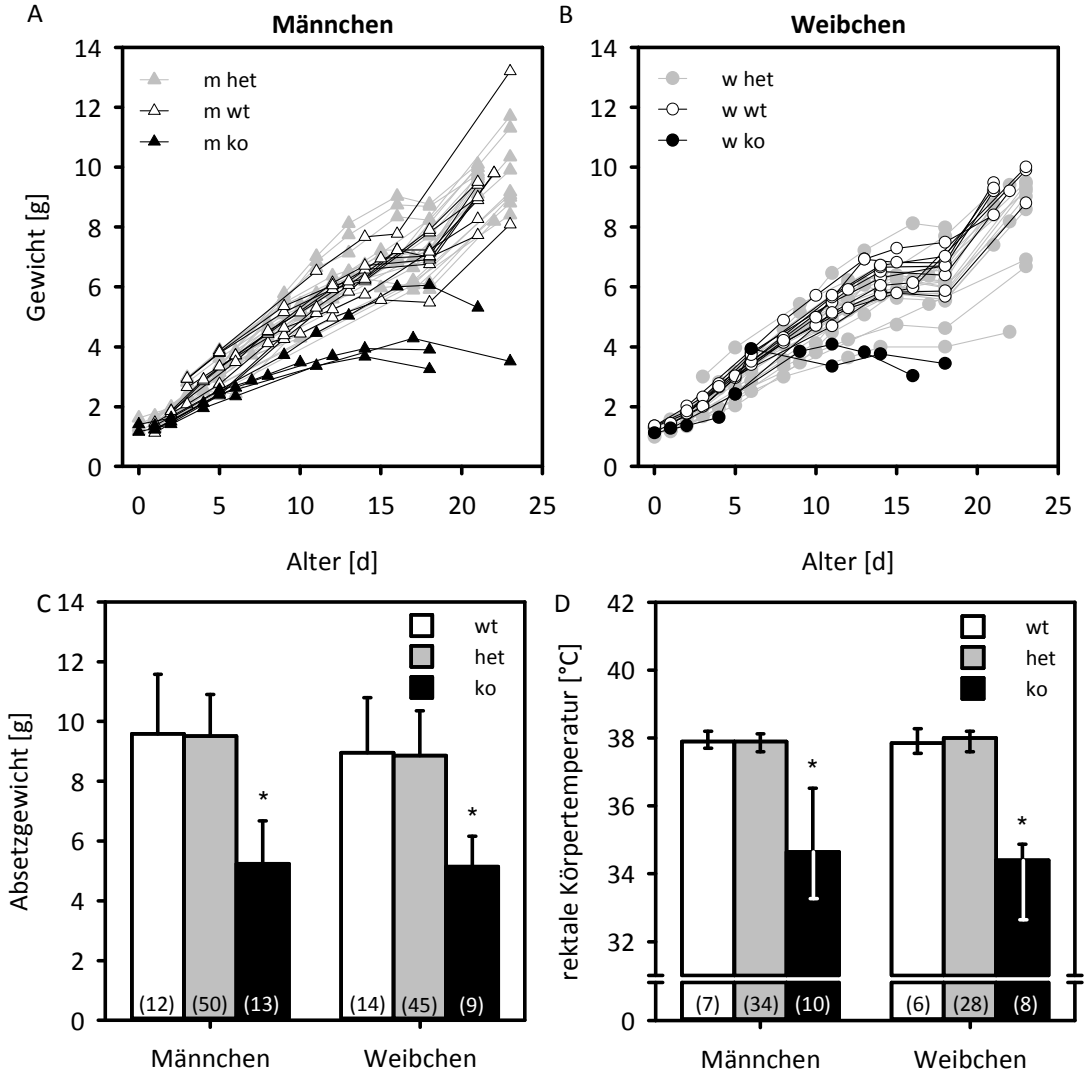

Abbildung 19 Körpergewichtsverlauf, Körpergewicht und Körpertemperatur von *Fto*^{tm1b} Welpen
Körpergewichtsverlauf von 73 Welpen während der Nestlingszeit (A, B). Vier Welpen starben bereits vor der Genotypisierung, vier weitere vor dem Absetzen. Heterozygote Welpen (het) sind im Hintergrund, *Fto*^{wt} (wt) und *Fto*^{tm1b} (ko) Wurfgeschwister im Vordergrund dargestellt. Männchen (A; m; wt n=10; het n=22; ko n=5) und Weibchen (B; w; wt n=10; het n=20; ko n=2) sind getrennt abgebildet. Körpergewicht (C) sowie rektale Körpertemperatur (D) von *Fto*^{tm1b} (ko), heterozygoten und *Fto*^{wt} Jungtieren beim Absetzen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung des Körpergewichtes, sowie Median, 25. und 75. Perzentile der rektalen Körpertemperatur. Die Tierzahlen sind jeweils in Klammern angegeben. Die statistische Auswertung des Körpergewichtes erfolgte mittels Einwege-ANOVA, die der Körpertemperatur mittels Einwege-ANOVA nach Rängen. Der Stern markiert einen signifikanten Genotypeffekt (* $p < 0{,}05$).

Die abgesetzten Jungtiere verteilten sich nicht den Mendelschen Regeln entsprechend auf die Genotypen (Abbildung 20A). Von 1076 insgesamt abgesetzten Jungtieren wurden nur 71 *Fto*^{tm1b} genotypisiert, dies entsprach 6,6%. Es wurden dagegen fast doppelt so viele *Fto*$^{wt/tm1b}$ Mäuse genotypisiert wie *Fto*^{wt}. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der verstorbenen Nestlinge homozygote *Fto*^{tm1b} Welpen waren. Nahezu die Hälfte der abgesetzten *Fto*^{tm1b} Mäuse verstarb plötzlich Laufe der weiteren Entwicklung, 27 von 33 Mäusen bereits in den ersten fünf Lebenswochen, bei den anderen Genotypen war der Anteil wesentlich geringer (wt: 1; het: 9; Abbildung 20B). Durch Absetzen homozygoten *Fto*^{tm1b} Jungtiere mit etwa 30 Tagen konnte die Jungtiersterblichkeit reduziert werden. Die heranwachsenden *Fto*^{tm1b} Jungtiere im elterlichen Käfig hatten dabei keinen Einfluss auf die Überlebenschance neu geborener Würfe. Zusätzlich angebotener Futterbrei förderte weiterhin die selbständige Ernährung der *Fto*^{tm1b} Jungtiere, die nach dem Absetzen wieder mit ihren gleichgeschlechtlichen Wurfgeschwistern in Kleingruppen zusammengeführt wurden. Rivalitäten oder Rangkämpfe wurden dabei nicht festgestellt.

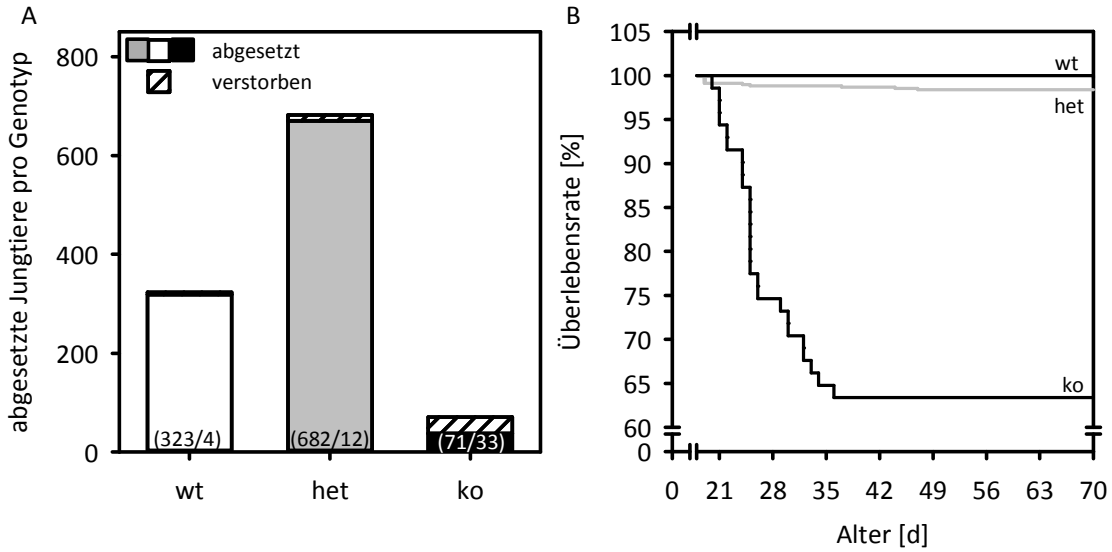

Abbildung 20 Genotypverteilung und Überlebensrate abgesetzter *Fto*^{tm1b} Mäuse
Dargestellt ist die Verteilung der abgesetzten Mäuse auf die Genotypen (A). Von 1076 abgesetzten Welpen verstarben einige Mäuse in der weiteren Entwicklung plötzlich. Die Verteilung der verstorbenen Mäuse auf die Genotypen ist ebenfalls in Abbildung A zu sehen. Es wurde beobachtet, dass von den abgesetzten homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäusen fast die Hälfte der Mäuse in der weiteren Entwicklung verstarb. In Abbildung B ist die Überlebensrate aller Genotypen bis zu einem Alter von 10 Wochen dargestellt. Ein großer Anteil der *Fto*^{tm1b} Mäuse war zum Zeitpunkt des Todes jünger als sechs Wochen. Die Angaben in Klammer geben die Anzahl der insgesamt abgesetzten Welpen sowie die unerwartet verstorbenen Mäuse an.

Wachstumsverzögerungen in der ersten Wachstumsphase als Nestlinge führten somit zum kleinwüchsigen Phänotyp homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse. Dieser konnte während des pubertären Wachstumsschubes nicht kompensiert werden (Abbildung 21), da die Wachstumsrate aller Genotypen während der Pubertät identisch war (Tabelle 12).

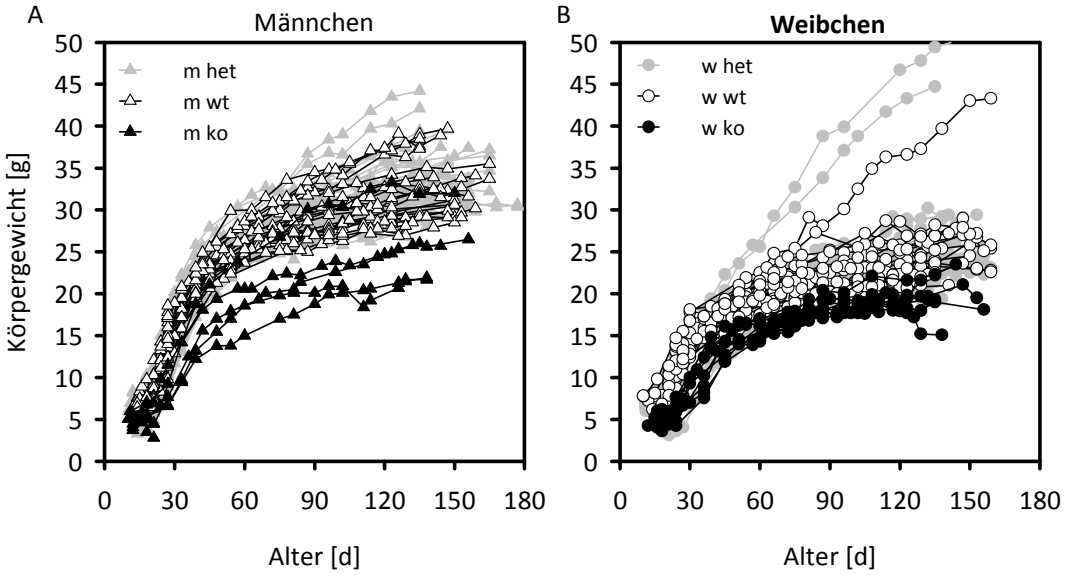

Abbildung 21 Körpergewichtsverläufe heranwachsender *Fto*^{tm1b} Mäuse
Körpergewichtsverläufe heranwachsender *Fto*^{tm1b} Mäuse ab einem Alter von ca. 16 Tagen bis ins Erwachsenenalter, aufgeteilt nach Männchen (A; m; wt n=38; het n=94; ko n=14) und Weibchen (B; w; wt n=34; het n=82; ko n=12). Homozygote *Fto*^{tm1b} Mäuse (ko) beider Geschlechter waren in allen Würfen leichter als *Fto*^{wt} (wt) und heterozygote (het) Wurfgeschwister.

Tabelle 12 Wachstumsrate heranwachsender *Fto*^{tm1b} Mäuse im zweiten Wachstumsschub
Dargestellt ist die Wachstumsrate im Alter von ca. 28 bis 60 Tagen für die untersuchten Genotypen, aufgeteilt nach Geschlechtern. Dargestellt ist der Mittelwert + Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zwei-Wege ANOVA. Das Paragraphenzeichen markiert einen signifikanten Effekt des Geschlechts (§ p < 0,05). Die jeweiligen Tierzahlen sind in Klammern angegeben.

		Fto^{wt}	*Fto*$^{wt/tm1b}$	*Fto*^{tm1b}	p<0,05
Wachstumsrate [g/d]	Männchen	0,35 g + 0,063 (18)	0,33 g + 0,070 (38)	0,32 g + 0,068 (9)	§
	Weibchen	0,18 g + 0,065 (18)	0,20 g + 0,087 (26)	0,25 g + 0,032 (5)	

Wie bereits zuvor erwähnt, war die Körperzusammensetzung acht Wochen alter Mäuse durch die FTO-Defizienz massiv verändert (vgl. Abbildung 14) und entsprach den publizierten Beobachtungen (Gao et al., 2010). Die Analyse ausgewachsener Mäuse erbrachte das gleiche Ergebnis (Abbildung 22). Die untersuchten homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäuse beiderlei Geschlechts hatten im Verhältnis zu ihrem Körpergewicht eine erhöhte Fettmasse sowie eine geringere fettfreie Masse. Zusätzlich konnten durch Regressionsanalysen genotypspezifische Unterschiede in der Fettgewebsakkumulation festgestellt werden. Die Adjustierung der Körperzusammensetzung auf das Körpergewicht belegte, dass FTO-defiziente Mäuse eine geringere fettfreie Masse und mehr Fettmasse hatten als wildtypische Mäuse (Abbildung 23).

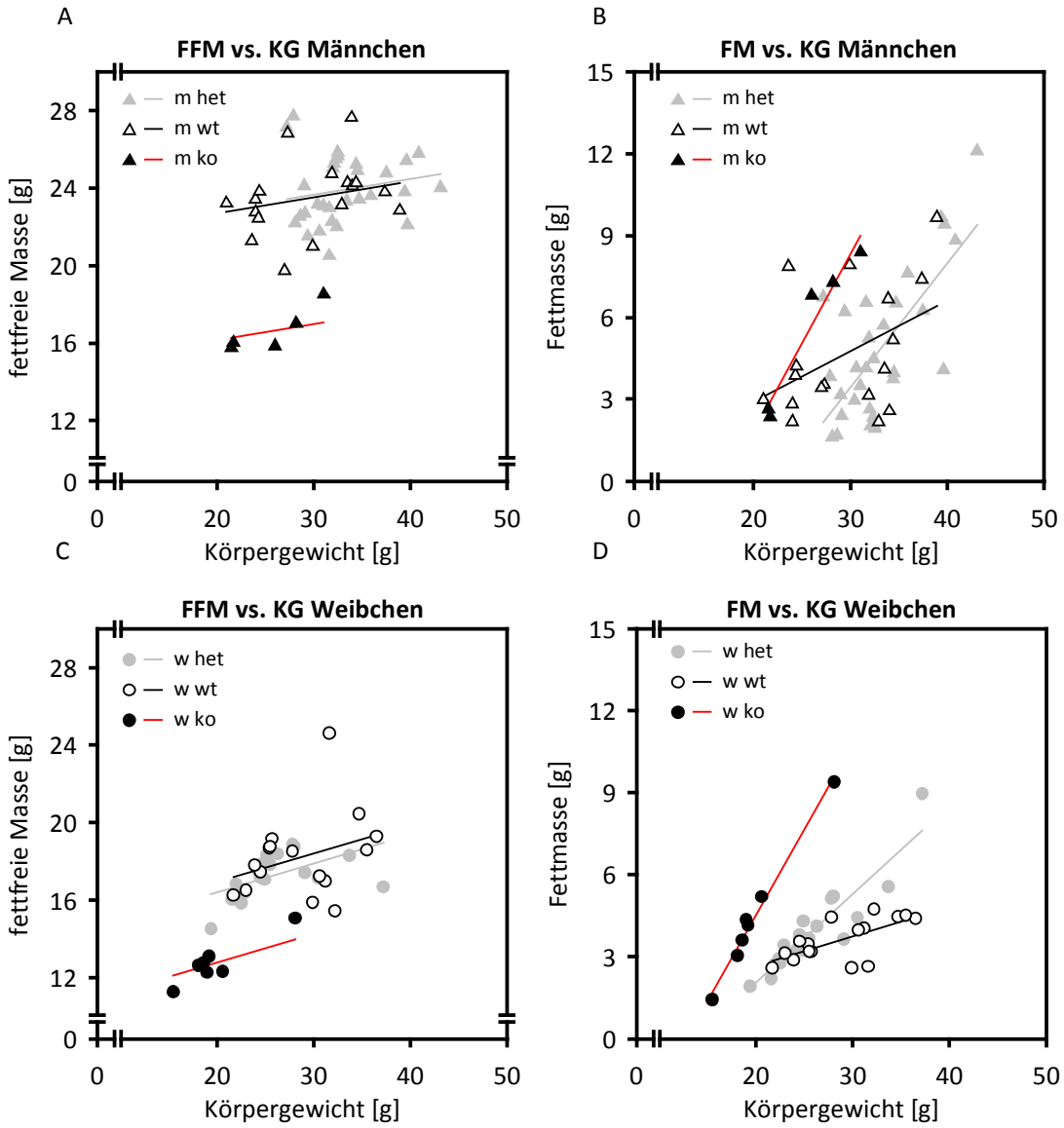

Abbildung 22 Körperzusammensetzung und Körpergewicht ausgewachsener *Fto*^{tm1b} Mäuse
Zusammenhang zwischen Körpergewicht (KG) und Körperzusammensetzung ausgewachsener, ca. 21 Wochen alter Männchen (A, B) und Weibchen (C, D). Bei beiden Geschlechtern konnte in der fettfreien Masse (FFM; A, C) für alle Genotypen eine gleiche Steigung der Regressionsgraden verifiziert werden. Die Akkumulation von Fettmasse (FM; B, D) war dagegen zwischen den Genotypen verschieden. Es konnte folglich bei homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäusen eine geringere fettfreie Masse beobachtet werden, sowie ein genotypspezifischer Unterschied in der Fettakkumulationsrate. Die statistische Auswertung der Regressionen erfolgte im Rahmen der ANCOVA (Test der gleichen Steigung).

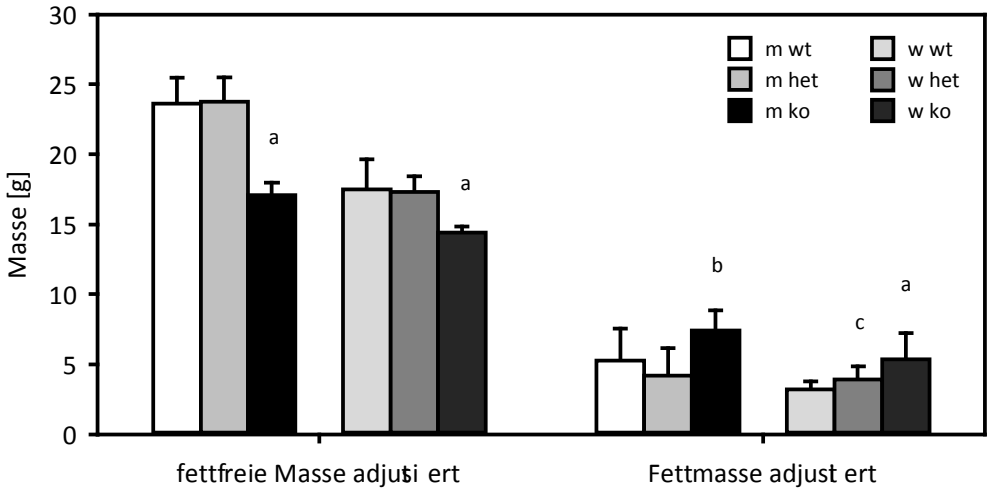

Abbildung 23 Adjustierte fettfreie und Fettmasse ausgewachsener *Fto^{tm1b}* Mäuse
Nach ANCOVA, mit Körpergewicht als Kovariate, korrigierte, fettfreie Masse und Fettmasse beider Geschlechter in *Fto^{tm1b}* Mäusen. Ein-Wege-ANCOVA mit Test für gleiche Steigung (fettfreie Masse) sowie ohne Test für gleiche Steigung (Fettmasse). Eine statistische Signifikanz ist durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet ($p < 0{,}05$; **a**: ko ≠ wt & het; **b**: ko ≠ het; **c**: wt ≠ het)

Die divergente Verteilung von Fettmasse und fettfreier Masse zwischen den Genotypen war auch auf Organebene erkennbar (Abbildung 24). Homozygote *Fto^{tm1b}* Mäuse hatten größere weiße Fettdepots, die auch nach Adjustierung auf das Körpergewicht bei beiden Geschlechtern signifikant größer waren (Daten nicht gezeigt). Durch die Präparation der Fettgewebe zeichnete sich somit die gleiche Gewebeverteilung wie in den NMR-Messungen ab. Die Quadrizepsmuskel homozygoter *Fto^{tm1b}* Mäusen waren kleiner, eine signifikant verringerte Masse konnte aber nur bei den Weibchen festgestellt werden. Für die Männchen zeichnete sich ein Trend in die gleiche Richtung ab. Abschließend kann festgestellt werden, dass *Fto^{tm1b}* Mäuse relativ zu ihrem Körpergewicht eine größere Fettmasse sowie eine geringere fettfreie Masse hatten. Welche organische Ursache die geringere fettfreie Masse hatte ließ sich aus den entnommenen Geweben nicht beurteilen.

Die basale Charakterisierung der Mauslinie *Fto^{tm1b}* ergab somit, dass die Mauslinie in der Welpenphase eine Kleinwüchsigkeit entwickelte. Diese ging einher mit einem verringerten Muskelwachstum, welches möglicherweise durch eine reduzierte Muskeldifferenzierung verursacht wurde. Der kleinwüchsige Körperbau konnte in der pubertären Wachstumsphase nicht kompensiert werden, so dass ausgewachsene Mäuse weiterhin kleinwüchsig waren. Die Gewichtszunahme erfolgte in der pubertären Wachstumsphase mit der gleichen Rate wie bei wildtypischen oder heterozygoten Mäusen. Die Akkumulation von Körperfett erfolgte in dieser zweiten Wachstumsphase mit einer erhöhten Rate. Des Weiteren wurde bei den Mäusen der Linie *Fto^{tm1b}* eine erhöhte Jungtiersterblichkeit festgestellt, die durch Zucht bei Thermoneutralität und verlängerter Nestlingsphase reduziert werden konnte (Daten hierzu nicht gezeigt).

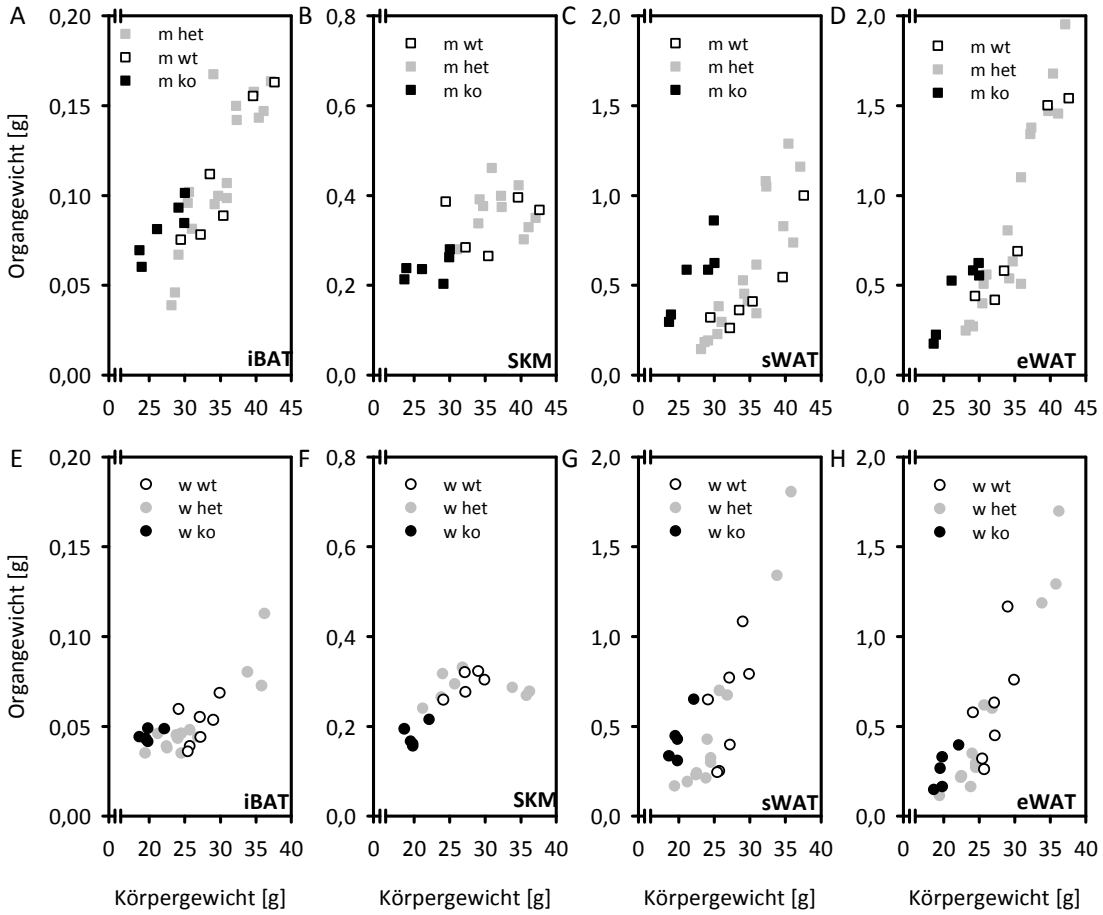

Abbildung 24 Korrelation des Organgewichtes mit dem Körpergewicht in der Mauslinie *Fto^{tm1b}*
Organgewichte männlicher (A-D) und weiblicher (E-H) Mäuse mit wildtypischem (wt), heterozygotem (het) oder homozygotem (ko) *Fto^{tm1b}* Lokus. Alle Mäuse hatten zum Zeitpunkt der Organentnahme ein Alter von >20 Wochen. Vergleichend dargestellt sind interscapulares Braunes Fettgewebe (iBAT), Quadrizepsmuskel (SKM), abdominales subkutanes (sWAT) sowie epigonadales Weißes Fettgewebe (eWAT).

3.2.4 *Fto*^{tm1b} - Metabolische Messungen

Die Messung des Energieumsatzes in unterschiedlichen Mausmodellen für Adipositas ist Kernstück dieser Arbeit. Aus diesem Grund erfolgte eine umfassende Untersuchung der einzelnen Komponenten des Energiehaushaltes auch im Mausmodell *Fto*^{tm1b}. Im Zentrum stand dabei die Messung des Energieumsatzes mittels Indirekter Kalorimetrie über mehrere Tage. Beide Geschlechter zeigten eine typische Tag-Nacht-Rhythmik im Energieumsatz (Abbildung 25). Diese war gekennzeichnet durch niedrige Verbrauchswerte in der Ruhephase am Tag und erhöhte Werte in der aktiven Dunkelphase. In homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäusen war der nächtliche Anstieg des Energieumsatzes vor allem in der ersten Nachthälfte weniger stark ausgeprägt als bei gleichgeschlechtlichen Wurfgeschwistern. Trotz des wesentlich geringeren Körpergewichtes homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse, war der Energieumsatz am Tag vergleichbar mit den anderen Genotypen.

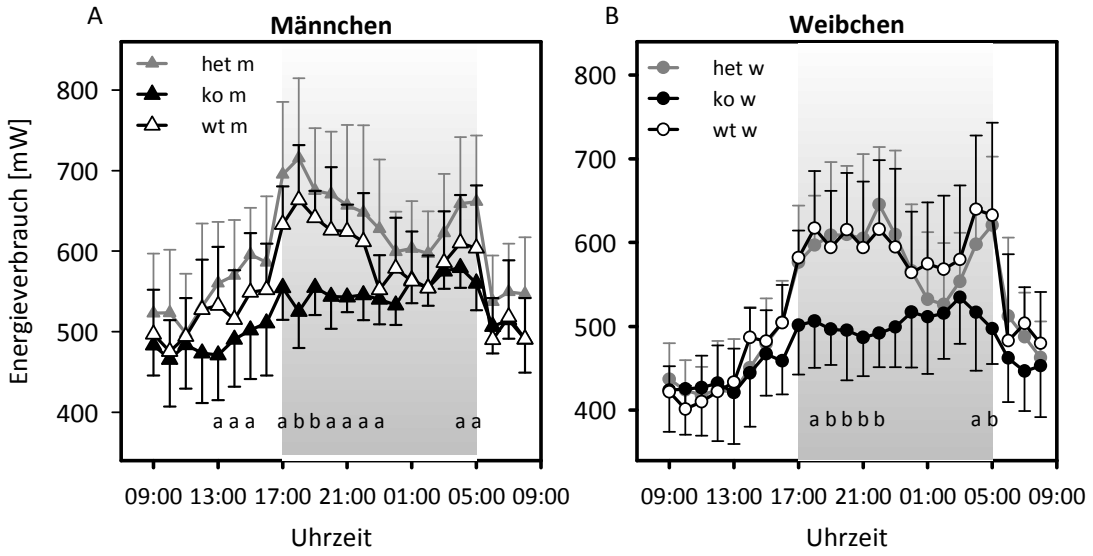

Abbildung 25 Energieumsatz von *Fto*^{tm1b} Mäusen im zeitlichen Verlauf
Energieumsatz im Tagesverlauf von Männchen (A; wt n=6; het n=11; ko n=7) und Weibchen (B; wt: n=7; het: n=10; ko: n=9) der Mauslinie *Fto*^{tm1b}. Grau hinterlegte Bereiche markieren die Nacht. Dargestellt sind Stundenmittelwerte und Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholungen, die statistische Signifikanz ist durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet ($p < 0{,}05$; **a** ko ≠ het; **b** ko ≠ wt & het).

Eine genauere Analyse der Ruhestoffwechselrate belegte, dass sowohl in der nächtlichen Aktivitätsphase, als auch in der Ruhephase am Tag der Energieumsatz zwischen den Genotypen vergleichbar war (Abbildung 26A). Nach Adjustierung der Ruhestoffwechselrate auf das Körpergewicht oder die fettfreie Masse war diese bei *Fto*^{tm1b} Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 26B).

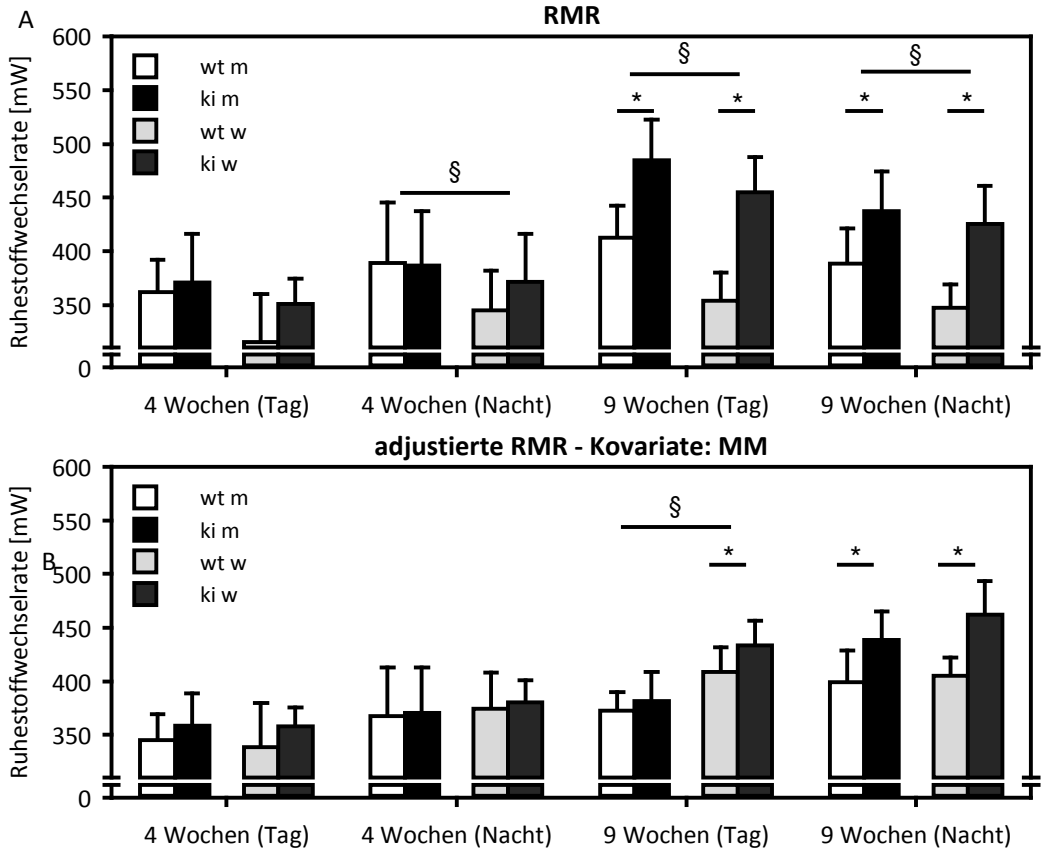

Abbildung 26 Ruhestoffwechsel von *Fto*^{tm1b} Mäusen

Ruhestoffwechsel beider Geschlechter und aller Genotypen gesplittet nach Tag und Nacht (A). Des Weiteren ist die adjustierte Ruhestoffwechselrate am Tag nach ein-Wege-ANCOVA mit Körpergewicht bzw. die fettfreier Masse als Kovariate dargestellt (B). Die nachfolgende statistische Auswertung erfolgte mittels zwei-Wege-ANOVA. Eine statistische Signifikanz ist durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet ($p < 0{,}05$; **a**: ko ≠ (wt & het), **b**: wt ≠ het ≠ ko).

Der erhöhte Ruhestoffwechsel und der geringere Energieumsatz in der ersten Nachthälfte homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse spiegelten sich auch im täglichen Energieumsatz und dem nach Lichtphase berechneten Energieumsatz wieder (Abbildung 27). In Folge des geringeren Energieumsatzes homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse in der Nacht waren sowohl der tägliche (24h) als auch der nächtliche (12h) Energieumsatz im Vergleich zu gleichgeschlechtlichen Wurfgeschwistern geringer. Wohingegen im Energieumsatz der Lichtphase aufgrund der erhöhten Ruhestoffwechselrate kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden konnte.

Der tägliche Energieumsatz aller untersuchten Mäuse dagegen entsprach trotz Unterschieden in der Körpermasse dem jeweiligen Körpergewicht (Originaldaten nicht gezeigt). Im körpergewichts-adjustierten täglichen Energieumsatz konnten folglich keine genotypspezifischen Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 28). Allerdings unterschied sich die Körperzusammensetzung homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse signifikant von den anderen Genotypen. Der Hauptverbraucher für Energie ist die fettfreie Masse, die bei FTO-defizienten Mäusen geringer war (siehe Kapitel 0). Nach Adjustierung des täglichen Energieumsatzes auf die fettfreie Masse ergab sich somit für beide Geschlechter ein signifikant erhöhter Energieumsatz homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse (Abbildung 28).

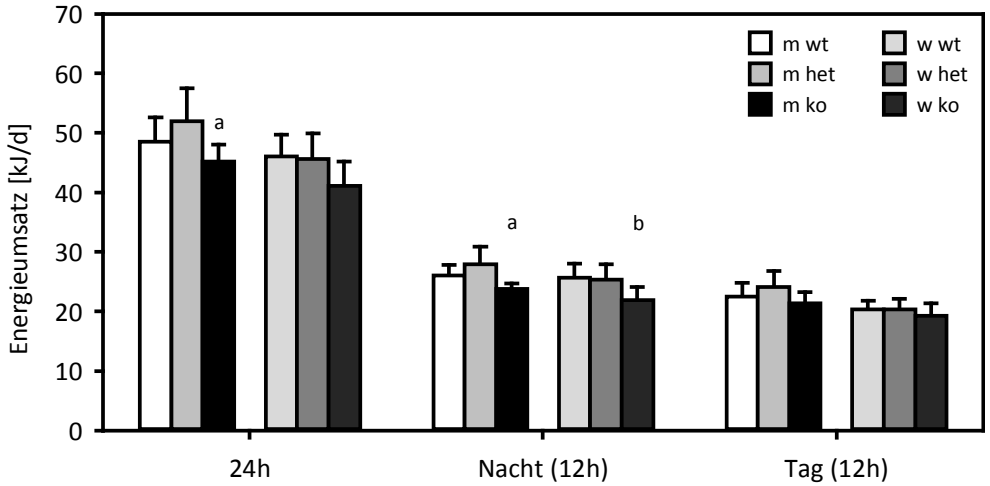

Abbildung 27 Energieumsatz von *Fto*^{tm1b} Mäusen nach Lichtphase und Geschlecht
Täglicher Energieumsatz über 24 Stunden, sowie getrennt nach Nacht-/Tag-Phase und Geschlechtern. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ein-Wege ANOVA innerhalb der Geschlechter. Dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung, eine statistische Signifikanz ist durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet (p <0,05; **a**: ko ≠ het; **b**: ko ≠ wt & het).

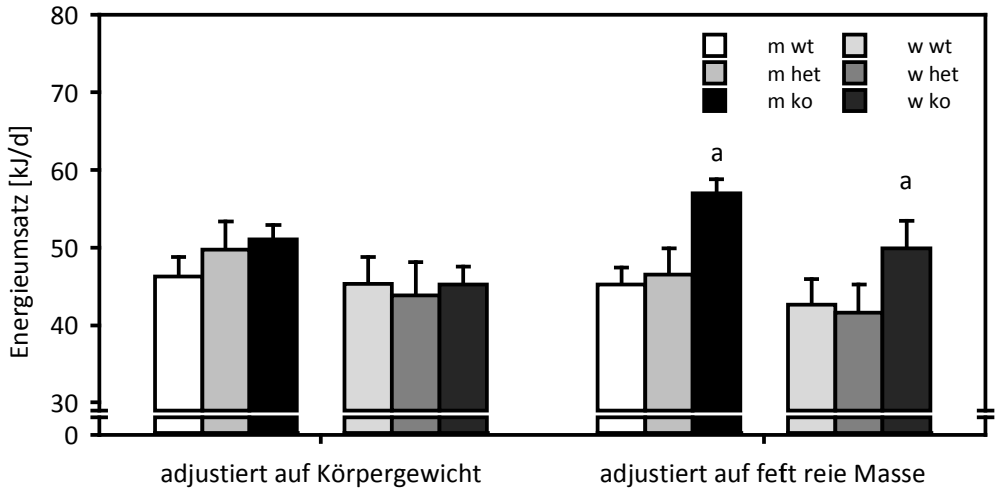

Abbildung 28 Adjustierter täglicher Energieumsatz von *Fto*^{tm1b} Mäusen
Durchschnittlicher täglicher Energieumsatz aller Mäuse adjustiert auf das Körpergewicht oder die fettfreie Masse. Männchen (m; wt n=6; het n=11; ko n=7) und Weibchen (w; wt n=7; het n=10; ko n=9) sind getrennt voneinander als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ein-Wege-ANCOVA mit dem Körpergewicht bzw. der fettfreien Masse als Kovariate. Signifikante Unterschiede sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet (p<0,05; **a**: ko ≠ wt & het).

Durch Aktivität und Futteraufnahme wurde nachts eine höhere respiratorische Austauschrate (RER) als in der Lichtphase aufgezeichnet. Diese Tagesperiodik war bei allen Mäusen ausgeprägt (Abbildung 29), besonders stark bei homozygoten *Fto*^{tm1b} Männchen. Der genotypspezifische Unterschied deutet darauf hin, dass *Fto*^{tm1b} Männchen in der Schlafphase andere Energiereserven nutzen als *Fto*^{wt} oder heterozygote Mäuse. Bei den Weibchen waren keine Unterschiede in der RER erkennbar.

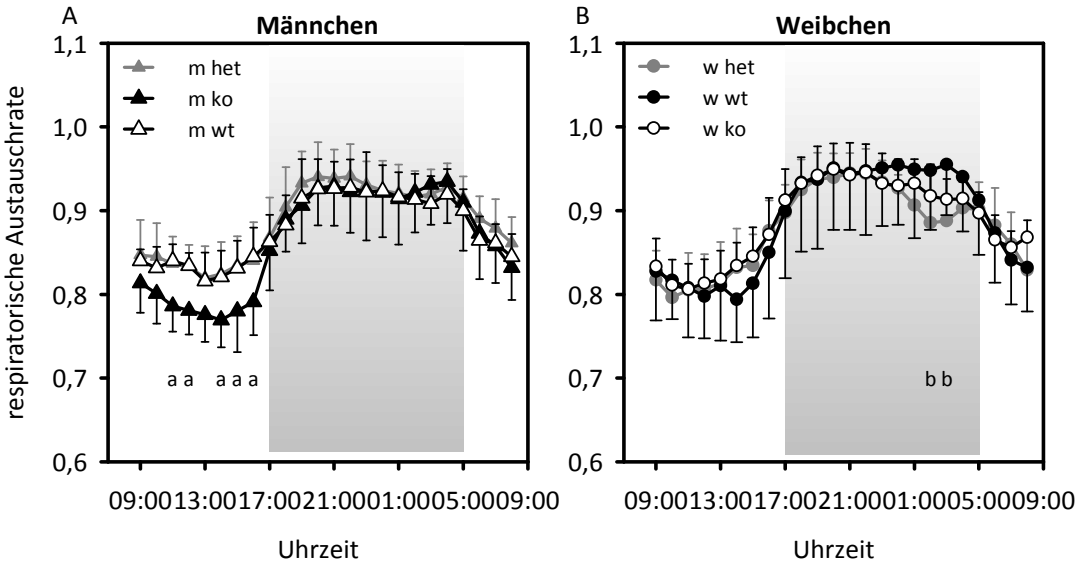

Abbildung 29 Respiratorischen Austauschrate von *Fto*^{tm1b} Mäusen im zeitlichen Verlauf
Dargestellt sind die Stundenmittel der respiratorischen Austauschrate von Männchen (A; wt n=6; het n=11; ko n=7) und Weibchen (B; wt n=7; het n=10; ko n=9) der Mauslinie *Fto*^{tm1b} im Tagesverlauf. Grau hinterlegte Bereiche markieren die Dunkelphase. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zwei-Wege ANOVA mit Messwiederholungen. Eine statistische Signifikanz ist durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet (p <0,05; **a**: ko ≠ wt & het; **b**: ko ≠ het).

Zusätzlich zum Energieumsatz wurde parallel die Körpertemperatur der Mäuse gemessen und die Energieaufnahme bestimmt. Sowohl in der Körpertemperatur, als auch in der Futteraufnahme sowie der Assimilationseffizienz konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Tabelle 13). Aus täglicher Futteraufnahme und Assimilationseffizienz wurde die täglich assimilierte Energie der Einzeltiere berechnet. Durch eine starke Variation in der individuellen Futteraufnahme unterlagen die Rohdaten der assimilierten Energie sowie die adjustierten Werte (Abbildung 30) einer starken Streuung.

Tabelle 13 Körpertemperatur und Energieaufnahme adulter *Fto*^{tm1b} Mäuse
Während der Energieumsatzmessungen wurden täglich Körpertemperatur und Futteraufnahme der *Fto*^{tm1b} Mäuse gemessen, die Assimilationseffizienz leitet sich aus der Energieaufnahme und der ausgeschiedener Kot-Energie ab. Die statistische Auswertung der Daten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Angegeben ist sind Mittelwert + Standardabweichung.

		wt	het	ko
Körpertemperatur [°C]	Männchen	37,5 + 1,06	37,6 + 0,48	37,4 + 0,39
	Weibchen	37,8 + 0,65	37,8 + 0,41	37,3 + 0,66
Futteraufnahme [g]	Männchen	3,57 + 1,150	3,54 + 1,081	2,49 + 0,201
	Weibchen	2,95 + 0,924	3,14 + 1,159	2,36 + 1,051
Assimilationseffizienz [%]	Männchen	78,4 + 4,21	79,5 + 3,75	77,6 + 3,21
	Weibchen	77,7 + 4,67	78,9 + 6,28	72,8 + 7,69

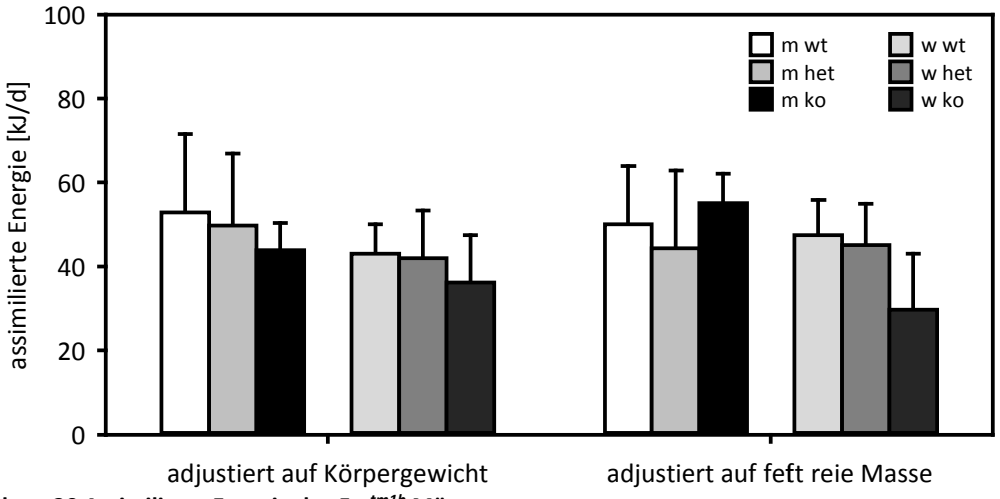

Abbildung 30 Assimilierte Energie der *Fto*^{tm1b} Mäuse
Adjustierte täglich assimilierte Energie mit dem Körpergewicht und der fettfreie Masse als Kovariate. Männchen (A; wt n=5; het n=10; ko n=6) und Weibchen(B; wt n=6; het n=8; ko n=8) sind getrennt dargestellt. Die Auswertung erfolgte mittels Ein-Wege-ANCOVA, dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung.

Der Energieumsatz eines Organismus ist abhängig von der Körpergröße, Körperoberfläche und der Größe der metabolisch aktiven Organe. Dieser Zusammenhang wurde auch bei allen untersuchten Mäusen und Genotypen der Mauslinie *Fto*^{tm1b} festgestellt. Aus diesen Untersuchungen lässt sich somit zusammenfassend sagen, dass der Energieumsatz homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse ihrem geringeren Körpergewicht entsprach. Unter Berücksichtigung der geringeren fettfreien Masse homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse resultierte hieraus eine erhöhte Stoffwechselrate, welche durch eine erhöhte Ruhestoffwechselrate verursacht wurde. Dies könnte ein kompensatorischer Mechanismus sein um die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten. Abhängig ist der Energieumsatz zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur vom Temperaturgefälle zwischen Körpertemperatur und Umgebungstemperatur sowie vom Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis. Messungen des Energieumsatzes in Thermoneutralität sowie implantierten Temperatursendern könnten helfen, den Beitrag der Körpertemperatur an der erhöhte Ruhestoffwechselrate aufzuklären. Wir haben weiterhin eine geringere RER am Tag bei *Fto*^{tm1b} Männchen messen, auf eine erhöhte Fettoxidation hindeutet, um einer weiteren Akkumulation von Fettmasse entgegen zu wirken. Zusätzlich wurde in der Aktivitätsphase ein geringerer Energieumsatz gemessen. Vor allem in der ersten Nachthälfte war der Energieumsatz wildtypischer und heterozygoter Mäuse höher. Diese Zeit diente vorrangig der Futtersuche und Erkundung der Umgebung. Der geringere Energieumsatz zu dieser Tagesperiode war unter Umständen auf weniger Gesamtaktivität zurückzuführen.

3.2.5 *Fto*^{tm1b} - Aktivitätsmessung

Die Aktivität der Mäuse wurde unabhängig vom Energieumsatz untersucht. Die verwendete Messanlage zeichnete sowohl Bewegungen in horizontaler Richtung auf, als auch das vertikale Aufrichten. Dadurch konnte nicht nur die Bewegungsaktivität, sondern auch Explorationsverhalten der Mäuse untersucht werden. Die Bewegungsaktivität zeigte eine lichtabhängige Tagesperiodik mit erhöhter Aktivität in der Nacht und Ruhe am Tag (Abbildung 31). Genotypspezifische Unterschiede konnten weder im tageszeitlichen Verlauf noch in der Summe der täglichen Bewegungsaktivität festgestellt werden. Im Aufrichte- und Erkundungsverhalten war ebenfalls nachts die Aktivität von *Fto*^{wt} und heterozygoten Mäusen am Höchsten (Abbildung 32). Homozygote *Fto*^{tm1b} Mäuse zeigten dagegen kaum mehr Erkundungsverhalten als am Tag, sie richteten sich nur ¼ so oft auf wie ihre Wurfgeschwister.

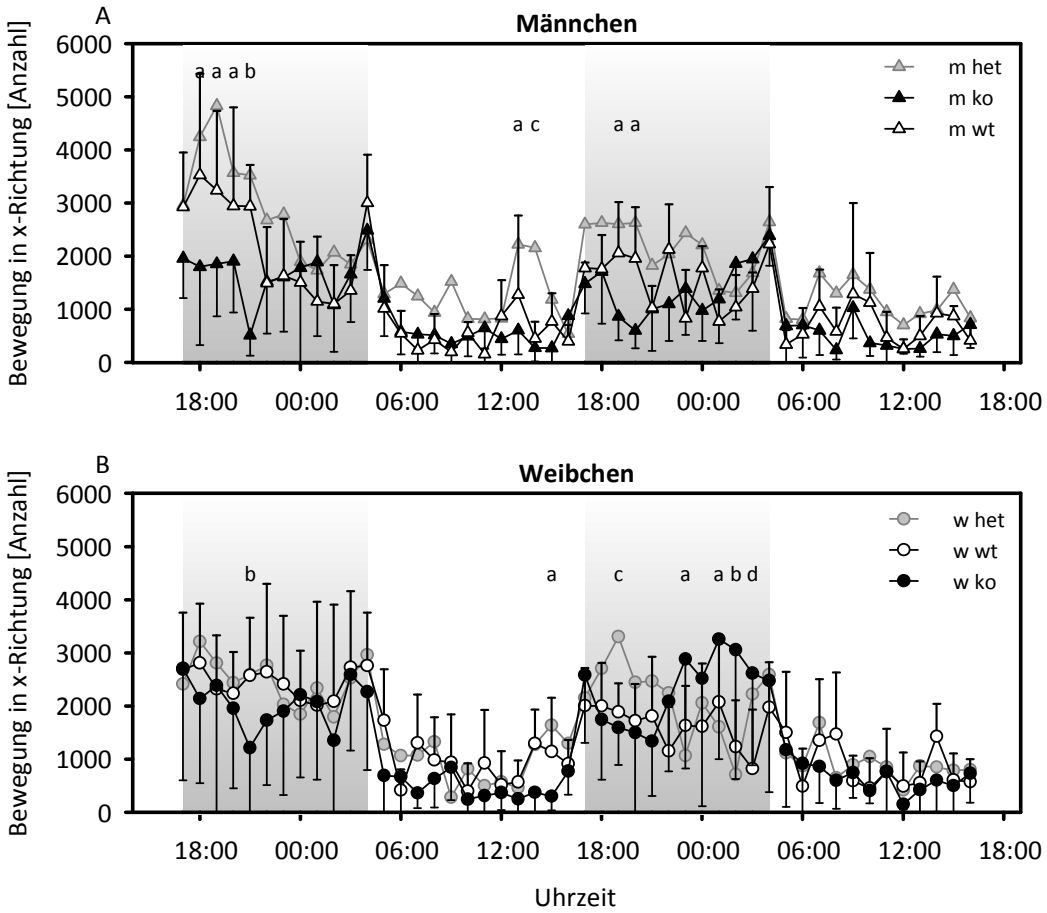

Abbildung 31 Bewegungsaktivität in x-Richtung über 48 Stunden

Die Bewegungsaktivität wurde anhand von Unterbrechungen der Lichtschranken in x-Richtung an zwei aufeinanderfolgende Messtagen in beiden Geschlechtern getrennt voneinander bewertet (A Männchen: wt n=3, het n=10, ko n=5; B Weibchen: wt n=6, het n=10, ko n=8). Dargestellt sind Stundenmittelwerte und Standardabweichung. Die Dunkelphase ist grau hinterlegt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zwei-Wege-ANOVA mit Messwiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet (p <0,05; **a** ko ≠ het; **b** ko ≠ wt & het; **c** het ≠ wt & ko; **d** wt ≠ het & ko

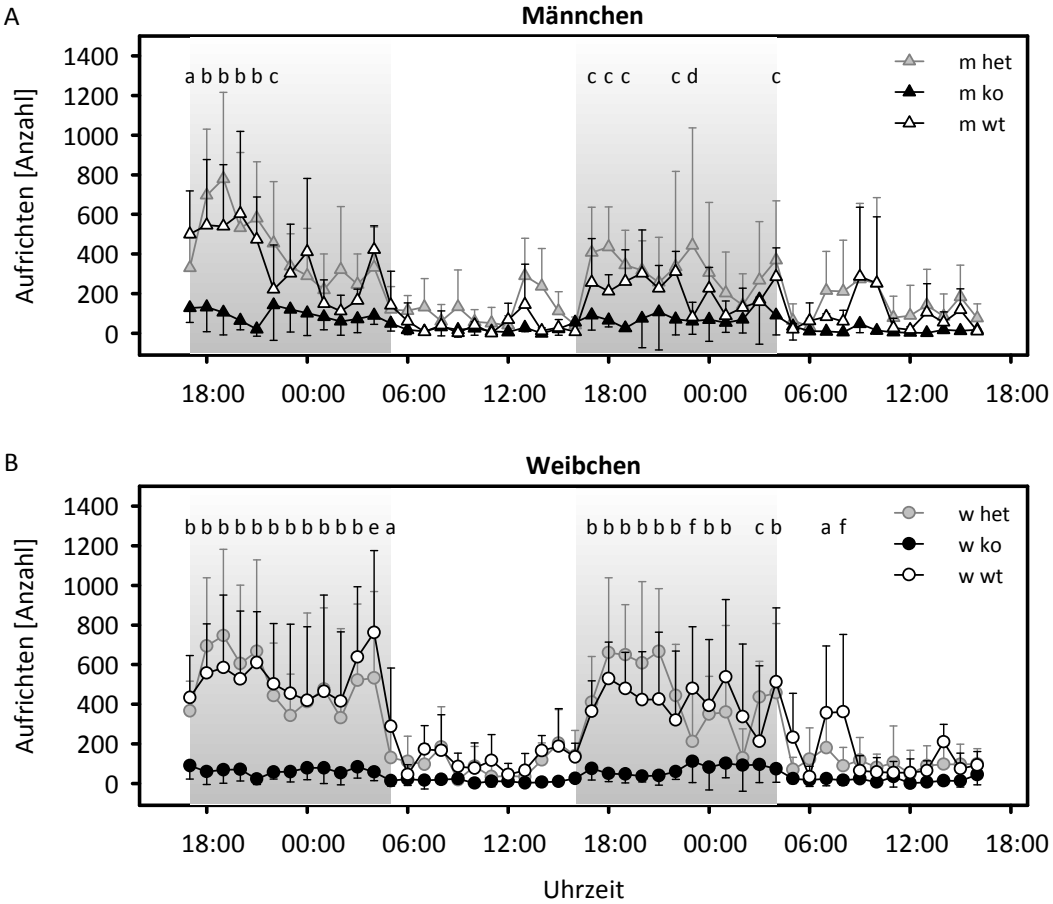

Abbildung 32 Aufricht-Aktivität im zeitlichen Verlauf über 48 Stunden
Dargestellt ist die Aufricht-Aktivität aller Genotypen aufgeteilt nach Männchen (A; wt n=3, het n=10, ko n=5) und Weibchen (B; wt n=6, het n=10, ko n=8) als Stundenmittelwerte und Standardabweichung. Die Dunkelphase ist grau hinterlegt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zwei-Wege-ANOVA mit Messwiederholungen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet ($p < 0{,}05$; **a** ko ≠ wt; **b** ko ≠ wt & het; **c** ko ≠ het; **d** het ≠ wt & ko; **e** wt ≠ het ≠ ko; **f** wt ≠ het & ko;).

Aus diesen Messungen lässt sich ableiten, dass die FTO-Defizienz homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse keinen Effekt auf die Bewegungsaktivität in Form der zurückgelegten Strecke hatte. Allerdings konnte ein genotypspezifischer Effekt auf das Erkundungsverhalten der Mäuse gefunden werden. Die geringere Aufrichtaktivität liefert somit eine Erklärung für den geringeren Energieumsatz homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse in der Nacht und könnte zusätzlich ein Anzeichen für einen ängstlichen und neurologischen Phänotyp darstellen.

3.2.6 *Fto*^{tm1b} - fettreiche Fütterung

Genetische Veranlagung kann Ursache für die Gewichtszunahme bei energiereicher Ernährung sein, der sogenannten diät-induzierten Adipositas (DIO). Aus diesem Grund wurde eine Kohorte männlicher *Fto*^{tm1b} Mäuse im Alter von 20 Wochen auf eine fettreiche Diät umgestellt und der Einfluss von FTO auf die Körpergewichtsentwicklung untersucht. Die Diät-Umstellung erfolgte innerhalb einer neuntägigen Messung in der *Feeding-Drinking-Activity* Anlage, die auch für die Messung der Bewegungsaktivität verwendet wurde (siehe 3.2.5). In dem Experiment wurde auf eine Gruppe, die mit Kontrolldiät gefüttert wurde verzichtet, da es in diesem Experiment ausschließlich auf den Effekt der fettreichen Diät auf die Entwicklung des Körpergewichtes ging.

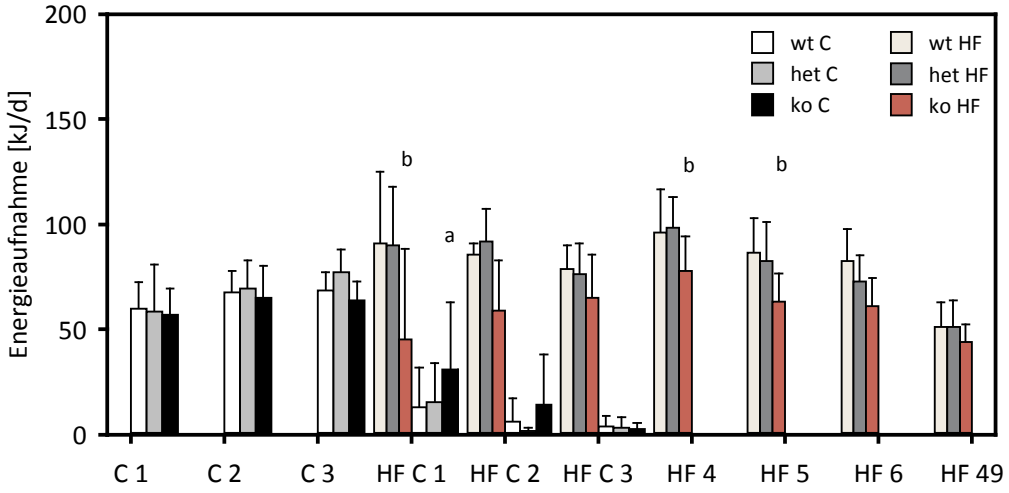

Abbildung 33 Energieaufnahme von *Fto*^{tm1b} Mäusen im Futterwahlversuch
Futterwahlversuch über 9 Messtage mit drei Tagen Vorlauf (Haltungsdiät; C), drei Tage Futterwahl zwischen fettreichem Futter (HF) und C sowie abschließend drei Tagen ausschließliche HF Fütterung, ergänzend dazu ist die Futteraufnahme nach sieben Wochen fettreicher Fütterung (HF 49) abgebildet. Dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zwei-Wege-ANOVA mit Messwiederholungen. Eine statistische Signifikanz ist mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet ($p < 0{,}05$; **a** ko ≠ het (C); **b** ko ≠wt & het (HF)).

Die fettreiche Fütterung erfolgte mit ausgewachsenen Mäusen um ausschließlich Effekte der Fütterung auf die Gewichtszunahme zu erzielen. Alle Mäuse stammten aus der thermoneutralen Zucht und wurden ab dem Absetzen bei Raumtemperatur gehalten. Die Umstellung auf eine fettreiche Diät wurde im Rahmen eines Futterwahlversuches durchgeführt. Jeweils drei Tage wurde den Mäusen Haltungsfutter, eine fettreiche Diät oder beides angeboten. Bei Fütterung der Haltungsdiät hatten alle Mäuse eine vergleichbare Energieaufnahme (Abbildung 33). Während der Futterumstellung bevorzugten die Mäuse zunehmend das fettreiche Futter, bei homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäusen setzte diese Reaktion verzögert ein. Die tägliche Energieaufnahme aller Mäuse war in den ersten Tagen der fettreichen Fütterung erhöht und nahm im Laufe des Experiments wieder ab, so dass am Versuchsende die Energieaufnahme der zu Versuchsbeginn entsprach. Bei homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäusen konnte während der gesamten Fütterungsdauer der Trend zu einer reduzierten Energieaufnahme festgestellt werden, der zu Beginn der Fütterung signifikant war.

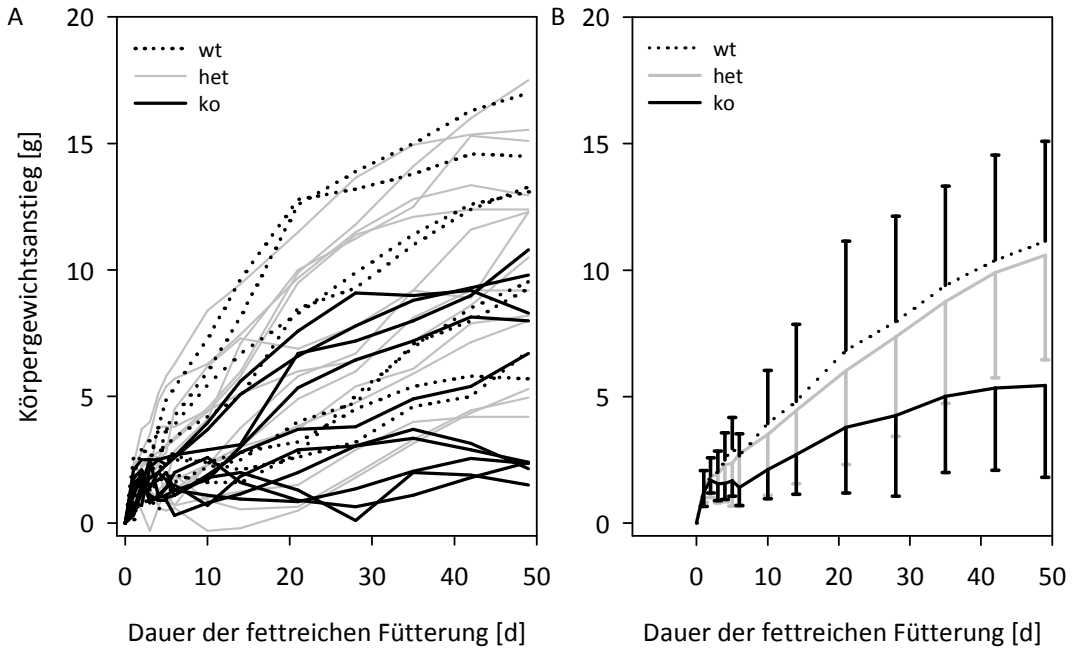

Abbildung 34 Körpergewichtsanstieg über 7 Wochen fettreicher Fütterung
Anstieg des Körpergewichts homozygoter *Fto*^{wt} (wt n=8) und *Fto*^{tm1b} (ko n=10) sowie der *Fto*$^{wt/tm1b}$ Mäuse (het n=14) nach Umstellung auf fettreiche Fütterung als Einzeltierverläufe (A) sowie als Gruppenmittelwert und Standardabweichung (B).

Zu Beginn des Experiments waren alle FTO-defizienten Mäuse wie in den vorangegangenen Experimenten kleinwüchsig und leichter als ihre Wurfgeschwister (wt: 28,4 g + 1,37; het: 27,9 g + 2,71; ko: 20,9 g + 1,04). In den ersten sieben Tagen fettreicher Fütterung war der Gewichtsanstieg der Gruppen etwa gleich hoch. Nach sieben Wochen fanden sich bei allen Genotypen Mäuse, resistente und empfängliche Mäuse für DIO. Fünf *Fto*^{tm1b} Männchen fielen besonders auf, da deren Körpergewicht nach einer Woche fettreicher Fütterung stagnierte. (Abbildung 34A). Dies führte nach sieben Wochen zu einer geringeren, mittleren Gewichtszunahme homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern, die keine statistische Signifikanz erreichte. Vier homozygote sowie drei heterozygote Mäuse mit DIO-Resistenz entwickelten zudem eine ausgeprägte Dermatitis im Kopf- und Wangenbereich (Abbildung 35). Bei Mäusen ohne Dermatitis war der prozentuale Gewichtsanstieg zwischen den Genotypen vergleichbar. Genetische Prädisposition führt bei C57BL/6 Stämmen zu Dermatitis, deren Entwicklung durch fettreiche Fütterung oder genetische Veränderungen zusätzlich begünstigt wird (Hampton et al., 2012). Die Stagnation des Körpergewichtsanstiegs in den betroffenen Mäusen vermutlich durch die Dermatitis und der damit den verbundenen Belastungen (Juckreiz, Unwohlsein) ausgelöst.

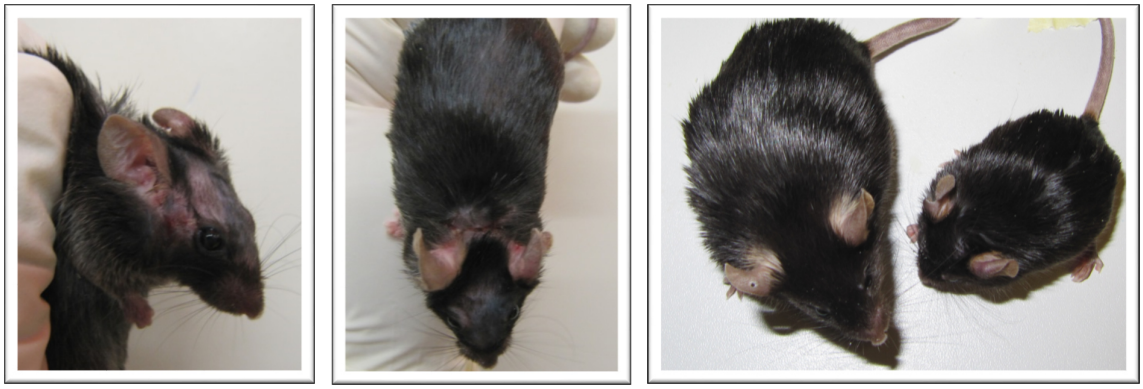

Abbildung 35 Dermatitis homozygoter, fettreich gefütterter *Fto*^{tm1b} Mäuse
Im Verlauf der Fütterung mit fettreicher Diät entwickelten einige der homozygoten und wenige heterozygote *Fto*^{tm1b} Mäuse durch Juckreiz ausgelöste offene Hautstellen. Diese befanden sich vor allem in der Kopfregion und waren begleitet von geröteten und geschwollenen Hautpartien, vor allem an den Körperanhängen. Zusätzlich entwickelten alle fettreich gefütterten Mäuse ein fettig verklebtes Fell.

Gewebeproben einiger der betroffenen Mäuse sowie deren wildtypischer Wurfgeschwister wurden am Zentrum Allergie und Umwelt (ZAUM) der TUM von Frau Professor Claudia Traidl-Hoffmann mikroskopisch untersucht. Dem zufolge konnten klar erkennbare Unterschiede zwischen *Fto*^{wt} und *Fto*^{tm1b} Mäusen in Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitten festgestellt werden. Bei den untersuchten *Fto*^{tm1b} Mäusen wurde eine sehr dicke Epidermisschicht, teilweise mit Entzündungsinfiltrat, Hyperkeratose und Parakeratose festgestellt. Zur weiteren Abgrenzung und Beschreibung des Krankheitsbildes sprachen die Dermatologen die Empfehlung aus, weitere Untersuchung der Proben auf Verhornungsmarker (Keratin 10 und 14, Involucrin), Proliferationsmarker (Ki67), und Entzündungsmarker (CD1a) durchzuführen.

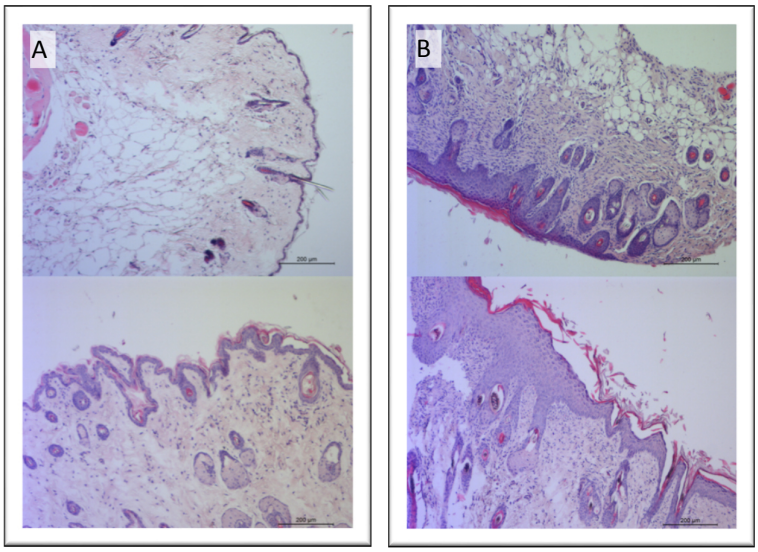

Abbildung 36 Histologie von Hautproben fettreich gefütterter Mäuse
Repräsentative Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Hautproben der Wangenregion homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse (B) mit äußerlichen Veränderungen der Haut sowie deren wildtypische Kontrollen (A). Wildtypische Schnitte zeigten im Gegensatz zu *Fto*^{tm1b} Proben eine dünne, gleichmäßige Epidermis und wenig Verhornung (rote Färbung).

Während der Aktivitätsmessungen nahm die Aktivität der Mäuse nach einer anfänglichen Erkundungsphase im Versuchsverlauf ab (Abbildung 37A). Gleiches galt für das Aufrichten. Wie bereits in vorangegangenen Messungen beobachtet (siehe 3.2.5), zeigten *Fto*^{tm1b} Mäuse dieses Versuchs einen Trend zu weniger Gesamtaktivität und kaum Erkundungsverhalten (Abbildung 37).

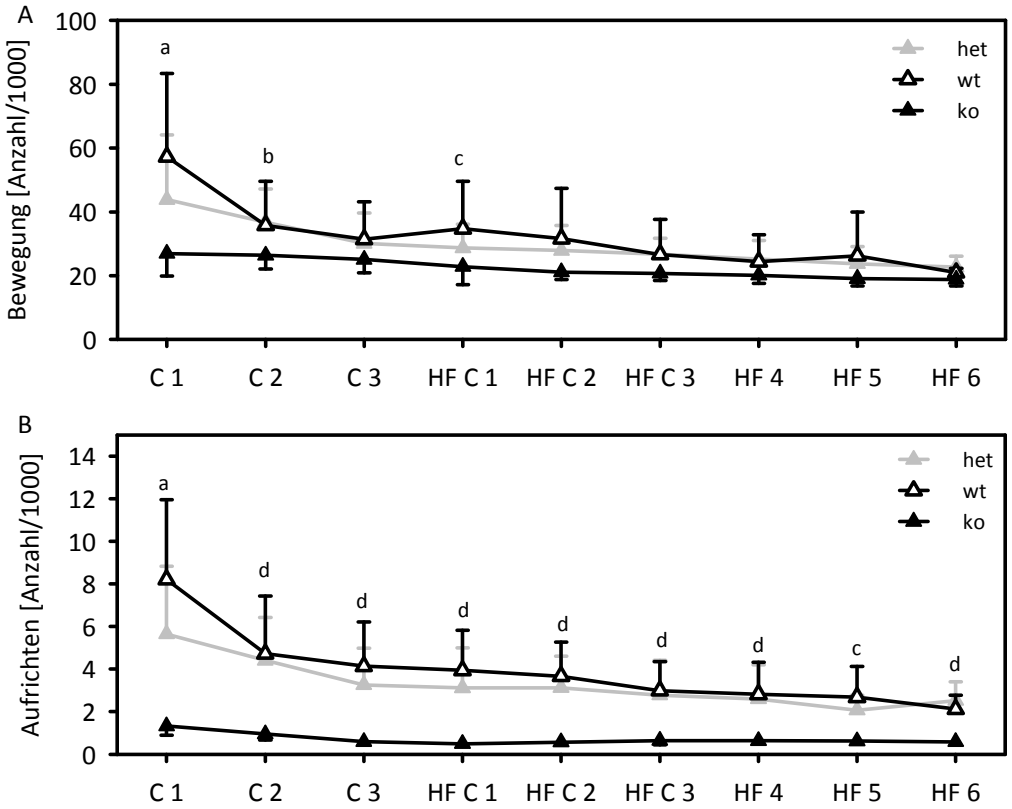

Abbildung 37 Aktivität im Tagesdurchschnitt während der Umstellung auf ein fettreiche Diät
Bewegungsaktivität in x-Richtung (A) sowie Aufricht-Aktivität (B) dargestellt als Tagesmittelwert + Standardabweichung der jeweiligen Genotypen (wt n=8; het n=14; ko n=10). Die statistische Auswertung erfolgte mittels zwei-Wege-ANOVA mit Messwiederholungen. Signifikante Genotypunterschiede sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet (p <0,05; **a** wt ≠ het ≠ ko; **b** ko ≠ het; **c** ko ≠ wt; **d** ko ≠ wt & het).

Am Ende des Fütterungsexperiments wurde allen Mäusen die Leber entnommen und für histologische Untersuchungen aufgearbeitet. Fetteinlagerungen in der Leber sind oft eine Folgeerscheinung fettreicher Fütterung und können sich zu einer nicht-alkoholischen Fettleber (NAFL) bis hin zur nichtalkoholischen Steatohepatits (NASH) oder Leberzirrhose entwickeln. In allen Hämatoxylin-Eosin gefärbten Paraffinschnitten wurden kaum oder nur leichte Fetteinlagerungen festgestellt (Abbildung 38). Es wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen beobachtet.

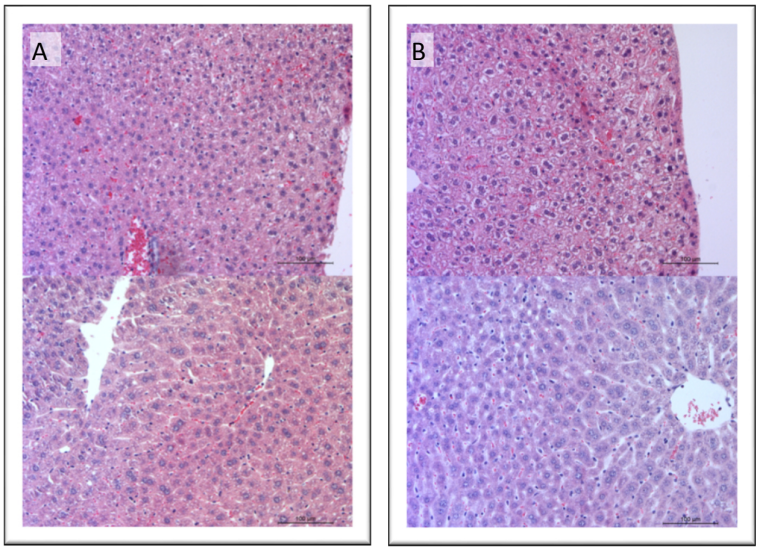

Abbildung 38 Leberhistologie von repräsentativen Gewebeschnitten
Hämatoxylin-Eosin gefärbte Leberschnitte in 200-facher Vergrößerung. Repräsentative Gewebeschnitte für fettreichgefütterte *Fto*^{wt} (A) und *Fto*^{tm1b} (B) Mäuse. Beide Genotypen zeigen sowohl keine als auch leichte Einlagerung von Fett in der Leber.

Sowohl in ihrer Neigung zu diät-induzierter Adipositas, als auch bei der Entwicklung adipositas-assoziierter Folgeerkrankungen wie der Fettleber konnten somit keine Unterschiede zwischen den Genotypen in *Fto*^{tm1b} Mäusen festgestellt werden. Bei fettreicher Fütterung waren *Fto*^{tm1b} Mäuse allerdings sensitiver für die Entwicklung einer Dermatitis. Neben verringertem Aufrichtverhalten konnte während des Futterwahlversuches ein weiterer neurologischer Phänotyp identifiziert werden. Die zentral gesteuerte Präferenz für fettreiches Futter setzte während des Futterwahlversuches bei homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäusen im Vergleich zu den anderen Genotypen erst verzögert ein. Dieser Befund sowie das reduzierte Aufrichtverhalten der Mäuse deutete darauf hin, dass das dopaminerge System, in FTO-defizienten Mäusen weniger aktiv war. Denn neben Belohnungs- und Suchtverhalten hat Dopamin einen Einfluss auf grobmotorische Bewegungsabläufe sowie die Motivation. Die Ursache der verringerten Aufrichtaktivität homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, seien es nun neurologische Ursachen oder fehlende Muskelmasse und –kraft.

4 DISKUSSION

4.1 HINTERGRUND DER ARBEIT

Die steigende Zahl adipöser Menschen in der Bevölkerung wird zu einer immer größeren Herausforderung für Forschung und Gesundheitssystem. Neben den psychologischen Effekten geht Übergewicht oft mit Komponenten des Metabolischen Syndroms einher. Hierzu zählen neben Fettleibigkeit fehlregulierte Blutfett- und Glukosespiegel sowie Bluthochdruck. Zudem gilt Übergewicht als Risikofaktor für die Entwicklung koronarer Herzerkrankungen, Arteriosklerose und bestimmter Krebsarten. Der rasche Anstieg ist zum einen durch einen sesshaften Lebensstil bedingt, zum anderen durch genetische Prädisposition. Sie beeinflusst unter anderem die Verwertbarkeit der aufgenommenen Nahrung, sowie den Energieumsatz. In einem geringen Anteil sehr adipöser Menschen ist der Defekt eines einzigen Gens für die Entwicklung des Übergewichts oder einer Fettleibigkeit verantwortlich. Häufig sind in diesen Fällen Gene des Leptin-Melanocortin-Signalweges oder nachfolgende Signalkaskaden betroffen. Mutationen im Melanocortin 4 Rezeptor (MC4R) sind dabei am häufigsten (Yeo et al., 1998). In den meisten Fällen dagegen führt die Summe mehrerer Polymorphismen zu einer Erhöhung des Body-Mass-Indexes (BMI). Durch sogenannte genomweite Assoziationsstudien (GWAS), die Kohorten von mehreren tausend Probanden umfassten, konnten mittlerweile Polymorphismen einzelner Nukleotide (*single nucleotide polymorphism*; SNP) identifiziert werden, die mit einem erhöhten BMI, Taillenumfang oder Insulinresistenz (Chambers et al., 2008) assoziiert sind. Die ersten so gefundenen Adipositas-SNPs waren Polymorphismen im *MC4R* Gen sowie in Introns des Gens von *fat mass and obesity associated* (*FTO*). Eine mögliche Rolle von FTO in der Entwicklung von Adipositas war bis dahin unbekannt.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von MC4R und FTO in der Regulation des Energiehaushalts mit Hilfe geeigneter Mausmodelle untersucht. Bei MC4R handelte es sich um eine *knockin* Mauslinie, die durch eine Punktmutation ein stark verkürztes Protein exprimierte, $Mc4r^{tm1.1Fbz}$ ($Mc4r^{W16X}$) (Bolze et al., 2013). Die essentielle Rolle des MC4R in der Regulation des Energiehaushaltes ist durch verschiedene Mausmodelle bereits etabliert und charakterisiert (Balthasar et al., 2005; Bolze et al., 2013; Huszar et al., 1997). Kontrovers diskutiert wird bislang, welche Ursache zum initialen Körpergewichtsanstieg MC4R-defizienter Mäusen führt. Aus diesem Grund wurde die Mauslinie $Mc4r^{W16X}$ während der Adoleszenz untersucht, um ein Ungleichgewicht der Energiehomöostase aufzudecken, bevor sich der adipöse Phänotyp manifestierte. Zusätzlich wurde die Mauslinie im Primärscreen der Deutschen Mausklinik untersucht, um weitere Adipositas-unabhängige Phänotypen der Mauslinie zu identifizieren.

Des Weiteren wurden zwei *knockout* Mausmodelle für FTO untersucht. Die *knockout-first* Mauslinie Fto^{tm1a} wurde nach basaler Charakterisierung mit einer Cre-deleter-Linie gekreuzt um einen globalen *knockout* zu generieren (Fto^{tm1b}). Ziel war es, den Einfluss des *Fto-knockouts* auf die einzelnen Komponenten der Energiebalance zu ermitteln um die zu diesem Zeitpunkt unbeschriebene Rolle von FTO auf die Entwicklung von Adipositas zu untersuchen.

4.2 ADOLESZENTE *MC4R*-DEFIZIENTE MÄUSE SIND HYPERPHAG UND HYPERMETABOL

Die Besonderheit der untersuchten Mauslinie *Mc4r*^{W16X} liegt darin, dass es sich um ein Mausmodell für eine humane Mutation in adipösen Patienten handelt (Marti et al., 2003). Zusätzlich ist die Mauslinie ein Modell für Erkrankungen die auf vorzeitigem Translationsabbruch durch Stoppmutationen beruhen. Die Mauslinie *Mc4r*^{W16X} trägt eine Punktmutation an Aminosäureposition 16, die zum Austausch eines Tryptophan gegen ein Stopcodon führt (Bolze et al., 2013). Die Untersuchungen der Mauslinie *Mc4r*^{W16X} im Rahmen dieser Arbeit sollten helfen, den Beitrag von Energieumsatz und Energieaufnahme zur Entwicklung des adipösen Phänotyps in diesem Mausmodell aufzuklären. Der Hauptexpressionsort des Rezeptors ist der Hypothalamus, wo er an der Verarbeitung und Umwandlung peripherer Botenstoffe in neuronale Signalkaskaden beteiligt ist. Er spielt eine Schlüsselrolle in der langfristigen Regulation der Nahrungsaufnahme. In dieser Studie wurde die Bedeutung des MC4R bei der Entwicklung von Adipositas in heranwachsenden *Mc4r*^{W16X} Mäusen untersucht.

Nahrungsaufnahme und Energieumsatz der Mäuse entsprachen zum Untersuchungszeitpunkt dem Körpergewicht der Mäuse. Trotzdem zeigten homozygote *Mc4r*^{W16X} Mäuse über den fünfwöchigen Untersuchungszeitraum hinweg eine größere Akkumulation von Fettgewebe als wildtypische Wurfgeschwister. Zusätzlich zur Akkumulation von Fett zeigen MC4R-defiziente Mäuse ein vermehrtes Längenwachstum (Bolze et al., 2013; Huszar et al., 1997). Wie Humanstudien mit adipösen Leptin-, Leptinrezeptor- oder Melanocotinrezeptor-defizienten Patienten zeigen hat das Leptin-Melanocortin-System in der pubertären Wachstumsphase einen großen Einfluss auf die spätere Körpergröße (Farooqi et al., 2007). Studien mit paargefütterten MC4R-defizienten Mäusen zeigen, dass das vermehrte Längenwachstum in Adoleszenten MC4R-defizienten Mäuse durch eine reduzierte Futteraufnahme unterbunden werden kann, die Zunahme der Fettmasse aber unabhängig von der Hyperphagie reguliert wird (Tan et al., 2016). Erhöhte Leptinspiegel sind somit ursächlich für ein vermehrtes Längenwachstum bei MC4R-Defizienz. Dies bestätigen Untersuchungen mit Leptin-defizienten Mäusen, die ein verringertes Längenwachstum haben. Zusätzlich zu Leptin, das in Proportion zur Größe der Fettdepots sezerniert wird, haben junge MC4R-defiziente Mäuse erhöhte Insulinspiegel (Ste Marie et al., 2000). Dies kann auch bei Mäusen beobachtet werden deren Körpergewicht sich noch nicht von dem der wildtypischen Wurfgeschwister unterscheidet (Fan et al., 2000).

In den eigenen Untersuchungen wurde nach Einsetzen des Körpergewichtsanstiegs eine vermehrte Nahrungsaufnahme junger *Mc4r*^{W16X} Mäuse festgestellt. Welche Komponente, Körpergewicht oder Futteraufnahme, Ursache und welche Wirkung ist, lässt sich durch die durchgeführten Untersuchungen aber nicht definieren. Im Untersuchungszeitraum befanden sich die Mäuse im pubertären Wachstumsschub und Wachstum ist eine wesentliche Komponente die zum Energieumsatz beträgt. Aus diesem Grund wurde die Nahrungsaufnahme der untersuchten Mäuse unter Berücksichtigung des Körperwachstums neu kalkuliert und eine Hyperphagie der adoleszenten *Mc4r*^{W16X} Mäuse festgestellt, die einen Beitrag zum Anstieg des Körpergewichtes leistete. Die Nahrungsaufnahme der *Mc4r*^{W16X} Mäuse unterlag in allen durchgeführten Messungen aber auch starken stressbedingten Schwankungen, so dass bei intensivem Handling eine geringere Futteraufnahme beobachtet als in ruhigen Perioden.

Zur weiteren Klärung des kausalen Zusammenhangs zwischen einsetzender Hyperphagie und dem Anstieg des Körpergewichtes wurde der Energieumsatz junger *Mc4r*^{W16X} Mäuse im zeitlichen Verlauf untersucht. Mit Zunahme des Körpergewichtes stieg auch der Energieumsatz der Mäuse entsprechend an. Ab einem Alter von neun Wochen konnte ein erhöhter täglicher Energieumsatz sowie eine erhöhte Ruhestoffwechselrate bei *Mc4r*^{W16X} Mäusen festgestellt werden. Die Körpertemperatur von Männchen im Alter von neun Wochen war dagegen etwas niedriger. Wir konnten somit sowohl Hinweise für eine erhöhte, als auch eine reduzierte Stoffwechselrate finden. Eigene Beobachtungen der Mäuse in unbekannter Messumgebung sowie die Ergebnisse des GMC-Screens belegten weiterhin die Stresssensitivität der *Mc4r*^{W16X} Mäuse. Weitere Anzeichen hierfür waren, neben der reduzierten Futteraufnahme, die geringere Aufrichte-Aktivität im metabolischen Screen sowie erhöhten Spiegeln des Stresshormons Kortikosteron aus dem Steroid-Metabolismus-Screen. Die Freisetzung von Kortikosteron und anderer Glucocorticoide wird durch das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) reguliert. Dieses wiederum wird unter der Kontrolle von Corticoliberin (*corticotropin-releasing hormone*, CRH) ausgeschüttet, welches eine ähnlich anorexigene Wirkung hat wie der MC4R Agonist α-Melanozyten-stimulierendes Hormon (αMSH) (Heinrichs und Richard, 1999). Zudem aktiviert CRH die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (*hypothalamic-pituitary-adrenal*; HPA), welche die direkte Reaktion des Körpers auf Stresssituationen reguliert. Somit spielt CRH eine Rolle bei der Reduktion der Nahrungsaufnahme in sogenannten Kampf-oder-Flucht-Situationen. Einzelhaltung von Mäusen oder intensives Handling stellen Stressoren für Mäuse dar. In Folge derer bei *Mc4r*^{W16X} Mäusen sowohl während der GMC-Untersuchungen, als auch in den eigenen Untersuchungen stressbedingt reduzierte Futteraufnahme beobachtet wurde.

Zusammenfassend lässt sich die primäre Zunahme des Körpergewichtes der *Mc4r*^{W16X} Mäuse mit den durchgeführten Untersuchungen nicht erklären. Vor allem die intensive Untersuchung führte zu vermehrtem Stress, der wiederum Auswirkungen auf die Nahrungsaufnahme der Mäuse hatte. Dem initialen Gewichtsanstieg folge unmittelbar eine erhöhte Nahrungsaufnahme. Mit fortschreitender Fettleibigkeit wurden kompensatorische Mechanismen, wie eine erhöhte Ruhestoffwechselrate oder ein leicht erhöhter Energieumsatz gemessen. Ursächlich für die beobachtete Hyperphagie ist zu Beginn vermutlich ein komplexes Zusammenspiel hormoneller und kompensatorischer Regulationsmechanismen. Im Untersuchungszeitraum im Alter von vier bis neun Wochen befanden sich die Mäuse im pubertären Wachstumsschub. Dieser geht mit einer massiven Hormonumstellung einher. Vermutlich manifestieren sich mit Einsetzen der Pubertät zuerst Unterschiede in der Sekretion bzw. Hormonsensitivität der Mäuse, diesen folgt ein Anstieg in Nahrungsaufnahme und Körpergewicht sowie vermehrtes Längenwachstum und erst mit Abflachen der zweiten Wachstumsperiode manifestieren sich Unterschiede im Energieumsatz. Zum einen führen erhöhte Leptin- und Insulinspiegel vermutlich zu Veränderungen im Glukose- und Lipidstoffwechsel. Auf der anderen Seite aktivieren erhöhte Spiegel des MC4R Agonisten α-MSH alternative Signalwege, wodurch es zur Freisetzung von CRH kommen kann. Dieses wiederum nimmt Einfluss auf die Nahrungsaufnahme, gleichzeitig ist auch die Stressempfindlichkeit sowie der Kortikosteron-Spiegel der Mäuse erhöht (Lu et al., 2003). Zur endgültigen Klärung der Ursache des initialen Gewichtsanstieges junger *Mc4r*^{W16X} Mäuse sind Untersuchungen zum Hormonhaushalt der Mäuse somit unerlässlich.

4.3 FAT MASS AND OBESITY ASSOCIATED - *FTO*

Das *fat mass and obesity associated* Gen *(FTO)* kodiert für eine Demethylase deren Substrat einsträngige DNA und RNA ist (Gerken et al., 2007; Jia et al., 2011; Jia et al., 2008). Methylierung zählt zu den epigenetischen Regulationsmechanismen, die Stabilität, Transkription und Spleißen von DNA bzw. RNA beeinflussen, in welchem mechanistischen Kontext die Demethylaseaktivität von FTO zur Entwicklung von Adipositas steht ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Seit der Erstveröffentlichung von *FTO* als Kandidatengen mit einer der stärksten Adipositas-Assoziationen (Frayling et al., 2007; Scuteri et al., 2007) weiß man heute, dass die identifizierten SNPs nicht nur *FTO* beeinflussen sondern auch benachbarte Gene wie *IRX3* (Claussnitzer et al., 2015). Des Weiteren ist bekannt, dass die Expression von FTO durch den Ernährungsstatus beeinflusst wird (Gerken et al., 2007; Tung et al., 2010). Zeitgleich mit der Adipositas-Assoziation der SNPs in den ersten beiden Introns von *FTO* wurden mehrere Mausmodelle generiert bzw. etabliert. Diese umfassen ENU-Mutanten (Church et al., 2009; Peters et al., 1999), klassische (Fischer et al., 2009) und konditionale *knockout* Linien (Gao et al., 2010; McMurray et al., 2013) sowie Linien mit FTO-Überexpression. (Church et al., 2010).

4.3.1 Fto^{tm1a} - Ein Mausmodell für eine reduzierte Expression von FTO

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem die *knockout-first* Mauslinie $Fto^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ (Fto^{tm1a}) untersucht. Sie wurde über das europäische konditionale Mausmutagenese-Programm (*European Conditional Mouse Mutagenesis Program*; EUCOMM) generiert und ist im europäischen Mausmutanten-Archiv (EMMA) öffentlich zugänglich archiviert. Das *knockout-first*-Konstrukt der internationalen Konsortien soll durch eine Genfalle den Funktionsverlust des Zielgens bewirken. Zusätzlich bieten diese Mauslinien die Möglichkeit, des konditionalen *knockouts*, wodurch sie für ein breites Feld an wissenschaftlicher Forschung attraktiv sind.

Wir konnten zeigen, dass es sich bei der Mauslinie nicht um ein *knockout* Modell handelt, sondern die Expression von FTO reduziert war, es sich somit um ein *knockdown* Modell handelte. Zusätzlich zeigte die Mauslinie keinen pathologischen Phänotyp wie er von anderen FTO-defizienten Mauslinien bekannt ist. Verschiedene neuere Publikationen geben hierauf keinen Hinweis. Sie verwenden die Mauslinie als Modellsystem für den *knockout* von FTO (Hess et al., 2013; Ronkainen et al., 2015; Ronkainen et al., 2016). Der Schwerpunkt der Arbeiten lag auf den neurologischen Funktionen und dem zellspezifischen *knockout* von FTO (Hess et al., 2013) oder einer fettreichen Fütterung der Mauslinie Fto^{tm1a} (Ronkainen et al., 2015; Ronkainen et al., 2016). Wie in den eigenen Untersuchungen war das Ausgangskörpergewicht der aller Mäuse identisch. Im Verlauf der fettreichen Fütterung zeigte sich eine Resistenz homozygoter Fto^{tm1a} Mäuse gegenüber diät-induzierter Adipositas, weswegen die Mauslinie als Modellsystem zur Untersuchung von FTO empfohlen wird. Zusätzlich zur Resistenz gegenüber diät-induzierter Adipositas beschreiben diese Publikationen ein verstärktes *browning* des weißen Fettgewebes durch die fettreiche Fütterung.

Der *knockdown* von FTO wurde in dieser Arbeit auf mRNA und Proteinebene untersucht. Oben genannte Publikationen berufen sich auf Wester Blot Analysen um den *knockout* zu belegen (Hess et al., 2013; Ronkainen et al., 2015; Ronkainen et al., 2016). Wir konnten auch in unseren Untersuchungen zeigen, dass die Proteinmenge von FTO im Western Blot unterhalb der Nachweisgrenze lag und trotzdem wildtypische mRNA in Fto^{tm1a} Mäusen nachgewiesen wurde. Hieraus

schließen wir, dass die Mauslinie geringe Mengen wildtypisches FTO exprimiert, die ausreichen um ein normales Körperwachstum zu beobachten. Diese Hypothese könnte durch eine quantitative PCR untermauert werden. Als Ursache für die wildtypische mRNA in *knockout*-first Mäusen gehen wir von alternativem Spleißen nahe der *internal ribosome entry site* (IRES) aus (Fu et al., 2010). Letztere sollte Startpunkt für die ribosomale Translation des β-Galaktosidase/Neomycin-Fusionsproteins sein und war in allen *knockout-first* Linien der ersten Generation enthalten (Testa et al., 2004). In neueren Mauslinien aus dem EUCOMM-Programm wurde ein modifizierter Target-Vektor verwendet, der eine alternative Strategie zur Expression der Selektionsmarker nutzt (Fu et al., 2010; Szymczak et al., 2004) Dass die *knockout-first* Mauslinie Fto^{tm1a} zur Untersuchung des Einflusses von FTO auf den Energiehaushalt auch ihre Berechtigung hat zeigen die Studien mit fettreicher Fütterung (Ronkainen et al., 2015; Ronkainen et al., 2016). Diese zeigten, dass die niedrigen Spiegel von FTO zu einer Resistenz gegen diätinduzierte Fettleibigkeit führten. Zugleich führt die fettreiche Fütterung zu einer Rekrutierung von braunen Fettzellen im weißen Fettgewebe.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Mauslinie Fto^{tm1a} sehr gut geeignet ist um den Einfluss von FTO auf den Stoffwechsel zu untersuchen. Geringe Mengen von FTO sind demnach ausreichend um ein normales Wachstum der Maus zu gewährleisten und entsprechen vermutlich eher der humanen Situation. Hier tragen SNPs zu einer veränderten FTO-Aktivität bei und führen so zu geringen Variationen des BMI (Speliotes et al., 2010). Für Fragestellungen, in denen eine FTO-Defizienz Untersuchungsgrundlage ist, ist diese Mauslinie wegen der verbleibenden Restaktivität von FTO ungeeignet.

4.3.2 Kleinwüchsig und fettleibig durch Wachstumsverzögerung in früher Welpenphase

Zur vollständigen Inaktivierung des *Fto*-Gens wurde die Mauslinie Fto^{tm1a} mit einem Cre-deleter Stamm gekreuzt (C57BL/6NTac-Gt(ROSA)26Sor$^{tm16(cre)Arte}$), um die Mauslinie Fto^{tm1b} zu erzeugen. Diese exprimierte weiterhin die Genfalle mit Neomycin-Resistenz und dem Reportergen β-Galaktosidase unter der Kontrolle des *Fto*-Promotors. Die keimbahnvermittelte Rekombination der loxP-Sequenzen hatte eine Deletion von Exon 3 sowie eine Verschiebung des offenen Leserahmens (*Frameshift*) zur Folge. Hierdurch wurde ein frühzeitiger Translationsabbruch bewirkt. Von 502 proteincodierenden Aminosäuren wurden 41 Aminosäuren regulär translatiert, 34 weitere Aminosäuren resultierten aus dem *Frameshift*. Das deletierte Exon 3 ist das größte Exon des *Fto*-Gens und codiert für die katalytische Domäne des Proteins, welche für die Demethylase-Funktion von FTO essentiell ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Mauslinie Fto^{tm1b} zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten charakterisiert. Bereits wenige Tage nach der Geburt manifestierte sich bei homozygoten Fto^{tm1b} Welpen eine Wachstumsverzögerung, die in einem geringeren Absetzgewicht resultierte. Zusätzlich konnten eine hohe Sterblichkeit sowie eine allgemein schlechte Konstitution dieser Jungtiere beobachtet werden. Diese Merkmale werden oft im Zusammenhang mit Unterernährung oder Defekten in der Signalvermittlung des Wachstumshormons Somatotropin (*growth hormone*, GH) bzw. dem nachgeordneten Somatomedin C (*Insulin-like growth factor 1*; IGF1) beobachtet (Carro et al., 1997; Hawkes und Grimberg, 2015). Ab Geburt sind GH und IGF1 die Hauptwachstumsfaktoren (Lupu et al., 2001). Die Sekretion von GH ist abhängig vom Adipokin Leptin und korreliert folglich unmittelbar mit dem Ernährungszustand (Carro et al., 1997). Bei Unterernährung wird vom Fettgewebe wenig Leptin sezerniert, es kommt zu einer reduzierten Ausschüttung von GH und somit zu einer

Wachstumsverzögerung. Im Fall einer Überernährung und hohen zirkulierenden Spiegel von Leptin dagegen wird ein vermehrtes Längenwachstum beobachtet, wie im Fall der untersuchten Mauslinie *Mc4r*^{W16X} (Bolze et al., 2013). Die Hauptwirkorte von GH sind Knochen, Knorpel, Leber und Muskel, in den letzten beiden sorgt es zur vermehrten Bildung von IGF1. Der *knockout* von *Igf1* (Igf1$^{-/-}$) führt zu unter anderem zu einer verkürzten Lebensspanne, postnataler Kleinwüchsigkeit und Entwicklungsstörungen von Skelett, Muskeln und Reproduktionsapparat (Liu et al., 2000). Der Phänotyp der beiden Mauslinien *Fto*^{tm1b} und *Igf1*$^{-/-}$ ist folglich sehr ähnlich. Die Transkription von ist *Igf1* sehr komplex reguliert. Neben zwei alternativen Promotoren (*transcriptional start site*; TSS) gibt es verschiedene Spleiß-Varianten sowie posttranslationale Modifikationen, wodurch es zur Transkription diverser *Igf1*-Prohormone kommt, die sowohl eine Gewebsspezifität, als auch eine Wirkungs-Spezifität aufweisen (Philippou et al., 2014). Eigene Analysen zur mRNA Expression von IGF1 im Skelettmuskel zeigten keine Unterschiede zwischen wildtypischen und homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäusen.

In einsträngigen Nukleinsäureketten demethyliert FTO N^6-Methyladenosin (m^{6}A) (Jia et al., 2011; Jia et al., 2008). Besonders häufig ist m^{6}A an der TSS, in der Nähe des Stopcodons und an Spleißstellen zu finden (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012). Eine gestörte oder veränderte mRNA-Prozessierung kann unter anderem zum Abbau der mRNA oder fehlerhaftem Spleißen führen. Durch die FTO-Defizienz wird so vermutlich die Demethylierung und Prozessierung von Transkripten verändert, unter anderem der *Igf1*-mRNA, wodurch die Hormonspiegel von IGF1 sowie dessen Prohormonvarianten beeinflusst werden. Diese Fehlregulation wiederum führte zu dem kleinwüchsigen Phänotyp, ähnlich dem der Igf1$^{-/-}$ Mäuse. Durch die Variabilität in der Verteilung von m^{6}A in Transkripten, den unterschiedliche Varianten der mRNA-Prozessierung sowie der Unterschiede in der biologischen und gewebsspezifischen Aktivität diverser IGF1-Vorstufen führte der *knockout* von FTO demnach zu einer Reduktion spleißabhängiger IGF1-Varianten.

Neben des kleinwüchsigen Körperbaus war auch die fettfreie Masse der *Fto*^{tm1b} Mäuse auffällig reduziert. Diese könnte ebenfalls Folge des IGF1-Mangels in homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäusen sein. Die intrazelluläre Signalvermittlung durch den IGF1- oder Insulin-Rezeptor löst vom Zellwachstum über Differenzierung bis hin zur Apoptose der Zellen ein breites Spektum an Signalkaskaden aus. Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Myogenin beispielsweise, der die Expression Proliferations- und Differenzierungsgenen in Myoblasten aktiviert, trägt IGF1 zur Hypertrophie des Skelettmuskels bei (Florini et al., 1996; Florini et al., 1991; Rommel et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass FTO neben den zirkulierenden *Igf1*-Spiegel (Gao et al., 2010) auch die Expression von Myogenin beeinflusst (Wang et al., 2017). Die eigenen Daten belegen, dass auch in den untersuchten Mäusen die mRNA Expression von Muskeldifferenzierungsmarkern verringert war. Der *knockdown* verschiedener *Igf1*-Speißvarianten führte zudem zu unterschieden in der Muskeldifferenzierung von C2C12 Zellen (Matheny und Nindl, 2011). Die ordnungsgemäße Prozessierung der *Igf1*-mRNA ist somit für die Vielzahl sezernierter und biologisch aktiver Spleißvarianten von Bedeutung, um dessen gewebsspezifische Wirksamkeit entfalten zu können, wie beispielsweise die Myogenin gesteuerte Muskeldifferenzierung. Ob FTO dabei von Bedeutung ist, ist nicht bekannt sondern kann nur vermutet werden.

Die Untersuchung der murinen *Major Urinary Proteins* (MUP) konnte die Rolle von GH an der Entwicklung des kleinwüchsigen Phänotyps nicht aufklären. Wegen der multihormonellen Regulierung

dieser Proteinfamilie konnte eine verringerte Expression der MUP auf Grund der Entwicklungsverzögerung und sexueller Unreife nicht ausgeschlossen werden.

Die Ursache des kleinwüchsigen Phänotyps ließ sich somit aus den durchgeführten Untersuchungen nicht klar belegen und beruht im Nachfolgenden auf Hypothesen. Die Unterernährung der neugeborenen Welpen hatte eine verringerte Leptinsekretion und nachfolgend eine reduzierte GH-Sekretion zur Folge. Um diese Hypothese zu stützen sind weitere Untersuchungen zum Hormonhaushalt der Nestlinge nötig. Zusammengefasst könnte ein Zusammenspiel von Unterernährung mit daraus resultierender niedriger GH-Sekretion und eine fehlerhafter IGF1-Prozessierung Ursache für die Wachstumsverzögerung und geringe fettfreie Masse homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse sein.

4.3.3 *FTO*-Defizienz führt zu veränderter Energiepartionierung

Auch für die Mauslinie *Fto*^{tm1b} wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Energiebilanz erstellt. In der Nettoenergieaufnahme konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen gemessen werden. Sowohl in der Effizienz, mit der Energie aus der Nahrung resorbiert wurde, als auch in der Bruttoenergieaufnahme der Genotypen war identisch. Homozygote *Fto*^{tm1b} Mäuse nahmen so viel Energie aus der Nahrung auf wie man für ihr Körpergewicht erwarten würde und auch das Fressverhalten entsprach der erwarteten tageszeitlichen Periodik.

Eine konstante Komponente des Energieumsatzes ist der Ruheumsatz (*resting metabolic rate*; RMR). Adjustiert auf Körpergewicht oder fettfreie Masse konnte bei homozygoten *Fto*^{tm1b} Mäusen ein erhöhter Ruheumsatz gemessen werden. Die RMR ist ein Teil des gesamten täglichen Energieumsatzes (*daily energy expenditure*; DEE), welcher sich aus der Summe aller energieverbrauchenden Prozesse eines Organismus ergibt. Wir konnten zeigen, dass der Ruheumsatz homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse unter Berücksichtigung der Körperzusammensetzung erhöht war, die Nahrungsaufnahme zwischen den Genotypen dagegen gleich. Des Weiteren konnten wir eine wenig ausgeprägte tageszeitliche Periodik der Mäuse feststellen. Dies deutet darauf hin, dass eine der tageszeitlich variablen Komponenten des Energieumsatzes in den *knockout* Mäusen fehlreguliert war. Dies sind neben der Körpertemperatur unter anderem Aktivität und Nahrungsaufnahme.

Während unsere Untersuchungen keine genotypspezifischen Unterschiede in der rektalen Körpertemperatur oder der Gesamtaktivität der Mäuse feststellen konnten, zeigten homozygote *Fto*^{tm1b} Mäuse eine reduzierte Aufricht- und Erkundungsaktivität. Diese zeigte die gleiche Periodizität wie der Energieumsatz. Unterschiede im Energieumsatz könnten somit auf eine verringerte Aufrichtaktivität zurückzuführen sein. Die Körpertemperatur wurde ausschließlich in der Ruhephase gemessen. Typischerweise unterliegt die Körpertemperatur circadianen Schwankungen. Der nächtliche Anstieg der Körpertemperatur beruht vor allem auf dem thermischen Effekt der Nahrung, also dem Energieumsatz der zur Verwertung und Verdauung der Nahrung aufgewendet werden muss (Reed und Hill, 1996).

Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass die Mauslinie *Fto*^{tm1b} eine veränderte Partitionierung ihres Energieumsatzes hatte. Einem erhöhten Ruhestoffwechsel stand ein reduzierter Energieumsatz durch Erkundungsaktivität gegenüber. Unterschiede in der circadianen Regulation der Thermogenese wurden nicht untersucht, könnten aber weitere wertvolle Hinweise, zum thermischen Effekt der Nahrung liefern. Es lässt sich nicht ausschließen, dass der erhöhte Ruhestoffwechsel einen

thermogenen Charakter hatte und der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur bei Raumtemperatur diente. Durch Unterschiede in der Isolation können zwei Organismen die gleiche Körpertemperatur aufrecht halten, auch wenn ein Organismus mehr Wärme produziert. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, eine Wiederholung der Studie mit Mäusen, die in Thermoneutralität gehalten wurden und zeitgleicher Aufzeichnung der Körpertemperatur durch Transponder könnte in diesem Punkt weitere Klarheit bringen.

4.3.4 *FTO* beeinflusst das dopaminerge Belohnungssystem

Genomweite Assoziations-Studien (GWAS) zeigten nicht nur erstmals einen Zusammenhang zwischen FTO und dem BMI bzw. Adipositas auf (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007; Scuteri et al., 2007), sie zeigten auch Assoziationen mit anderen Krankheitsbildern oder Verhaltensauffälligkeiten. Vor allem der SNP rs9939609 ist mit Hyperphagie oder der Vorliebe für energiedichte Nahrung verbunden (Cecil et al., 2008; Frayling et al., 2007), korreliert aber auch negativ mit der Prävalenz für Suchtkrankheiten wie Alkohol- und Nikotinabhängigkeit (Sobczyk-Kopciol et al., 2011). Die Expression von FTO ist ubiquitär mit besonders hoher Expression im zentralen Nervensystem (ZNS) (Gerken et al., 2007). Neben seinem Einfluss auf den Energieumsatz hat FTO einen großen Einfluss auf das Belohnungssystem im ZNS.

Das dopaminerge System im ZNS ist maßgeblich an der Regulation des Lernens, des Belohnungssystems, der motorischen Steuerung und der Nahrungsaufnahme beteiligt. Verringerte FTO-Spiegel in dopaminergen Neuronen haben einen Einfluss auf die Signalweiterleitung (Hess et al., 2013). Mäuse mit gewebsspezifischer FTO-Defizienz in dopaminergen Neuronen reagieren weniger sensitiv auf die Stimulation durch Kokain als Kontrollen. Dies lässt den Schluss zu, dass das Belohnungssystem dieser Mäuse gestört ist. Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Futterwahlexperiment unterstützt diese These. Homozygote *Fto*^{tm1b} Mäuse entwickelten später als wildtypische eine Vorliebe für die schmackhafte Diät.

Des Weiteren wurde eine geringere Aufrichte-Aktivität in den Aktivitätsmessungen festgestellt. Diese dient dem Erkunden einer neuen Umgebung, der Orientierung und der Nahrungssuche. Durch das Aufrichten kann die Maus mehr Informationen zu ihrer Umgebung sammeln, weswegen das Verhalten in der Nacht ausgeprägter gezeigt wird als in der Ruhephase am Tag (Ennaceur, 2014). Die Aufrichte-Aktivität wird als Parameter zur Bestimmung der Ängstlichkeit verwendet und eine reduzierte Aktivität wird mit einer erhöhten Ängstlichkeit assoziiert. Weniger Aufrichte-Aktivität der *Fto*^{tm1b} Mäuse könnte auf ein verändertes Angstempfinden hindeuten oder eine Folge reduzierter Muskelkraft durch die geringeren Muskelmasse sein.

Ein weiteres phänotypisches Merkmal der *Fto*^{tm1b} Mäuse war die Entwicklung einer Dermatits im Kopf- und Nackenbereich während der fettreichen Fütterung, deren Auslöser hier nicht näher untersucht wurde. Vor allem C57BL/6 Stämme neigen zur Entwicklung einer eitrigen Dermatitis, die Ursachen hierfür können sowohl Alter und Geschlecht als auch Diät oder das Alter beim Absetzen sein (Hampton et al., 2012). In unseren Experimenten war die Dermatitis und damit verbundene Schmerzen vermutlich der Auslöser für die Stagnation des Körpergewichtes betroffener Mäuse. Welche Rolle FTO bei der Ausprägung dieses Krankheitsbildes spielen könnte ist nicht klar.

Die untersuchte Mauslinie *Fto*^{tm1b} war somit gekennzeichnet durch einen kleinwüchsigen Phänotyp der sich bereits im Nestlingsalter manifestierte. Ursache hierfür könnte eine reduzierte

Nahrungsaufnahme als Welpe gewesen sein, die wiederum zu einer verringerten Ausschüttung von Wachstumshormon führte. Des Weiteren könnte der *knockout* von FTO in einer veränderten mRNA-Prozessierung von Somatomedin C (IGF1) resultieren. Die veränderte Sekretion unterschiedlicher IGF1-Varianten hatte eventuell Auswirkungen auf verschiedene Zielgewebe, wie z. B. dem Skelettmuskel und die Differenzierung von Muskelzellen, welche die verringerte Muskelmasse homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse erklären würde. Es handelt sich hierbei um eine Hypothese, die im Rahmen dieser Arbeit experimentell nicht belegt wurde. Die geringere Muskelmasse und damit verbunden auch eine geringere Kraft der Mäuse könnte zu weniger Aufrichtaktivität geführt haben. Dem damit verbundenen geringeren Energieumsatz der Mäuse stand wiederum ein erhöhter Ruheumsatz entgegen. Zusätzlich konnten neurologische Veränderungen der Mäuse beobachtet werden, z. B. weniger Erkundungsverhalten und eine langsamere Reaktion auf einen Belohnungsreiz (schmackhafte Diät). Somit kann gesagt werden, dass durch die Aktivität von FTO vermutlich eine Vielzahl an Proteinen und Signalwegen reguliert wird, die sowohl im zentralen Nervensystem, als auch in der Peripherie einen unmittelbaren oder auch indirekten Einfluss auf den Energiehaushalt ausüben.

4.4 NAHRUNGSAUFNAHME ALS ENTSCHEIDENDER FAKTOR IN DER REGULATION DES KÖRPERGEWICHTES

Unsere Untersuchungen von Mausmodellen für Kandidatengene von Adipositas haben gezeigt, dass die Nahrungsaufnahme eine entscheidende Komponente in der Entwicklung eines körpergewichts-assoziierten Phänotypes ist. Sowohl im Mausmodell *Mc4r*^{W16X}, als auch bei *Fto*^{tm1b} Mäusen entwickelte sich ein Körpergewichtsphänotyp durch Über- bzw. Unterernährung während einer Wachstumsphase. Das Fettgewebshormon Leptin könnte hier bei beiden Modellen eine entscheidende Rolle spielen.

Bei *Mc4r*^{W16X} Mäusen steht Leptin im direkten Zusammenhang mit der Entwicklung von Übergewicht im untersuchten Mausmodell. Die MC4R-Defizienz im Hypothalamus der *Mc4r*^{W16X} Mäuse bewirkte, dass Sättigungssignale aus der Peripherie in Form des Leptin zentralnervös nicht verarbeitet werden konnten. In Folge dessen nahmen die Mäuse mehr Energie auf als umgesetzt wurde und es entwickelte sich der adipöse Phänotyp der *Mc4r*^{W16X} Mäuse. Dieser manifestierte sich in der pubertären Wachstumsphase, die mit einer massiven Umstellung des gesamten Hormonhaushaltes einhergeht. Zusätzlich bewirkten die erhöhten Leptinspiegel eine vermehrte Ausschüttung von Somatotropin (GH), welches wiederum zu einem vermehrten Längenwachstum führte. Ob erste hormonelle Veränderungen zum initialen Gewichtsanstieg führten wurde nicht untersucht. Interessant wäre eine Analyse des Stresshormons Kortikosteron im zeitlichen Verlauf, da dieses anabole Hormon an der initialen Akkumulation von Fettgewebe beteiligt gewesen sein könnte. Denn Stresssituationen haben einen maßgeblichen Einfluss auf die kurzfristige Regulation der Nahrungsaufnahme, wie die durchgeführten Messungen belegen.

Im Mausmodell *Fto*^{tm1b} konnte dagegen der gegenteilige Effekt beobachtet werden. Unterernährung in der frühen Welpenentwicklung könnte zu einer niedrigeren Leptinausschüttung und zu Wachstumsverzögerung durch Wachstumshormon-Mangel geführt haben. Dies kann nur vermutet werden, da weder die Nahrungsaufnahme noch der Hormonhaushalt der Welpen untersucht wurde. Während des pubertären Wachstumsschubes blieb der kleinwüchsige Phänotyp homozygoter *Fto*^{tm1b} Mäuse durch gleiche Wachstumsraten aller Genotypen bestehen.

In beiden Modellen wurde ein veränderter Energieumsatz vielleicht als kompensatorischer Mechanismus und in Anpassung an bereits manifestierte Phänotypen festgestellt. Hierbei wurden

Anpassungen vor allem im Ruheumsatz beobachtet. Welchen Beitrag hier eine veränderte Körpertemperatur hatte konnte nicht gesagt werden. In beiden Modellen könnte die tagesperiodische Untersuchung mittels Temperatursender wertvolle Hinweise zur Ursache der Variationen im Ruheumsatz liefern.

Die hormonelle Regulation des Energiehaushaltes ist somit ausschlaggebend für eine ausgeglichene Energiebilanz. Unter anderem Leptin und Corticoliberin (CRH) haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Regulation der Nahrungsaufnahme. Leptin, das Sättigungssignal aus der Peripherie reguliert langfristig die Nahrungsaufnahme und in Stesssituationen sorgt CRH über die Freisetzung von Glucocorticoiden für eine kurzfristige Reduktion der Nahrungsaufnahme. Nachgeschaltet folgen Anpassungen im Energieumsatz, die langfristig den Energiehaushalt in der Waage halten. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass vor allem Phasen des hormonellen Umbruchs für die Manifestierung eines körpergewichts-assoziierten Phänotyps kritisch sind.

5 REFERENZEN

Auwerx, J., Avner, P., Baldock, R., Ballabio, A., Balling, R., Barbacid, M., . . . Wurst, W. (2004). The European dimension for the mouse genome mutagenesis program. Nat Genet *36*, 925-927.

Balthasar, N., Dalgaard, L.T., Lee, C.E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., . . . Lowell, B.B. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. Cell *123*, 493-505.

Barsh, G.S. und Schwartz, M.W. (2002). Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. Nat Rev Genet *3*, 589-600.

Begriche, K., Sutton, G.M. und Butler, A.A. (2011). Homeostastic and non-homeostatic functions of melanocortin-3 receptors in the control of energy balance and metabolism. Physiol Behav *104*, 546-554.

Boissel, S., Reish, O., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Sedgwick, B., Yeo, G.S., . . . 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*, 106-111.

Bolze, F., Rink, N., Brumm, H., Kuhn, R., Mocek, S., Schwarz, A.E., . . . Klingenspor, M. (2013). Characterization of the melanocortin-4-receptor nonsense mutation W16X in vitro and in vivo. Pharmacogenomics J *13*, 80-93.

Bouchard, C., Tremblay, A., Despres, J.P., Nadeau, A., Lupien, P.J., Moorjani, S., . . . Kim, S.Y. (1996). Overfeeding in identical twins: 5-year postoverfeeding results. Metabolism *45*, 1042-1050.

Bouchard, C., Tremblay, A., Despres, J.P., Nadeau, A., Lupien, P.J., Theriault, G., . . . Fournier, G. (1990). The response to long-term overfeeding in identical twins. N Engl J Med *322*, 1477-1482.

Butler, A.A., Girardet, C., Mavrikaki, M., Trevaskis, J.L., Macarthur, H., Marks, D.L. und Farr, S.A. (2017). A Life without Hunger: The Ups (and Downs) to Modulating Melanocortin-3 Receptor Signaling. Front Neurosci *11*, 128.

Carro, E., Senaris, R., Considine, R.V., Casanueva, F.F. und Dieguez, C. (1997). Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. Endocrinology *138*, 2203-2206.

Cavaggioni, A. und Mucignat-Caretta, C. (2000). Major urinary proteins, α2U-globulins and aphrodisin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology *1482*, 218-228.

Cecil, J.E., Tavendale, R., Watt, P., Hetherington, M.M. und Palmer, C.N. (2008). An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. N Engl J Med *359*, 2558-2566.

Chambers, J.C., Elliott, P., Zabaneh, D., Zhang, W., Li, Y., Froguel, P., . . . Kooner, J.S. (2008). Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. Nat Genet *40*, 716-718.

Church, C., Lee, S., Bagg, E.A., McTaggart, J.S., Deacon, R., Gerken, T., . . . Cox, R.D. (2009). A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. PLoS Genet *5*, e1000599.

Church, C., Moir, L., McMurray, F., Girard, C., Banks, G.T., Teboul, L., . . . Cox, R.D. (2010). Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. Nat Genet *42*, 1086-1092.

Claussnitzer, M., Dankel, S.N., Kim, K.H., Quon, G., Meuleman, W., Haugen, C., . . . Kellis, M. (2015). FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. N Engl J Med *373*, 895-907.

Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Korner, A., Jacobson, P., . . . Froguel, P. (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. Nat Genet *39*, 724-726.

Dokas, J., Chadt, A., Nolden, T., Himmelbauer, H., Zierath, J.R., Joost, H.G. und Al-Hasani, H. (2013). Conventional knockout of Tbc1d1 in mice impairs insulin- and AICAR-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. Endocrinology *154*, 3502-3514.

Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., . . . Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. Nature *485*, 201-206.

Elvert, R., Wille, A., Wandschneider, J., Werner, U., Glombik, H. und Herling, A.W. (2013). Energy loss via urine and faeces--a combustive analysis in diabetic rats and the impact of antidiabetic treatment on body weight. Diabetes Obes Metab *15*, 324-334.

Ennaceur, A. (2014). Tests of unconditioned anxiety - pitfalls and disappointments. Physiol Behav *135*, 55-71.

Even, P.C. und Nadkarni, N.A. (2012). Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *303*, R459-476.

Fan, W., Dinulescu, D.M., Butler, A.A., Zhou, J., Marks, D.L. und Cone, R.D. (2000). The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. Endocrinology *141*, 3072-3079.

Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Yeo, G.S., Lank, E.J., Cheetham, T. und O'Rahilly, S. (2003). Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. N Engl J Med *348*, 1085-1095.

Farooqi, I.S. und O'Rahilly, S. (2008). Mutations in ligands and receptors of the leptin-melanocortin pathway that lead to obesity. Nat Clin Pract Endocrinol Metab *4*, 569-577.

Farooqi, I.S., Wangensteen, T., Collins, S., Kimber, W., Matarese, G., Keogh, J.M., . . . O'Rahilly, S. (2007). Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. N Engl J Med *356*, 237-247.

Farooqi, I.S., Yeo, G.S., Keogh, J.M., Aminian, S., Jebb, S.A., Butler, G., . . . O'Rahilly, S. (2000). Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. J Clin Invest *106*, 271-279.

Ferrannini, E. (1988). The theoretical bases of indirect calorimetry: A review. Metabolism *37*, 287-301.

Finucane, M.M., Stevens, G.A., Cowan, M.J., Danaei, G., Lin, J.K., Paciorek, C.J., . . . Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating, G. (2011). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. Lancet *377*, 557-567.

Fischer, J., Koch, L., Emmerling, C., Vierkotten, J., Peters, T., Bruning, J.C. und Ruther, U. (2009). Inactivation of the Fto gene protects from obesity. Nature *458*, 894-898.

Florini, J.R., Ewton, D.Z. und Coolican, S.A. (1996). Growth Hormone and the Insulin-Like Growth Factor System in Myogenesis*. Endocr Rev *17*, 481-517.

Florini, J.R., Ewton, D.Z. und Roof, S.L. (1991). Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. Mol Endocrinol *5*, 718-724.

Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., . . . 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*, 889-894.

Froguel, P. und Blakemore, A.I. (2008). The power of the extreme in elucidating obesity. N Engl J Med *359*, 891-893.

Fu, J., Teucher, M., Anastassiadis, K., Skarnes, W. und Stewart, A.F. (2010). Chapter Eight - A Recombineering Pipeline to Make Conditional Targeting Constructs. In Methods Enzymol, M.W. Paul, and M.S. Philippe, eds. (Academic Press), pp. 125-144.

Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Adler, T., Pimentel, J.A., Becker, L., Bolle, I., . . . Hrabe de Angelis, M. (2009). The German Mouse Clinic: a platform for systemic phenotype analysis of mouse models. Curr Pharm Biotechnol *10*, 236-243.

Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Adler, T., Pimentel, J.A.A., Amarie, O.V., Becker, L., . . . Hrabe de Angelis, M. (2014). German Mouse Clinic - Report for Mc4r (Helmholtz Zentrum München).

Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Becker, L., Bolle, I., Brielmeier, M., Calzada-Wack, J., . . . de Angelis, M.H. (2005). Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. Nat Methods *2*, 403-404.

Gangrade, B.K. und Dominic, C.J. (1983). Oestrus induction in unisexually grouped mice by multiple short-term exposures to males. Experientia *39*, 431-432.

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

Geller, F., Reichwald, K., Dempfle, A., Illig, T., Vollmert, C., Herpertz, S., . . . Hebebrand, J. (2004). Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. Am J Hum Genet *74*, 572-581.

Gerken, T., Girard, C.A., Tung, Y.C., Webby, C.J., Saudek, V., Hewitson, K.S., . . . Schofield, C.J. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. Science *318*, 1469-1472.

Hampton, A.L., Hish, G.A., Aslam, M.N., Rothman, E.D., Bergin, I.L., Patterson, K.A., . . . Rush, H.G. (2012). Progression of Ulcerative Dermatitis Lesions in C57BL/6Crl Mice and the Development of a Scoring System for Dermatitis Lesions. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS *51*, 586-593.

Hawkes, C.P. und Grimberg, A. (2015). Insulin-Like Growth Factor-I is a Marker for the Nutritional State. Pediatric endocrinology reviews : PER *13*, 499-511.

Heinrichs, S.C. und Richard, D. (1999). The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. Neuropeptides *33*, 350-359.

Hess, M.E., Hess, S., Meyer, K.D., Verhagen, L.A., Koch, L., Bronneke, H.S., . . . Bruning, J.C. (2013). The fat mass and obesity associated gene (Fto) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. Nat Neurosci *16*, 1042-1048.

Hill, J.W., Elias, C.F., Fukuda, M., Williams, K.W., Berglund, E.D., Holland, W.L., . . . Elmquist, J.K. (2010). Direct Insulin and Leptin Action in Pro-opiomelanocortin Neurons is Required for Normal Glucose Homeostasis and Fertility. Cell Metab *11*, 286-297.

Hinney, A., Volckmar, A.L. und Knoll, N. (2013). Melanocortin-4 receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. Prog Mol Biol Transl Sci *114*, 147-191.

Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., . . . Lee, F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. Cell *88*, 131-141.

Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., . . . He, C. (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. Nat Chem Biol *7*, 885-887.

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

Jung, R.T. (1997). Obesity as a disease. Br Med Bull *53*, 307-321.

Kistler, M., Muntean, A., Szymczak, W., Rink, N., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., . . . Rozman, J. (2016). Diet-induced and mono-genetic obesity alter volatile organic compound signature in mice. J Breath Res *10*, 016009.

Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G. und Gruters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. Nat Genet *19*, 155-157.

Li, L., Zang, L., Zhang, F., Chen, J., Shen, H., Shu, L., . . . Li, X. (2017). Fat mass and obesity-associated (FTO) protein regulates adult neurogenesis. Hum Mol Genet.

Liu, J.-L., Yakar, S. und LeRoith, D. (2000). Conditional Knockout of Mouse Insulin-Like Growth Factor-1 Gene Using the Cre/loxP System. Proc Soc Exp Biol Med *223*, 344-351.

Locke, A.E., Kahali, B., Berndt, S.I., Justice, A.E., Pers, T.H., Day, F.R., . . . Speliotes, E.K. (2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. Nature *518*, 197-206.

Loos, R.J., Lindgren, C.M., Li, S., Wheeler, E., Zhao, J.H., Prokopenko, I., . . . Mohlke, K.L. (2008). Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. Nat Genet *40*, 768-775.

Lu, X.-Y., Barsh, G.S., Akil, H. und Watson, S.J. (2003). Interaction between α-Melanocyte-Stimulating Hormone and Corticotropin-Releasing Hormone in the Regulation of Feeding and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Responses. The Journal of Neuroscience *23*, 7863-7872.

Lupu, F., Terwilliger, J.D., Lee, K., Segre, G.V. und Efstratiadis, A. (2001). Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. Dev Biol *229*, 141-162.

Ma, W., Miao, Z. und Novotny, M.V. (1998). Role of the Adrenal Gland and Adrenal-Mediated Chemosignals in Suppression of Estrus in the House Mouse: The Lee-Boot Effect Revisited1. Biol Reprod *59*, 1317-1320.

Maes, H.H.M., Neale, M.C. und Eaves, L.J. (1997). Genetic and Environmental Factors in Relative Body Weight and Human Adiposity. Behav Genet *27*, 325-351.

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

Marti, A., Corbalan, M.S., Forga, L., Martinez, J.A., Hinney, A. und Hebebrand, J. (2003). A novel nonsense mutation in the melanocortin-4 receptor associated with obesity in a Spanish population. Int J Obes Relat Metab Disord *27*, 385-388.

Matheny, J.R.W. und Nindl, B.C. (2011). Loss of IGF-IEa or IGF-IEb Impairs Myogenic Differentiation. Endocrinology *152*, 1923-1934.

McMurray, F., Church, C.D., Larder, R., Nicholson, G., Wells, S., Teboul, L., . . . Cox, R.D. (2013). Adult onset global loss of the fto gene alters body composition and metabolism in the mouse. PLoS Genet *9*, e1003166.

Meyer, C.W., Klingenspor, M., Rozman, J. und Heldmaier, G. (2004). Gene or size: metabolic rate and body temperature in obese growth hormone-deficient dwarf mice. Obes Res *12*, 1509-1518.

Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C.E. und Jaffrey, S.R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. Cell *149*, 1635-1646.

Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., . . . O'Rahilly, S. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature *387*, 903-908.

Morton, G.J., Meek, T.H. und Schwartz, M.W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. Nat Rev Neurosci *15*, 367-378.

Peters, T., Ausmeier, K., Dildrop, R. und Ruther, 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*, 186-188.

Peters, T., Ausmeier, K. und Ruther, U. (1999). Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. Mamm Genome *10*, 983-986.

Philippou, A., Maridaki, M., Pneumaticos, S. und Koutsilieris, M. (2014). The Complexity of the IGF1 Gene Splicing, Posttranslational Modification and Bioactivity. Mol Med *20*, 202-214.

Rediger, A., Piechowski, C.L., Habegger, K., Grüters, A., Krude, H., Tschöp, M.H., . . . Biebermann, H. (2012). MC4R Dimerization in the Paraventricular Nucleus and GHSR/MC3R Heterodimerization in the Arcuate Nucleus: Is There Relevance for Body Weight Regulation? Neuroendocrinology *95*, 277-288.

Reed, G.W. und Hill, J.O. (1996). Measuring the thermic effect of food. Am J Clin Nutr *63*, 164-169.

Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B.A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., . . . Glass, D.J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. Nat Cell Biol *3*, 1009-1013.

Ronkainen, J., Huusko, T.J., Soininen, R., Mondini, E., Cinti, F., Makela, K.A., . . . Salonurmi, T. (2015). Fat mass- and obesity-associated gene Fto affects the dietary response in mouse white adipose tissue. Sci Rep *5*, 9233.

Ronkainen, J., Mondini, E., Cinti, F., Cinti, S., Sebert, S., Savolainen, M.J. und Salonurmi, T. (2016). Fto-Deficiency Affects the Gene and MicroRNA Expression Involved in Brown Adipogenesis and Browning of White Adipose Tissue in Mice. Int J Mol Sci *17*.

Saeed, S., Bonnefond, A., Manzoor, J., Shabir, F., Ayesha, H., Philippe, J., . . . Froguel, P. (2015). Genetic variants in LEP, LEPR, and MC4R explain 30% of severe obesity in children from a consanguineous population. Obesity (Silver Spring) *23*, 1687-1695.

Schnutgen, F. (2006). Generation of multipurpose alleles for the functional analysis of the mouse genome. Brief Funct Genomic Proteomic *5*, 15-18.

Schutz, Y. (1997). On problems of calculating energy expenditure and substrate utilization from respiratory exchange data. Z Ernahrungswiss *36*, 255-262.

Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W.M., Uda, M., Albai, G., Strait, J., . . . 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.

Skarnes, W.C., Rosen, B., West, A.P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., . . . Bradley, A. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. Nature *474*, 337-342.

Sobczyk-Kopciol, A., Broda, G., Wojnar, M., Kurjata, P., Jakubczyk, A., Klimkiewicz, A. und Ploski, R. (2011). Inverse association of the obesity predisposing FTO rs9939609 genotype with alcohol consumption and risk for alcohol dependence. Addiction *106*, 739-748.

Speliotes, E.K., Willer, C.J., Berndt, S.I., Monda, K.L., Thorleifsson, G., Jackson, A.U., . . . van Ommen, G.J. (2010). Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. NatGenet *42*, 937-948.

Ste Marie, L., Miura, G.I., Marsh, D.J., Yagaloff, K. und Palmiter, R.D. (2000). A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 12339-12344.

Street, J.C., Butcher, J.E. und Harris, L.E. (1964). Estimating Urine Energy from Urine Nitrogen. J Anim Sci *23*, 1039-1041.

Szymczak, A.L., Workman, C.J., Wang, Y., Vignali, K.M., Dilioglou, S., Vanin, E.F. und Vignali, D.A.A. (2004). Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. Nat Biotech *22*, 589-594.

Tan, H.Y., Steyn, F.J., Huang, L., Cowley, M., Veldhuis, J.D. und Chen, C. (2016). Hyperphagia in male melanocortin 4 receptor deficient mice promotes growth independently of growth hormone. The Journal of Physiology *594*, 7309-7326.

Tao, Y.X. (2010). The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. Endocr Rev *31*, 506-543.

Testa, G., Schaft, J., van der Hoeven, F., Glaser, S., Anastassiadis, K., Zhang, Y., . . . Stewart, A.F. (2004). A reliable lacZ expression reporter cassette for multipurpose, knockout-first alleles. Genesis *38*, 151-158.

Thomas, L.W. (1962). The chemical composition of adipose tissue of man and mice. Q J Exp Physiol Cogn Med Sci *47*, 179-188.

Tung, Y.C., Ayuso, E., Shan, X., Bosch, F., O'Rahilly, S., Coll, A.P. und Yeo, G.S. (2010). Hypothalamic-specific manipulation of Fto, the ortholog of the human obesity gene FTO, affects food intake in rats. PLoSONE *5*, e8771.

Wang, X., Huang, N., Yang, M., Wei, D., Tai, H., Han, X., . . . Xiao, H. (2017). FTO is required for myogenesis by positively regulating mTOR-PGC-1alpha pathway-mediated mitochondria biogenesis. Cell Death Dis *8*, e2702.

Wardle, J., Carnell, S., Haworth, C.M. und Plomin, R. (2008). Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. Am J Clin Nutr *87*, 398-404.

Willer, C.J., Speliotes, E.K., Loos, R.J., Li, S., Lindgren, C.M., Heid, I.M., . . . Genetic Investigation of, A.T.C. (2009). Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. Nat Genet *41*, 25-34.

Wishnofsky, M. (1958). Caloric equivalents of gained or lost weight. Am J Clin Nutr *6*, 542-546.

Yeo, G.S., Farooqi, I.S., Aminian, S., Halsall, D.J., Stanhope, R.G. und O'Rahilly, S. (1998). A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. Nat Genet *20*, 111-112.

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

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die mich auf meinem langen Weg hin zum Abschluss dieser Arbeit begleitet haben. Ganz besonders bei denen die bis zum Schluss an mich geglaubt und mich unterstützt haben, sowohl mit netten, ermunternden, aber auch mit ehrlichen, vorantreibenden Worten.

Zu aller erst gilt mein Dank natürlich Martin, der mir die Möglichkeit gegeben hat im Rahmen des NGFN^{plus} Projektes diese Arbeit durchzuführen. Ich danke dir für dein Vertrauen, deine Unterstützung, die konstruktiven Vorschläge und Ideen mit denen diese Arbeit vorangetrieben wurde. Aber auch die Freiheit die du mir gelassen hast meinen Weg zu finden. Außerdem danke ich dir dafür, dass ich Teil des Teams sein durfte als die Tierhaltung und das metabolische Labor noch in den Kinderschuhen steckte und dadurch Erfahrungen weit über den normalen Laboralltag hinaus sammeln konnte.

Danken möchte ich auch Florian, der mir in all den Jahren im Büro den Rücken gestärkt hat und bei Fragen und Problemen immer durch anregende Diskussionen und Hilfe zu deren Lösung beigetragen hat. Aber auch für die Motivationsschübe und Denkanstöße die er mir gegeben hat bin ich dankbar und mit deren Hilfe wir den Starnberger See durchquert haben. Das Gleiche gilt für Stefanie und Tobias, die mir ebenfalls immer mit Rat, Tat und konstruktiver Kritik zur Seite standen und zuletzt auch durch ihre Korrekturvorschläge diese Arbeit vorangetrieben haben. In gleicher Weise möchte ich Kirsten danken, die mir in all den Jahren räumlicher Trennung immer eine gute Freundin geblieben ist und mir ebenfalls immer mit einem guten Rat und bei der Korrektur dieser Arbeit zur Seite stand.

Sabine, Anika und Julia, danke ich dafür, dass sie mir eine riesige Last von den Schultern genommen haben und mich bei der Genotypisierung der Mäuse und anderen Laborarbeiten unterstützt haben und darüber hinaus immer ein offenes Ohr für mich hatten. Unseren Azubis Caroline und Philip, Christina, Sabrina und allen anderen lieben Kollegen aus der Arbeitsgruppe oder dem Tierhaus mit denen ich die vergangenen Jahre zusammenarbeiten durfte danke ich für all die anregenden Gespräche, ihre Hilfe, ihr Vertrauen und die wunderbare Arbeitsatmosphäre. Auch für die daraus gewachsenen neuen Freundschaften bin ich dankbar und hoffe dass der Kontakt trotz räumlicher Trennung nicht abreißt.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung, im Besonderen meiner Schwester die mir mehr als nur einmal „Schreibasyl mit Vollverpflegung“ gewährt hat sowie meinen Eltern für ihr Vertrauen. Mein größter Dank gilt Björn, dafür dass er mir immer den Rücken freigehalten und Freiräume geschaffen hat sowie meinen beiden Jungs für ihre Geduld und Tapferkeit in den letzten Wochen, in denen sie oft auf ihre Mama verzichten mussten