

# **Identifikation und Charakterisierung von Suszeptibilitätsloci für Adipositas und Hypercholesterinämie in der NZO-Maus**

Von der Medizinischen Fakultät der  
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Kirsten Giesen  
aus Aachen

Berichter: Herr Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dr. med. H.-G. Joost  
Herr Universitätsprofessor Dr. med. vet. W. Küpper  
in der mündlichen Prüfung vertreten durch:  
Herrn Universitätsprofessor Dr. med. dent. F. Lampert

Tag der mündlichen Prüfung: 7. September 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.



# INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|            |                                                                                                                    |           |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>                                                                                            | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Definition von Adipositas und metabolischem Syndrom .....</b>                                                   | <b>1</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Epidemiologie von Übergewicht und Adipositas .....</b>                                                          | <b>2</b>  |
| <b>1.3</b> | <b>Einflüsse von genetischen und exogenen Faktoren.....</b>                                                        | <b>3</b>  |
| 1.3.1      | <i>Monogene Adipositas .....</i>                                                                                   | <i>4</i>  |
| 1.3.2      | <i>Polygene Adipositas .....</i>                                                                                   | <i>6</i>  |
| <b>1.4</b> | <b>Tiermodelle zur Untersuchung komplexer Syndrome .....</b>                                                       | <b>6</b>  |
| <b>1.5</b> | <b>Etablierung eines neuen Mausmodells zur Untersuchung des metabolischen Syndroms.....</b>                        | <b>7</b>  |
| 1.5.1      | <i>NZO-Maus .....</i>                                                                                              | <i>8</i>  |
| 1.5.2      | <i>SJL-Maus .....</i>                                                                                              | <i>9</i>  |
| <b>1.6</b> | <b>Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....</b>                                                                   | <b>10</b> |
| <b>2</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>                                                                                 | <b>11</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Beschreibung des Tiermodells.....</b>                                                                           | <b>11</b> |
| 2.1.1      | <i>Rückkreuzungsmodell .....</i>                                                                                   | <i>11</i> |
| 2.1.2      | <i>Haltungs- und Zuchtbedingungen .....</i>                                                                        | <i>11</i> |
| 2.1.3      | <i>Tötung.....</i>                                                                                                 | <i>12</i> |
| <b>2.2</b> | <b>Phänotypische Charakterisierung der Versuchstiere .....</b>                                                     | <b>13</b> |
| 2.2.1      | <i>Bestimmung der Körpermaße.....</i>                                                                              | <i>13</i> |
| 2.2.2      | <i>Messung des Körperfettgehaltes .....</i>                                                                        | <i>13</i> |
| 2.2.3      | <i>Bestimmung verschiedener Blut-, Plasma- und Serum-Parameter .....</i>                                           | <i>14</i> |
| 2.2.3.1    | <i>Blut-Glucose.....</i>                                                                                           | <i>14</i> |
| 2.2.3.2    | <i>Plasma-Glucose und -Fette.....</i>                                                                              | <i>14</i> |
| 2.2.3.3    | <i>Plasma- und Serum-Insulinbestimmung.....</i>                                                                    | <i>14</i> |
| <b>2.3</b> | <b>Genotypische Charakterisierung der Versuchstiere .....</b>                                                      | <b>15</b> |
| 2.3.1      | <i>DNA-Isolation .....</i>                                                                                         | <i>15</i> |
| 2.3.2      | <i>DNA-Messung und -Verdünnung .....</i>                                                                           | <i>16</i> |
| 2.3.3      | <i>Genotypisierung mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern.....</i>                                                   | <i>16</i> |
| 2.3.3.1    | <i>Amplifizierung der Mikrosatellitenmarker.....</i>                                                               | <i>17</i> |
| 2.3.3.2    | <i>Gelelektrophorese der allelspezifischen PCR-Produkte .....</i>                                                  | <i>18</i> |
| 2.3.4      | <i>Genotypisierung des Leptinrezeptorlocus (Lepr) mit Restriktions-Fraktions-Längen-Polymorphismen (RFLP).....</i> | <i>19</i> |
| 2.3.4.1    | <i>Amplifizierung des Leptinrezeptorlocus mittels PCR .....</i>                                                    | <i>19</i> |

|            |                                                                                                                                        |           |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.4.2    | Restriktionsverdau der <i>LepR</i> -Amplifikationsprodukte .....                                                                       | 20        |
| 2.3.4.3    | Elektrophorese der RFLP-Produkte .....                                                                                                 | 20        |
| <b>2.4</b> | <b>Statistische Analyse der Daten .....</b>                                                                                            | <b>21</b> |
| 2.4.1      | Signifikanz- und Varianzanalysen .....                                                                                                 | 21        |
| 2.4.2      | Analyse mit Mapmaker/EXP und Mapmaker/QTL .....                                                                                        | 22        |
| <b>3</b>   | <b>ERGEBNISSE .....</b>                                                                                                                | <b>23</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Phänotypische Charakterisierung der verschiedenen Populationen .....</b>                                                            | <b>23</b> |
| 3.1.1      | Parental- und F1-Generation .....                                                                                                      | 23        |
| 3.1.2      | Rückkreuzungspopulationen .....                                                                                                        | 26        |
| <b>3.2</b> | <b>Auswahl des Kollektives für die genomweite Suche .....</b>                                                                          | <b>27</b> |
| 3.2.1      | Genomweite Suche .....                                                                                                                 | 28        |
| <b>3.3</b> | <b>Identifizierung und Charakterisierung des Adipositas-Suszeptibilitätslocus <i>Nob1</i> auf dem proximalen Chromosom 5 .....</b>     | <b>29</b> |
| 3.3.1      | Identifizierung von <i>Nob1</i> .....                                                                                                  | 29        |
| 3.3.2      | Einfluss der Diät auf die Effekte von <i>Nob1</i> .....                                                                                | 32        |
| 3.3.3      | Interaktion von <i>Nob1</i> mit der Leptinrezeptorvariante <i>Lepr</i> <sup>NZO</sup> .....                                            | 33        |
| 3.3.4      | Interaktion von <i>Nob1</i> mit <i>Nidd/SJL</i> .....                                                                                  | 35        |
| <b>3.4</b> | <b>Identifizierung eines Suszeptibilitätslocus für Hypercholesterinämie (<i>Chol1/NZO</i>) auf dem distalen Chromosom 5 .....</b>      | <b>38</b> |
| <b>3.5</b> | <b>Identifizierung von kleineren Suszeptibilitätsloci für Adipositas und Dyslipidämie .....</b>                                        | <b>40</b> |
| <b>4</b>   | <b>DISKUSSION .....</b>                                                                                                                | <b>42</b> |
| <b>4.1</b> | <b><i>Nob1</i>, ein Suszeptibilitätslocus für Adipositas und Hyperinsulinämie .....</b>                                                | <b>42</b> |
| 4.1.1      | Einfluss der Diät und der maternalen Umgebung auf <i>Nob1</i> .....                                                                    | 42        |
| 4.1.2      | Interaktion von <i>Nob1</i> mit <i>Lepr</i> <sup>NZO</sup> und <i>Nidd/SJL</i> .....                                                   | 43        |
| 4.1.3      | <i>Nob1</i> und weitere in der Literatur beschriebene Suszeptibilitätsloci für Adipositas auf dem Mauschromosom 5 .....                | 44        |
| 4.1.4      | Bedeutung von <i>Nob1</i> für die Körpergewichtsregulation bei verschiedenen Mausstämmen .....                                         | 45        |
| 4.1.5      | Kandidatengene für <i>Nob1</i> .....                                                                                                   | 46        |
| <b>4.2</b> | <b><i>Chol1/NZO</i>, ein Suszeptibilitätslocus für Hypercholesterinämie .....</b>                                                      | <b>46</b> |
| 4.2.1      | <i>Chol1/NZO</i> und weitere in der Literatur beschriebene Suszeptibilitätsloci für Hypercholesterinämie auf dem Mauschromosom 5 ..... | 46        |
| 4.2.2      | Kandidatengene für <i>Chol1/NZO</i> .....                                                                                              | 47        |
| <b>4.3</b> | <b>Ausblick .....</b>                                                                                                                  | <b>48</b> |
| <b>5</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                                                                                           | <b>49</b> |

|          |                       |           |
|----------|-----------------------|-----------|
| <b>6</b> | <b>ABSTRACT .....</b> | <b>50</b> |
|----------|-----------------------|-----------|

|          |                                   |           |
|----------|-----------------------------------|-----------|
| <b>7</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b> | <b>51</b> |
|----------|-----------------------------------|-----------|

**ANHANG**

**DANKSAGUNG**

**LEBENS LAUF**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                          |                                                            |
|--------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>AFF</b>               | absolute Fettmenge im Frischgewicht                        |
| <b>ALF</b>               | absolute magere Körpermasse im Frischgewicht               |
| <b>APS</b>               | Ammoniumpersulfat                                          |
| <b>BCSJL</b>             | SJL-Rückkreuzungen                                         |
| <b>BG 10/12/15/17/22</b> | Blutglucose in der 10./12./15./17./22. Woche               |
| <b>Bis</b>               | N,N'-Methylenbisacrylamid                                  |
| <b>BMI</b>               | <i>Body Mass Index</i>                                     |
| <b>bp</b>                | Basenpaare                                                 |
| <b>Bpl</b>               | Basenpaarleiter                                            |
| <b>C57BL6/J</b>          | C57 <i>Black</i> 6 Jackson-Mausstamm                       |
| <b>Chol</b>              | Plasma-Cholesterin                                         |
| <b>cM</b>                | centi-Morgan                                               |
| <b>cpm</b>               | <i>counts per minute</i> , Zähler pro Minute               |
| <b>ddH<sub>2</sub>O</b>  | <i>aqua bidestillata</i>                                   |
| <b>DNA</b>               | Desoxyribonucleinsäure                                     |
| <b>dNTPs</b>             | 2'-Desoxynucleotid-5'-Triphosphat                          |
| <b>DP</b>                | Diabetes-Prävalenz                                         |
| <b>EC50</b>              | halbmaximale Bindungsaktivität                             |
| <b>EDTA</b>              | Ethylendiaminetetraessigsäure                              |
| <b>EST</b>               | <i>expressed sequence tag</i>                              |
| <b>EtBr</b>              | Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-             |
| <b>F(1)</b>              | (1.) Filialgeneration, (1.) Tochtergeneration              |
| <b>FD</b>                | fettreiche Diät                                            |
| <b>for</b>               | <i>forward</i> , vorwärts                                  |
| <b>g</b>                 | Erdbeschleunigung                                          |
| <b>GWS</b>               | <i>Genome Wide Scan</i> , genomweite Suche                 |
| <b>HDL</b>               | <i>High Density Lipoprotein</i>                            |
| <b>IRI 10/22</b>         | <i>immuno reactive insulin</i> , immunreaktives Insulin im |
| <b>ISK</b>               | Insulinsekretion                                           |
| <b>ISN</b>               | Insulinsensibilität                                        |

|                   |                                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>KG 12/22/n</b> | 12-/22-/n-Wochen-Körpergewicht                        |
| <b>KL</b>         | Körperlänge                                           |
| <b>LDL</b>        | <i>Low Density Lipoprotein</i>                        |
| <b>LOD</b>        | <i>Logarithm of the Odds, Likelihood of the Odds</i>  |
| <b>m</b>          | männlich                                              |
| <b>ME</b>         | <i>metabolizing energy</i> , metabolisierbare Energie |
| <b>mM</b>         | millimolar, mmol/l                                    |
| <b>n</b>          | Anzahl                                                |
| <b>NSZO</b>       | NZO x (SJL x NZO)                                     |
| <b>NZB</b>        | <i>New Zealand black</i> -Mausstamm                   |
| <b>NZBR</b>       | <i>New Zealand brown</i> -Mausstamm                   |
| <b>NZO</b>        | <i>New Zealand obese</i> -Mausstamm                   |
| <b>Orange G</b>   | 7-Hydroxy-8-phenylazo1,3-naphtthalendisulfonsäure     |
| <b>PBS</b>        | <i>Phosphate Buffered Saline</i>                      |
| <b>PFF</b>        | Prozentgehalt im Frischgewicht                        |
| <b>PG</b>         | Plasma-Glucose                                        |
| <b>Phenolrot</b>  | Phenolsulfonphtalein                                  |
| <b>QTL</b>        | <i>Quantitative Trait Locus</i>                       |
| <b>rev</b>        | <i>reverse</i> , rückwärts                            |
| <b>RFLP</b>       | Restriktions-Fraktions-Längen-Polymorphismus          |
| <b>RNA</b>        | Ribonucleinsäure                                      |
| <b>RT</b>         | Raumtemperatur                                        |
| <b>SD</b>         | Standard-Diät                                         |
| <b>SJL</b>        | <i>Swiss Jim Lambert</i> -Mausstamm                   |
| <b>SM</b>         | <i>Small mouse</i> -Mausstamm                         |
| <b>SZNZ</b>       | (SJL x NZO) x NZO                                     |
| <b>SZO</b>        | SJLx NZO                                              |
| <b>TBE</b>        | Tetra-Borat-EDTA                                      |
| <b>TEMED</b>      | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                    |
| <b>TG</b>         | Plasma-Triglyceride                                   |
| <b>Tris</b>       | Tris(hydroxymethyl-)aminomethan                       |
| <b>U</b>          | <i>unit</i> , Einheit                                 |

|            |                                                |
|------------|------------------------------------------------|
| <b>v/v</b> | <i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen |
| <b>vs.</b> | <i>versus</i> , gegen (verglichen mit)         |
| <b>w</b>   | weiblich                                       |
| <b>w/v</b> | <i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen |
| <b>ZOS</b> | NZO x SJL                                      |



## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Definition von Adipositas und metabolischem Syndrom

Adipositas ist definiert als eine Vermehrung des Körpergewichtes mit übermäßiger Zunahme des Körperfettanteils. Als Maß für Adipositas und Übergewicht kann neben der Messung des absoluten Körpergewichtes, auch eine Bestimmung des Bauchumfanges, der Dicke von Hautfalten und der Bioimpedanz erfolgen. Ein Index, der Körpergewicht und Größe kombiniert (*Body Mass Index*, BMI) wird berechnet als  $BMI = \text{Körpergewicht [kg]} / \text{Quadrat der Körperlänge [m}^2\text{]}$ . Angenommen wird dabei, dass Unterschiede des Körpergewichtes bei Personen gleicher Größe durch eine Zunahme des Fettanteiles bedingt sind. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat ein Schema zur Klassifikation von Übergewicht und Adipositas vorgeschlagen, welches unabhängig vom Geschlecht für Personen aller Altersklassen anwendbar ist. Ab einem BMI  $\geq 30$  spricht man von Adipositas. (s. Tab. 1.1).

**Tab. 1.1 WHO–Schema zur Klassifikation von Übergewicht und Adipositas.**

| BMI         | WHO Klassifikation |
|-------------|--------------------|
| < 18.5      | Untergewicht       |
| 18.5 – 24.9 | Normalgewicht      |
| 25.0 – 29.9 | Übergewicht        |
| 30.0 – 34.9 | Adipositas Grad 1  |
| 35.0 – 39.9 | Adipositas Grad 2  |
| $\geq 40$   | extreme Adipositas |

Nach der Definition des *National Cholesterol Education Program* (NCEP) müssen zur Diagnosestellung eines metabolischen Syndroms mindestens drei der folgenden Kriterien erfüllt sein (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. JAMA, 2001): Taillenumfang: Männer >102 cm, Frauen >88 cm; Triglyceride:  $\geq 150$  mg/dl; HDL-Cholesterin: Männer <40 mg/dl, Frauen <50 mg/dl; Blutdruck:  $\geq 130/85$  mmHg; Nüchtern-Blutglucose:  $\geq 110$  mg/dl. Die WHO fordert neben einer Hyperinsulinämie wenigstens zwei der folgenden Kriterien: abdominelle Adipositas (Verhältnis Taille zu Hüfte

>0.9 oder Taillenumfang  $\geq 94$  cm), Dyslipidämie (Triglyceride  $\geq 150$  mg/dl, HDL-Cholesterin <35 mg/dl) oder einen arteriellen Hypertonus ( $\geq 140/90$  mmHg).

## 1.2 Epidemiologie von Übergewicht und Adipositas

Die wachsende Prävalenz von Adipositas und Typ-2-Diabetes mellitus in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) und anderen Industrieländern hat die Aufmerksamkeit von Medizinern, Wissenschaftlern und Politikern erregt. So sind in den USA zwei Drittel der Bevölkerung übergewichtig und mehr als 30% adipös (Bonow und Eckel, 2003). Auch in Europa nimmt die Zahl der an Adipositas erkrankten Personen zu (Visscher *et al.*, 2002). In Deutschland leiden bereits bis zu 8% der 13- bis 15-Jährigen an einer Fettsucht (Wabitsch *et al.*, 2002). Die WHO (*World Health Organization*) schätzt, dass bis 2020 zwei Drittel der weltweiten Krankheiten durch chronische, nicht übertragbare Erkrankungen hervorgerufen sein werden, von denen die meisten durch die Ernährung beeinflussbar sind (Chopra *et al.*, 2002). Übergewicht und Adipositas sind bedeutende Risikofaktoren für die Gesundheit. So geht Adipositas mit einer hohen Begleit- und Folgemorbidität und einer erhöhten Gesamtmortalität einher (Seidell *et al.*, 1996; Calle *et al.*, 1999). Adipositas ist assoziiert mit Erkrankungen wie Typ-2-Diabetes mellitus, koronarer Herzerkrankung, arterieller Hypertonie, Schlafapnoesyndrom, sowie bestimmten Karzinomen (Must *et al.*, 1999; Kopelman, 2000).

Eine besondere Bedeutung kommt der Adipositas in einem komplexen Krankheitsbild, das als metabolisches Syndrom zusammengefasst wird, zu. Neben der Adipositas zeichnet sich dieses Syndrom durch weitere Störungen des Stoffwechsels, einschließlich einer Insulinresistenz, einem arteriellen Hypertonus und einer Dyslipidämie, aus (Reaven *et al.*, 1995). Die Dyslipidämie setzt sich aus einem atherogenen Lipoproteinprofil zusammen, das eine Hypertriglyceridämie, erhöhte Apolipoprotein B und LDL (*Low Density Lipoprotein*)-Spiegel und eine erniedrigte Konzentration von HDL (*High Density Lipoprotein*)-Partikeln beinhaltet. In den USA wird die für das Lebensalter korrigierte Prävalenz des metabolischen Syndroms auf 23.7 % und bei den  $\geq 60$ -Jährigen sogar auf 43.5 % geschätzt (Scott, 2003). Die Adipositas ist die zentrale Komponente dieses Syndroms, die eng mit der Insulinresistenz vergesellschaftet ist. Daher werden gemeinsame pathophysiologische Ursachen für die Merkmale dieser komplexen metabolischen Störung vermutet (DeFronzo und Ferranini, 1991;

McFarlane *et al.*, 2001; Boden, 1996). Die Kombination aus abdomineller Adipositas und Insulinresistenz ist ein besonders schwerwiegender Risikofaktor für die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes mellitus und kardiovaskulärer Erkrankungen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es durch Insuffizienz des endokrinen Pankreas häufig zu einer Dekompensation der Blutzuckerkontrolle mit Entwicklung eines manifesten Typ-2-Diabetes mellitus (Kahn *et al.*, 1998). Letztlich ist die Pathogenese dieser komplexen Störung mit den Wechselwirkungen zwischen Adipositas, Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes mellitus immer noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch immer mehr Hinweise, dass der Adipositas eine bedeutende Rolle zukommt. So konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass das Fettgewebe endokrinologische Funktionen erfüllt. Es sind mehrere Proteine (Leptin, Resistin, Adipsin, Adiponectin, Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ) entdeckt worden, die an der Genese der Adipositas und der Insulinresistenz beteiligt sind und die Rolle des Fettgewebes für die Entwicklung des metabolischen Syndroms unterstreichen (Flier, 1995; Jazet *et al.*, 2003; Azuma *et al.*, 2003; Steppan *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 1994; Schwartz *et al.*, 2000). Auch die Vorstellung, dass das gemeinsame Wirken von Adipositas- und Diabetes-Genen zu der Manifestation eines Typ-2-Diabetes mellitus beiträgt, wird durch mehrere Arbeiten unterstützt (Reifsnyder *et al.*, 2002).

Neben den gesundheitlichen Konsequenzen, die sich durch eine Adipositas und deren Begleiterkrankungen für den Einzelnen ergeben, werden immer beachtlichere sozioökonomische Probleme für die Gesundheitssysteme offenkundig. So werden bereits 2-7% der Gesundheitsausgaben in Industrieländern für die Therapie der Adipositas und ihrer Folgen aufgewendet (Seidell *et al.*, 1995). Die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Körpergewichtsregulation und sich daraus ergebende neue Therapiekonzepte sind somit von immer größerer Bedeutung.

### 1.3 Einflüsse von genetischen und exogenen Faktoren

Die Adipositas und das metabolische Syndrom sind komplexe Erscheinungsbilder, die durch das Zusammenwirken von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen bestimmt werden (Comuzzie and Allison, 1998; Echwald, 1999; Pérusse and Bouchard, 1999). Zahlreiche Studien untersuchen das Ausmaß der Erblichkeit der Adipositas beim Menschen (Stunkard *et al.*, 1986 und 1990; Allison *et al.*, 1996; Vogler *et al.*, 1995; Rice *et al.*, 1999).

So ergaben Zwillings- und Familienstudien, dass 40-80% der Varianz des BMI durch genetische Faktoren erklärt werden können (Bouchard, 1995). In einer Zusammenfassung mehrerer Studien wird die Heritabilität ( $h^2$ ) des BMI auf 50-90% geschätzt (Maes *et al.*, 1997). Für die prozentuale Körperfettmasse ergibt sich eine geschätzte Heritabilität von 62-80% (Rice *et al.*, 1997, Sakurai *et al.*, 1997, Faith *et al.*, 1999).

Epidemiologisch zeigt sich eine Assoziation von niedrigem Geburtsgewicht mit der Entwicklung eines metabolischen Syndroms im späteren Leben (Barker *et al.*, 1993). Nach der Barker-Hypothese sind chronische Erkrankungen Langzeitfolgen einer physiologischen Adaptation des Fötus an Mangelernährung während der Schwangerschaft (Barker, 1990; Hales und Barker, 1992). Neben den genetischen und den durch den Lebensstil erworbenen Faktoren wird daher auch eine Programmierung der Mechanismen der Gewichtskontrolle durch die perinatale Ernährung diskutiert.

Der bedeutende Einfluss von sozioökonomischen und demographischen Faktoren auf die phänotypische Ausprägung einer Adipositas erschwert die Aufklärung der zugrundeliegenden genetischen Faktoren (Hill und Peters, 1998).

### 1.3.1 Monogene Adipositas

Die bereits erwähnten Familien- und Zwillingsstudien legen nahe, dass die humane Adipositas eine polygen, d.h. durch mehrere Gene bedingte Erkrankung ist. Die Mendelschen Gesetze sind für polygene Vererbungen nicht gültig. Es gibt jedoch einige Formen der humanen Adipositas, die einen Vererbungsmodus nach den Mendelschen Gesetzen aufweisen. So sind pleiotrope Syndrome bekannt, die mit einer mentalen Retardierung assoziiert sind und eine distinkte Adipositas als Symptom beinhalten (Cohen, Bardet-Biedl, Prader-Willi, Alstrom). Für die meisten dieser nach den Mendelschen Gesetzen segregierenden Syndrome sind die verantwortlichen Chromosomenabschnitte bekannt, in einigen Fällen sind bereits die Gene identifiziert (siehe *Online Mendelian Inheritance in Man*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>). Das gemeinsame Auftreten von mentaler Retardierung und Adipositas bei diesen Syndromen unterstreicht die Bedeutung des zentralen Nervensystems für die Kontrolle der Gewichtsregulation (Echwald, 1999).

Die Identifikation und Charakterisierung von fünf Genen, deren Mutation zu monogenen Adipositassyndromen bei der Maus führen, hat zu neuen Erkenntnissen in der humanen Adipositasforschung beigetragen. Folgende Mutationen konnten identifiziert werden: *Agouti yellow* ( $A^y$ ), *Fat* (*fat*), *Tubby* (*tub*), *Obese* (*ob*) und *Diabetes* (*db*). Besonders interessant sind die *ob*- und die *db*-Mutation, von denen früh vermutet wurde, dass es sich um Mutationen eines zirkulierenden Faktors und des dazugehörigen Rezeptors handelt, heute bekannt als Leptin und hypothalamischer Leptinrezeptor (Coleman *et al.*, 1978). Leptin ist ein vom Fettgewebe exprimiertes Hormon, das eine bedeutende Rolle in der zentralen Regulierung des Energiehaushaltes spielt. Leptin wirkt als afferente Komponente dieses Regelkreises, der eine Serie von neuroendokrinen Effektoren zur Konstanthaltung des Energiegleichgewichtes beinhaltet. Defekte im Leptinregelkreis (Leptin-*ob*, Leptinrezeptor-*db*) führen bei der Maus zu einem Syndrom mit früh einsetzender Adipositas, Hyperphagie, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie. Die neuronalen Signalwege, die durch Leptin angesprochen werden und die metabolischen und verhaltensbiologischen Effekte vermitteln, sind noch nicht vollständig bekannt. Hinweise dazu hat die  $A^y$ -Mutation geliefert, die zu einer ektopen, hypothalamischen Expression des Agouti-Proteins führt, welches als Antagonist an zentralen Melanocortin-Rezeptoren wirkt. Die so hervorgerufene Adipositas wird durch eine Mutante des *Mahogany*-Gens (*mg*) unterdrückt (Miller *et al.*, 1997; Dinulescu *et al.*, 1998). Auf die anderen monogenen Adipositassynndrome (*fat*, *tub*, *db*) der Maus hat die Mahogany-Mutation keinen Einfluss. Die Studien legen nahe, dass *Mahogany* eine große Bedeutung für die Regulation des Melanocortinsystems spielt. Der Effekt wird wahrscheinlich durch eine Beeinflussung der Agouti-Aktivität hervorgerufen. Die Bedeutung des Melanocortin-Systems für die Entwicklung der Adipositas wurde durch Ergebnisse von *Mc4r* (Melanocortin-4 Rezeptor) und *Pomc* (Pro-Opiomelanocortin) knockout-Mäusen bestätigt, die ein der  $A^y$ -Maus ähnliches Adipositassyndrom aufweisen.

Sowohl Leptin- als auch Leptinrezeptormutationen konnten in einzelnen Fällen von humaner Adipositas nachgewiesen werden (Strobel *et al.*, 1998; Montague *et al.*, 1997; Clement *et al.*, 1998). Auch *POMC*- und *MC4R*-Mutationen wurden bei adipösen Patienten identifiziert (Krude *et al.*, 1998; Vaisse *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 1999; Ho und MacKenzie, 1999). Im Gegensatz zu Leptin-, Leptinrezeptor- und *POMC*-Mutationen, zeigen *MC4R*-Mutationen eine deutliche höhere Prävalenz bei humaner Adipositas. So weisen 3-5% der Patienten mit einem BMI >40 Mutationen des *MC4R* auf (Barsh *et al.*, 2000).

Diese Mutationen und die erwähnten pleiotropen Syndrome erklären nur einen kleinen Teil der humanen Adipositas, sie führen jedoch zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie von Adipositas und Übergewicht. Sie können somit helfen, Ziele für eine pharmakologische Therapie der Adipositas zu identifizieren.

### 1.3.2 Polygene Adipositas

Von diesen wenigen monogenen Formen abgesehen, ist für die Adipositas und das metabolische Syndrom ein polygener genetischer Hintergrund anzunehmen. Dabei spielen entweder mehrere „größere“ Gene mit rezessivem Vererbungsmodus oder aber multiple Gene mit kleineren Effekten eine Rolle. Der Verlauf und die Manifestation der Adipositas und des metabolischen Syndroms werden aber wesentlich durch die Lebensbedingungen (Ernährung, körperliche Aktivität) beeinflusst (Collins *et al.*, 1994; Hu, 2003). Mit dem Aufkommen von neuen molekularbiologischen und statistischen Methoden hat auch die Aufklärung der polygen bedingten Adipositas und des metabolischen Syndroms in den letzten Jahren einen Aufschwung erlebt. So können anhand von Kopplungsanalysen Suszeptibilitätsloci für krankmachende Gene ausfindig gemacht werden. Dafür werden die komplexen Syndrome in diskrete Faktoren aufgetrennt (z.B. Körpergewicht, absolute/relative Fettmasse, BMI, Leptin, Insulin, Cholesterin), um dann nach *Quantitative Trait Loci* (QTL) suchen zu können. Als QTL werden Chromosomenbereiche bezeichnet, die einen quantitativen Effekt auf die Ausprägung eines phänotypischen Merkmals haben. Die zu untersuchenden Individuen müssen dazu genotypisch und phänotypisch charakterisiert werden. Mittlerweile gibt es sowohl für die Maus als auch für den Menschen Karten dieser QTL, die immer zuverlässiger und dichter werden (<http://obesitygene.pbrn.edu>; Chagnon *et al.*, 2003; Printz, 2003). Dennoch konnte bislang kein für die Adipositas und das metabolische Syndrom verantwortliches Einzelgen in diesen QTL identifiziert werden. So ist die Identifikation von Adipositas-Genen und vor allem die Untersuchung der Gen-Gen und Gen-Umwelt Interaktionen weiterhin von großem Interesse.

## 1.4 Tiermodelle zur Untersuchung komplexer Syndrome

Viele Probleme, die sich bei der Analyse der humanen Adipositas ergeben, können bei der Untersuchung eines Modellorganismus umgangen werden. So ist es möglich, exogene Einflussfaktoren und den genetischen Hintergrund in einem Tiermodell konstant zu halten.

Mausmodelle sind zur Untersuchung des metabolischen Syndroms besonders geeignet, da es eine Vielzahl von Inzuchtstämmen gibt, die sich hinsichtlich ihres Körpergewichtes und ihrer Stoffwechselfparameter deutlich unterscheiden. Die molekulare Analyse ist durch die Möglichkeit der Untersuchung von großen Tierzahlen, einer kurzen Reproduktionszeit und der leichteren Durchführbarkeit von genotypischen und phänotypischen Charakterisierungen vereinfacht (Brockmann und Bevova, 2002). Neben den Inzuchtstämmen, die Einzelgenmutationen wie *A<sup>y</sup>*, *fat*, *tub*, *ob* und *db*-Mutationen aufweisen, gibt es Mausstämmen, die ein polygen bedingtes, dem menschlichen metabolischen Syndrom ähnliches, komplexes Krankheitsbild entwickeln. Diese Stämme können als Modellorganismen für die Untersuchung der menschlichen Adipositas und des metabolischen Syndroms herangezogen werden. Zu nennen sind u.a. die NZO- (Bielschowsky und Bielschowsky, 1953), KK- (Kondo *et al.*, 1957), PBB/Ld- (Hunt *et al.*, 1978), TSOD-(Hirayama *et al.*, 1999) und TH-Mäuse (Kim *et al.*, 2001).

Zur Untersuchung der genetischen Grundlagen von multifaktoriellen, komplexen Phänotypen wie z.B. Adipositas kreuzt man zwei Inzuchtstämmen, die sich in den wesentlichen phänotypischen Merkmalen unterscheiden. Die genetisch variablen Nachkommen der F2- oder der Rückkreuzungspopulationen werden anhand von ca. 100 Markern, die das gesamte Genom abdecken, genotypisiert und für die relevanten Merkmale phänotypisiert. Mit Hilfe statistischer Verfahren wird der Zusammenhang zwischen den Genotypen und den Phänotypen untersucht. Die so entdeckten QTL haben eine durchschnittliche Größe von >10 cM, was ca. 20-30 Millionen Basenpaaren entspricht. Eine Eingrenzung der krankheitsassoziierten Chromosomenabschnitte ist zur Identifizierung der zugrundeliegenden Gene erforderlich. Hierzu werden kongene Linien etabliert, in denen ein definierter Chromosomenabschnitt durch mehrfache Rückkreuzung in einen Kontrollstamm eingezüchtet wird. Der relevante Abschnitt kann oftmals bis auf wenige cM eingegrenzt werden, so dass eine Isolierung des Krankheitsgens durch Sequenzierung einer kleinen Zahl von Genen, sog. positionelles Klonieren, möglich werden kann.

### **1.5 Etablierung eines neuen Mausmodells zur Untersuchung des metabolischen Syndroms**

Zur Untersuchung der genetischen Grundlagen des metabolischen Syndroms wurde ein neues Kreuzungsmodell der adipösen, hyperinsulinämischen NZO (*New Zealand obese*)-

Maus mit der dünnen SJL (Swiss Jim Lambert)-Maus etabliert. Der NZO-Stamm zeigt ein dem menschlichen metabolischen Syndrom ähnliches, polygenes Krankheitsbild. Es werden daher gemeinsame pathophysiologische Grundlagen für das murine und das humane Syndrom angenommen.

#### 1.5.1 NZO-Maus

Die Inzuchtung der New Zealand Obese (NZO)-Maus wurde 1948 von F. Bielschowsky begonnen. Aus einer gemischten Kolonie zufallsverpaarter Tiere, die 1930 von W.H. Hall aus den *Imperial Cancer Research Fund Laboratories* in London nach Neuseeland in die Otago Medical School gebracht worden waren, wurden Tiere mit gleicher Fellfarbe ingezüchtet. Zusammen mit der NZB (*New Zealand Black*)- und der NZBR (*New Zealand Brown*)-Maus gehört die NZO-Maus zu den NZ-Stämmen, die aus einer agouti-farbenen Subpopulation dieser Kolonie ingezüchtet wurden. Ab der 10. Generation (F10) entwickelten einige der agoutifarbenen Tiere eine Adipositas (Bielschowsky und Goodall, 1970). Diese Tiere wurden ab der 12. Inzuchtgeneration von der Kolonie getrennt verpaart und als NZO-Stamm ingezüchtet. Der nicht-adipöse NZB-Stamm entstand durch Inzuchtung eines Geschwisterpaares mit schwarzer Fellfarbe, das in der 3. Generation (F3) auftrat.

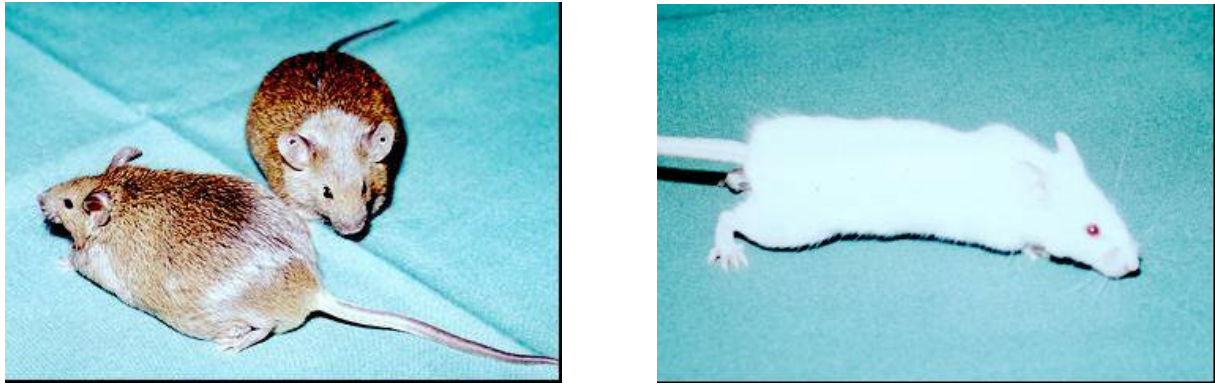
NZO-Mäuse entwickeln eine polygen bedingte Adipositas assoziiert mit Hyperinsulinämie, Insulin-Resistenz und Hyperglykämie (Crofford und Davis, 1965; Herberg und Coleman, 1977; Veroni *et al.*, 1991). Die Adipositas ist größtenteils durch eine Zunahme des abdominellen und retroperitonealen Fettgewebes bedingt. Dabei ist eine Hypertrophie und in geringerem Maße auch eine Hyperplasie der Fettzellen zu beobachten. Die Adipositas der NZO-Maus ist durch die Diät und die tägliche Kalorienzufuhr beeinflussbar (Herberg und Coleman, 1977). Zusätzlich entwickelt die NZO-Maus einen arteriellen Hypertonus und erhöhte Plasma-Cholesterin und Triglycerid-Werte (Ortlepp *et al.*, 2000). Erhöhte Konzentrationen des Proteins Leptin konnten im Fettgewebe und im Serum der NZO-Maus nachgewiesen werden (Igel *et al.*, 1997). Die Promotor-Region und die komplementäre DNA des *ob*-Gens der NZO Maus sind identisch mit der Wildtyp-Sequenz. Die Hyperleptinämie der NZO-Maus scheint daher Ausdruck einer Leptin-Resistenz zu sein; intraperitoneal appliziertes exogenes Leptin war dementsprechend in NZO-Mäusen geringer wirksam als in Kontrollen (C57BL6 und *ob/ob*; Igel *et al.*, 1997).



Die Sequenz des Leptinrezeptors (Lepr) der NZO-Maus weist im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor (BLKS/J<sup>+/+</sup>) vier Mutationen auf, von denen zwei nicht-konservativ sind (Igel *et al.*, 1997). Die Aminosäure-Austausche befinden sich sowohl in der intrazellulären Domäne (T1044I) als auch im extrazellulären Teil des Rezeptors (A720T). Es konnte gezeigt werden, dass die Leptinrezeptorvariante der NZO-Maus ein geringeres Signaltransduktions-Potential besitzt als der Wildtyp-Rezeptor. Die maximale Aktivität der Rezeptoren ist identisch, der EC50-Wert des Lepr<sup>A720T/T1044I</sup> ist jedoch höher als der des Wildtyp-Rezeptors (Kluge *et al.*, 2000). Möglicherweise führen diese funktionellen Veränderungen zu einer Leptinresistenz, die zu der Entstehung des adipösen Erscheinungsbildes beiträgt. Eine Störung im Leptin-Regelkreis wird auch bei der Entstehung von Insulinresistenz und Typ-2-Diabetes angenommen (Cohen *et al.*, 1996). Da die Leptinrezeptor-Variante auch in dem verwandten, normalgewichtigen *New Zealand Black* (NZB)-Stamm zu finden ist, ist die Bedeutung für die Entwicklung der Adipositas und Hyperleptinämie der NZO-Maus noch unklar. Eine Aufklärung der funktionellen Bedeutung dieser Variante für die Entwicklung des metabolischen Syndroms der NZO-Maus erscheint daher sinnvoll.

### 1.5.2 SJL-Maus

Als Kontrollstamm dient die SJL-Maus, die seit 1955 aus drei Subpopulationen des *Swiss Webster*-Auszuchtstammes in dem Jackson *Laboratory* in Bar Harbor, Maine, USA ingezüchtet wurde. Die normalgewichtige SJL-Maus wurde als Kreuzungspartner ausgewählt, da sie selbst bei fettreicher Ernährung resistent gegenüber einer Arteriosklerose- (Nishina *et al.*, 1993; Paigen, 1995) und Adipositas-Entwicklung (Festing, 1997; West *et al.*, 1992) ist. Sie zeigt eine hohe metabolische Stoffwechselrate (Storer, 1967) und niedrige Plasma-Cholesterinwerte (Weibust, 1973).



**Abb. 1.1 NZO-Maus (linkes Foto) und SJL-Maus (rechtes Foto)**

## **1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist die phänotypische Charakterisierung des beschriebenen NZO-Rückkreuzungsmodells und die Aufklärung der genetischen Grundlagen der im Rahmen des metabolischen Syndroms der NZO-Maus auftretenden Adipositas und Hypercholesterinämie. Neben der Identifizierung von Suszeptibilitätsloci für die Parameter Adipositas und Hypercholesterinämie werden die Interaktionen mit weiteren QTL (Gen-Gen Interaktion) und der Einfluss des Fettgehaltes der Nahrung (Gen-Umwelt Interaktion) auf die so identifizierten Suszeptibilitätsloci untersucht.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Die verwendeten molekularbiologischen Standardmethoden wurden bei Plum, 2002 ausführlich beschrieben.

### 2.1 Beschreibung des Tiermodells

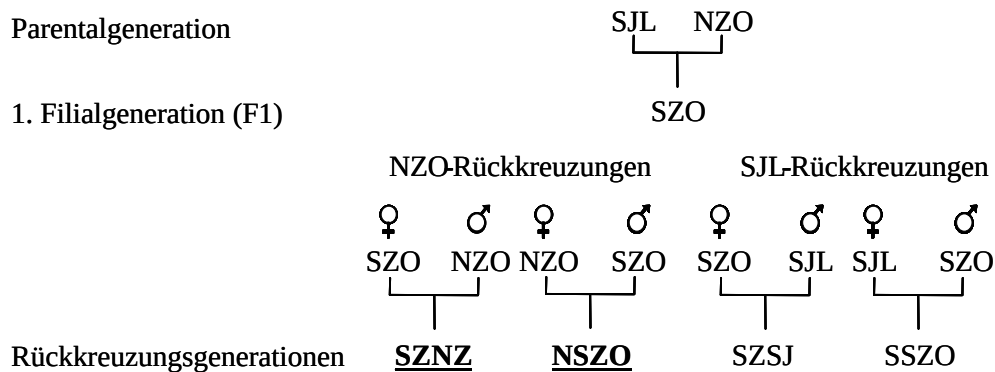
#### 2.1.1 Rückkreuzungsmodell

Das Versuchstiermodell basiert auf einem Rückkreuzungsmodell aus den bereits beschriebenen NZO- und SJL-Inzuchtstämmen. Die SJL- und NZO-Parentaltiere bzw. die Sublinien SJL/NBom und NZO/HIBom wurden von Bomholtgard (Ry, Dänemark) bezogen. Die NZO- und SJL-Parentaltiere werden miteinander verpaart. So entstehen die beiden F1-Typen SZO (SJLxNZO) und ZOS (NZOxSJL). Wegen einer geringen Nachkommenzahl der ZOS-Kreuzung wurde nur die SZO-Population für die weitere Zucht verwendet. Diese wurde auf die beiden Parentaltstämme zurückgekreuzt (s. Abb. 2.1, S.12). Aufgrund von Voruntersuchungen, die nahelegen, dass größtenteils Gene mit einem rezessiven Vererbungsmodus für die Entstehung des metabolischen Syndroms der NZO-Maus verantwortlich sind (s. 3.1), haben wir uns auf die Auswertung der NZO-Rückkreuzungen konzentriert. Diese wurden in zwei getrennten Versuchsansätzen aufgelegt. Diese Kreuzungen werden im folgenden als erste und zweite Kreuzung bezeichnet.

#### 2.1.2 Haltungs- und Zuchtbedingungen

Die Zuchttiere der Parentalgeneration erhielten ein Standardfutter zur Haltung von Nagern (1314; Fa. Altromin) mit 5% Fett (Sojaöl), 48% Kohlenhydraten und 22.5% Eiweiß. Das Futter hat einen Energiegehalt (ME, *Metabolizing Energy*) von 12.5 kJ/g. Die Zuchttiere der F1-Generation erhielten nach der Entwöhnung in der dritten Lebenswoche ein fettreiches Alleinfutter zur Haltung von Mäusen (C1057; Fa. Altromin) mit 16% Fett (Sojaöl), 46.8% Kohlenhydraten und 17.1% Eiweiß (ME: 17.2 kJ/g). Sowohl das Standardfutter als auch das fettreiche Futter sind cholesterinfrei. Die Diäten werden im folgenden als Standard-Diät (SD) und fettreiche Diät (FD) bezeichnet. Die Parentaltiere und die Tiere der F1-Generation wurden ab einem Alter von acht Wochen ständig verpaart. Alle Rückkreuzungstiere der ersten Kreuzung erhielten das fettreiche Futter. Einige Rückkreuzungstiere der zweiten Kreuzung

wurden unter Standard-Diät-Bedingungen gehalten. Das Trinkwasser wurde ozoniert, UV-bestrahlt und entkalkt. Futter und keimfreies Trinkwasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen (Typ III, Fa. EBECO, Castrop-Rauxel) auf entstaubter Weichholzfaser (Fa. Rettenmaier & Söhne, Ellwangen) gehalten. Das Raumklima wurde mit einer Raumtemperatur von 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55±5% konstantgehalten. Die Tiere waren einem 12-stündigen Hell-Dunkelzyklus, beginnend um 6.00 Uhr morgens, ausgesetzt. Nach der Entwöhnung mussten die männlichen Jungtiere aufgrund der für den SJL- Stamm typischen Aggressivität (Page und Glenner, 1972) getrennt gehalten werden. Die weiblichen Geschwister wurden in Gruppen gehalten. Es kamen maximal sieben Würfe eines Elternpaares zur Auswertung.



**Abb. 2.1 Schematische Darstellung des Kreuzungsschemas.** Die Parentaltiere werden miteinander verpaart. Die Nachkommen bilden die uniforme F1-Generation. Diese wird auf die beiden Parentalstämme zurückgekreuzt. Die zur Suche nach QTL ausgewerteten Rückkreuzungen sind unterstrichen.

### 2.1.3 Tötung

Im Alter von 22 Wochen wurden in Isoflurananästhesie ca. 1.5 ml Vollblut durch Herzpunktion gewonnen (EDTA-Monovette; 4.5ml; Fa. Sarstedt, Nürnberg). Anschließend wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Nach Zentrifugation bei 4000xg für 10 min wurde das Plasma bei -80°C eingefroren. Nach der Tötung wurden durch Dissektion die Lebern und in einer randomisierten Gruppe weitere Gewebeproben (Herz, intraperitoneales Fett, Skelettmuskel, Pankreas) gewonnen. Mit Ausnahme des Pankreasgewebes wurden die Gewebe nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert. Das Pankreas wurde in 4%-iger Formalinlösung (4% Paraformaldehyd in PBS-Puffer) fixiert. Die histologische Untersuchung des Pankreasgewebes wurde von Frau PD Dr. E. Junger im Deutschen Diabetes Forschungsinstitut (DDFI) in Düsseldorf durchgeführt. Näheres hierzu findet sich bei Plum,

2002. Die Studie wurde genehmigt vom Regierungspräsidenten Köln, Aktenzeichen 23.203.2-AC39, 14/98.

## 2.2 Phänotypische Charakterisierung der Versuchstiere

### 2.2.1 Bestimmung der Körpermaße

Die individuellen Körpergewichte der Rückkreuzungstiere wurden ab der 3. Lebenswoche wöchentlich gemessen. Nach der Tötung wurde die Körperlänge von der Nasenspitze bis zum Schwanzansatz bestimmt. Hierzu wurde der entblutete Kadaver auf einer Korkplatte fixiert und anhand einer Millimeterskala die Körperlänge hängend vermessen.

### 2.2.2 Messung des Körperfettgehaltes

Zur Bestimmung des Gesamt-Körperfettgehaltes wurde zunächst das Körpergewicht = Frischgewicht gemessen und der Kadaver anschließend in einem offenen Glasbehälter in einem Brutschrank für 48h bei 105°C getrocknet. Nach Feststellen des Trockengewichtes wurde der getrocknete Körper in einem Mörser zerstossen und mit 90 ml Tetrachlorethen versetzt. Nach Rückwaage dieses Gemisches wurde der Glasbehälter verschlossen und für 48h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach so erfolgter Fettextraktion wurde das Gemisch zur Beseitigung von Feststoffen gefiltert. Die quantitative Bestimmung des in Tetrachlorethen gelösten Körperfettes erfolgte mit Hilfe des Foss-Let MKII Gerätes (Typ 15300/15500; Fa. Foss Elektronik, Hamburg). Ursprünglich zur Messung des Fettgehaltes von Saatgut entwickelt, eignet sich dieses Gerät auch zur Fettbestimmung von Fleisch- und Wurstwaren (Eslami-Matin *et al.*; 1974). Hierzu wird das spezifische Gewicht des Fett-Tetrachlorethen-Gemisches bestimmt. Dieses wird in die Messeinheit des Gerätes gefüllt, in der sich ein Schwimmer mit einem Magnetkern befindet. Dieser Schwimmer ist von zwei elektromagnetischen Feldern umgeben, von denen das eine konstant ist und das andere durch Änderung des Stromdurchflusses durch eine Spule variiert werden kann. Die Veränderung des variablen Feldes beeinflusst die Auftriebskraft des Schwimmers. Ist die Auftriebskraft des Schwimmers gleich dem spezifischen Gewicht der zu messenden Lösung, steigt der Schwimmer und die Messung ist beendet. Anhand einer Tabelle (Fa. Foss Elektronik, Hamburg) lässt sich dann der Fettgehalt des Gemisches ermitteln (spezifisches Gewicht von Körperfett: 0.9 g/cm<sup>3</sup>; spezifisches Gewicht von Tetrachlorethen: 1.614 g/cm<sup>3</sup>). Da die Dichte

der Lösung abhängig von der Temperatur ist, wird die Temperatur der Messeinheit konstant bei 37°C gehalten. Die Umrechnung des so ermittelten Fettgehalts auf das Trocken- bzw. Frischgewicht des Kadavers erfolgt nach folgender Formel (Kluge, 1980):

$$\text{Korrigierter Fettgehalt} = \frac{h * 43.3 * i * 0.75}{k * 145.26}$$

h: Fettgehalt der Probelösung [%]

43.3: von der Firma vorgegebene Solleinwaage [g]

i: Tetrachlorethengewicht vor dem Messen [g]

k: Trocken-/ Frischgewicht des Kadavers [g]

0.75: Korrekturfaktor: in der o.g. Tabelle wird eine Einwaage von 120 cm<sup>3</sup> Tetrachlorethen angenommen, eingesetzt wurden nur 90 cm<sup>3</sup>

145.26: Normaleinwaage an Tetrachlorethen (90 cm<sup>3</sup> \* 1,614 g/cm<sup>3</sup>)

### 2.2.3 Bestimmung verschiedener Blut-, Plasma- und Serum-Parameter

#### 2.2.3.1 Blut-Glucose

Zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Blutglucosekonzentrationen wurden bei einigen männlichen Tieren Blutglucose in der 10., 12., 15., 17. und 22. Lebenswoche nach Punktion der Schwanzvene mit einem Blutzuckerschnellmessgerät (Glucometer Elite, Fa. Bayer Vital AG; laut Herstellerangaben liegt die Messgenauigkeit bei ±15%) ermittelt. Die Messung erfolgte bei den weiblichen Tieren lediglich in der 10., 17. und 22. Lebenswoche.

#### 2.2.3.2 Plasma-Glucose und -Fette

Unmittelbar nach Tötung der Tiere wurden die individuellen Glucose-, Triglycerid-, und Cholesterinkonzentrationen aus 10 ml Plasma des durch Herzpunktion gewonnenen Blutes mit einem *Auto-Analyzer* (Fa. Johnson & Johnson, Neckarmünd) bestimmt.

#### 2.2.3.3 Plasma- und Serum-Insulinbestimmung

Bei den männlichen Rückkreuzungstieren wurden die Insulinkonzentrationen in einem Alter von 10 Wochen aus Serum des durch Schwanzpunktion gewonnenen Vollblutes und bei Tötung in der 22. Lebenswoche aus dem Blutplasma des durch Herzpunktion gewonnenen, antikoagulierten Vollblutes bestimmt (EDTA). Die Plasma-Insulinwerte der weiblichen Tiere

wurden einmalig in der 22. Lebenswoche gemessen. Zur Messung der Plasma- bzw. Seruminsuline wurden Radio-Immuno-Assays mit dem Biotrak<sup>TM</sup>-System (*Rat insulin* [<sup>125</sup>I] *assay system with magnetic separation*; Fa. Amersham; Buckinghamshire, England) verwendet. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Konkurrenz einer definierten Menge zugegebenen radioaktiv markierten Humaninsulins mit der in der Probe vorhandenen Menge unmarkierten Mausinsulins um die Bindungsstellen an einer festgelegten Menge zugefügten Insulin-Antikörpers. Somit ist die Menge des antikörpergebundenen, radioaktiv markierten Humaninsulins indirekt proportional zu der Konzentration des in der Probe vorliegenden Mausinsulins. Die Gewinnung der antikörpergebundenen Human- und Maus-Insulinfraktionen erfolgt mittels eines Sekundär-Antikörpers, der an magnetisierbare Polymere gebunden ist. Die antikörpergebundenen Insulinfraktionen können durch magnetische Separation oder Zentrifugation erhalten werden. Die Radioaktivität der Proben wird durch einen  $\beta$ -Szintillationszähler (1282-802 Compugamma; Fa. LKB, Turku, Finnland) gemessen. Anhand einer erstellten Standardkurve kann die Insulinkonzentration der untersuchten Probe errechnet werden. Der Assay wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

## 2.3 Genotypische Charakterisierung der Versuchstiere

### 2.3.1 DNA-Isolation

Die genomische DNA der Tiere wurde aus Mausschwanzstücken mit dem *InViSorb<sup>TM</sup> Genomic DNA Kit II* (InViTek GmbH, Berlin), gewonnen. Diese Methode beruht auf einem Salzpräzipitations-Verfahren. Die Herstellerangaben zur Durchführung des Isolationsverfahrens wurden zur Optimierung der Ergebnisse modifiziert. Die Mausschwanzstücke (0.8-1 cm) wurden mit 300 ml Lysispuffer G und 20 ml Proteinase K (20 mg Proteinase K/ml ddH<sub>2</sub>O) versetzt und ungefähr 4h bei 56°C unter kontinuierlichem Schütteln lysiert. Zur Verstärkung der Lyse wurden die Proben zweimal für 5-10 min im Gyrator durchmischt. Nach Pelletierung der unlysierte Bestandteile durch Zentrifugation für 1 min bei 32xg wurden 300 ml des Überstands mit 600 ml Binding-Puffer in einem neuen Reaktionsgefäß 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Trägermaterial mit der gebundenen DNA wurde durch kurzes Zentrifugieren für 1-2s pelletiert und der Überstand durch Absaugen verworfen. Das so erhaltene Pellet wurde in drei Waschzyklen gereinigt. Dazu wurde das Pellet mit je 1 ml Waschpuffer im Gyrator vermischt und der Überstand nach

kurzer Zentrifugation verworfen. Zur Entfernung des Ethanol wurde das Pellet nach dem letzten Waschzyklus 3 min bei Raumtemperatur und ungefähr 3 min bei 56°C getrocknet. Ein Übertrocknen des Pellets wurde vermieden. Zur Lösung der DNA von dem Trägermaterial wurde das Pellet in 200 ml Elutionspuffer D durch Vortexen resuspendiert und 6 min bei 56°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Suspension für 1 min wurden 190 ml des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 2.3.2 DNA-Messung und -Verdünnung

Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde photometrisch mit dem *GeneQuant II-Photometer* (Fa. Pharmacia Biotech, Cambridge, England) bestimmt. Die zu messenden Lösungen wurden 1:35 verdünnt. Es wurden jeweils drei Verdünnungsansätze je 70 ml zur Bestimmung der DNA-Konzentration eingesetzt. Die gemessenen Werte wurden gemittelt und die DNA-Lösungen mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 ng/ml verdünnt. Photometrisch wurden neben der Absorption bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNA, auch die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Index der gemessenen Absorption bei 260 nm/Absorption bei 280 nm gibt Hinweise auf die Reinheit der gemessenen DNA und die Art der Verschmutzung. Ein Quotient von 1.8 entspricht einer reinen DNA-Lösung.

### 2.3.3 Genotypisierung mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern

Zur genomweiten Suche nach Suszeptibilitätsloci für Parameter des metabolischen Syndroms wurden zunächst aus einem *Genome Wide Screening Set* (Research Genetics, Huntsville, Alabama, USA) Mikrosatelliten-*Primer*-Paare ausgewählt, die polymorph für die SJL- und NZO-Parentalstämme sind. Mikrosatelliten bzw. Minisatelliten sind nicht kodierende DNA-Regionen des Genoms, die aus Wiederholungen (Repeats) verschiedener kurzer Sequenzen (CA-Dinukleotide bzw. Oligonukleotide von 20-30 Basenpaaren) bestehen. Diese Mikrosatelliten sind hoch polymorph, d.h. sie unterscheiden sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bei verschiedenen Mausstämmen. Sie eignen sich somit zur genotypischen Charakterisierung verschiedener Allele und können als DNA-Marker dienen (Weber and May, 1989). Die Mikrosatelliten wurden durch die Polymerase-Kettenreaktion-Technik mit Oligonukleotid-*Primern* (Research Genetics, Huntsville, Alabama, USA) vervielfältigt. Von den gelieferten 410 *Primern* waren ca. 30% polymorph für das NZO- und das SJL- Genom. Diese *Primer* deckten die 19 Autosomen des Mausgenoms in ungefähr 10



cM Abständen ab. Es wurden *Primer* bevorzugt, deren Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Produkte eine Länge von 90-200 bp aufwiesen. Die verschiedenen Rückkreuzungen wurden untersucht, indem jeweils ca. 50 Tiere mit über 110 Mikrosatellitenmarkern genotypisiert wurden. Die ermittelten Daten wurden mit parametrischen statistischen Testverfahren (s. 2.4) ausgewertet. Interessante Bereiche wurden durch Genotypisierung weiterer Tiere genauer analysiert.

### 2.3.3.1 Amplifizierung der Mikrosatellitenmarker

Die PCR-Technik dient der Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Dabei werden die beiden DNA-Stränge bei einer Temperatur von 92°C denaturiert, d.h. getrennt. Die zugegebenen *Primer* lagern sich bei der *Primerspezifischen Annealing*-Temperatur, die durch den GC-Gehalt bestimmt wird, an die Einzelstränge an. In der folgenden Polymerisierungsphase bei 72°C findet die Synthese von neuen DNA-Strängen statt. Dabei werden die zugefügten Desoxynucleotide (dNTPs) von den *Primern* ausgehend mit Hilfe der zugefügten DNA-Polymerase zu komplementären Strängen vervollständigt. Im Rahmen der genomweiten Suche wurde die PCR als *Touch-Down-PCR* durchgeführt. Es wurde ein PCR-Programm festgelegt, welches für nahezu alle *Primer* verwendet werden konnte. Die *Annealing*-Temperatur der verwendeten *Primer* befand sich zwischen 55-65°C, so dass ausgehend von 65°C die Temperatur in den ersten 11 Zyklen schrittweise um 1°C auf 55°C gesenkt wurde. Für einige *Primer* wurde ein Programm mit der spezifischen *Annealing*-Temperatur der *Primer* verwendet. Diese liegt in einem Bereich von  $\pm 3^\circ\text{C}$  der Schmelztemperatur.

Standardprogramm: 95 °C - 3 min; 95 °C - 45 s, 65 °C - 55 °C - 60 s, 72 °C - 90 s, 36 Zyklen; 72 °C - 7 min; Aufbewahrung bei 4 °C.

Standardansatz: 10 ng genomische DNA, 100 nM je *Primer*, 1xTfl-Puffer, 3xTfl-Enhancer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf), 0.2 mM dNTPs (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 1 U Tfl-Polymerase (Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf).

### 2.3.3.2 Gelelektrophorese der allelspezifischen PCR-Produkte

Geladene Moleküle (z.B. Proteine, DNA, RNA) bewegen sich in einem elektrischen Feld abhängig von ihrer Ladung und der Feldstärke. Die Mobilität der DNA-Fragmente ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese erfolgte in Gelen mit 10% Polyacrylamid-Gehalt. 10%-Polyacrylamidgele werden zur Auftrennung von linearen DNA-Fragmenten mit einer Länge von 50 bis 300 bp verwendet. Längenunterschiede von einigen Nucleotiden können detektiert werden. Den Proben wurde 4 ml Auftragspuffer (GLB, Gel Loading Buffer) zugesetzt. Als Längenstandard dienten die Fragmente einer 100 bp-Leiter (Superladder-Low; Fa. GenSura Laboratories, Kalifornien, USA).

#### Verwendete Lösungen:

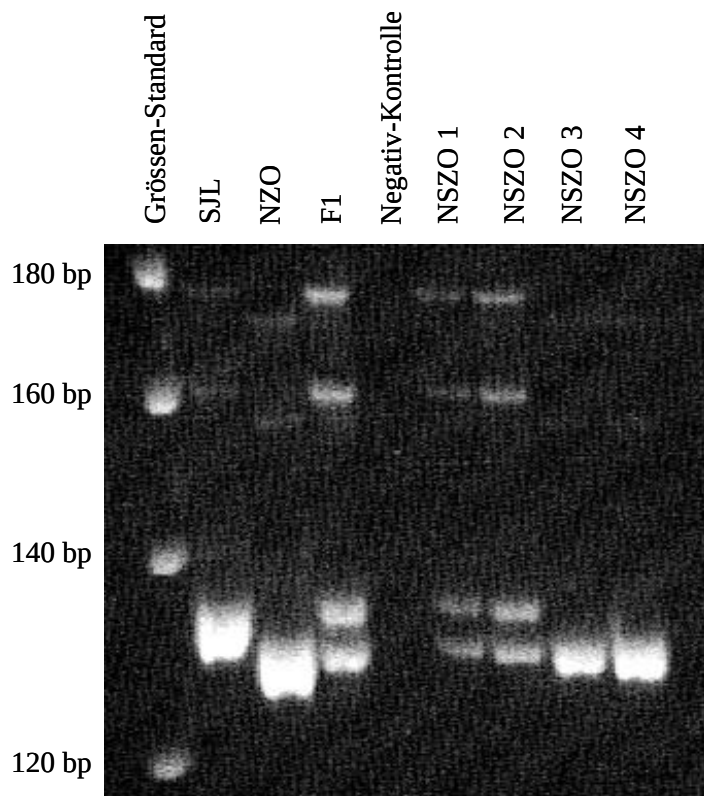
|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10% Polyacrylamidgel: | 11 ml Acrylamid (40 % Acrylamid/Bis 19:1; Fa. BioRad Laboratories, Kalifornien, USA); 4.4 ml 10xTBE-Puffer; 28.1 ml ddH <sub>2</sub> O; 400 ml APS (10% (w/v); Fa. GibcoBRL, Eggenstein); 75 ml TEMED (Fa. BioRad Laboratories, Kalifornien, USA), 90 ml Phenolrot (10% (w/v) in 1xTBE; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen). |
| TBE-Puffer:           | 0.89 mM Tris HCL (pH 7.5; Fa. ICN Biochemicals GmbH, Eschwege); 25 mM EDTA (0.5 M, pH 8; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen); 0.89 M Borsäure (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt).                                                                                                                                           |
| GLB-Puffer:           | 30 nM EDTA (0.5 M, pH 8); 15% (w/v) Ficoll 400; 0.06% (w/v) Xylenzanol FF (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen); 0.06% (w/v) Bromphenolblau (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt); ddH <sub>2</sub> O.                                                                                                                          |

Die Auftrennung erfolgte in senkrechten Gelkammern (Typ V2-DC; Fa. SCIE-PLAS, Worwickshire, England) ungefähr 3.5 h bei 350 V/cm<sup>2</sup>. Als Elektrodenpuffer wurde 1xTBE-Puffer verwendet. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die Gele 0.5-1h in einer Ethidiumbromidlösung (33.3 mg EtBr/100ml TBE-Puffer) unter ständigem Schwenken gefärbt. Die Fragmentbanden waren bei Durchleuchtung der Gele mit ultravioletter (UV)

Licht sichtbar. Anhand des Bandenmusters konnten die Genotypen bestimmt werden (s. Abb. 2.2, S.19).

#### 2.3.4 Genotypisierung des Leptinrezeptorlocus (*Lepr*) mit Restriktions-Fraktions-Längen-Polymorphismen (RFLP)

Wie bereits beschrieben (s. 1.5.1) weist der Leptinrezeptor der NZO-Maus neben zwei konservativen Mutationen zwei nicht konservative Punktmutationen auf. Die intrazelluläre nicht konservative Punktmutation führt zu einem Austausch von Threonin 1044 gegen Isoleucin. Somit entsteht eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BspHI. Durch Verdau des 443bp großen Amplifikationsprodukt des Leptinrezeptors erhält man bei Vorliegen der *Lepr*-Mutante ein 118 und ein 325 bp langes Stück (Igel *et al.*, 1997).



**Abb. 2.2 Repräsentatives Gel für die Auswertung einer PCR zur Genotypisierung der NSZO-Rückkreuzungstiere.** Die Allel-spezifischen Produkte haben eine Länge von 135 bp (SJL-Allel) und 130 bp (NZO-Allel). SJL, NZO und SZO dienen als Standard für die Auswertung; NSZO 1 und 2 sind heterozygot, NSZO 3 und 4 sind homozygot für das NZO-Allel.

##### 2.3.4.1 Amplifizierung des Leptinrezeptorlocus mittels PCR

Die Sequenz der zur RFLP verwendeten *Primer* wurde anhand der Sequenz der langen Leptinrezeptorvariante ermittelt (Igel *et al.*, 1997).

Primersequenz (Länge des amplifizierten Produkts: 443 bp):

Lepr7B-for 5'-ATA GTC CTG TCA GCA ACT-3'

Lepr7B-rev 5'-TAT CTT GTG ACT GTG CGT-3' (Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg)

Programm: 94°C - 3 min; 94°C - 45 s, 54°C - 60 s, 72°C - 90 s, 35 Zyklen;  
72°C - 6 min; Aufbewahrung bei 4°C.

Ansatz: 40 ng genomische DNA, 100 mM je *Primer*, 1xTaq-Puffer  
(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM  
dNTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 0.5 U Taq-  
Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), ddH<sub>2</sub>O ad  
20 ml.

#### 2.3.4.2 Restriktionsverdau der *LepR*-Amplifikationsprodukte

Die in der PCR erhaltenen Produkte des Leptinrezeptorlocus wurden mit dem Restriktionsenzym BspHI verdaut.

Ansatz: PCR-Produkt, 2.2 ml 10xNE4-Puffer, nach Vermischen: 0.5 ml  
1xNE4-Puffer, 5 U BspHI, 4 ml ddH<sub>2</sub>O.  
Anschliessend Inkubation für 2h bei 37 °C.

#### Verwendete Lösungen:

NE4-Puffer(1x): 50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-acetat, 10 mM  
Magnesiumacetat, 10 mM DTT, pH 7.9, Fa. New England  
BioLabs, Schwalbach/Ts

#### 2.3.4.3 Elektrophorese der RFLP-Produkte

Die RFLP-Produkte wurden mit OrangeG Puffer angefärbt und beschwert und auf einem Spezial-Agarosegel für kleine DNA-Fragmente aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern (Biometra GmbH, Göttingen) bei 100 V/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Die Laufzeit betrug ca. 60 min.

#### Verwendete Lösungen:

---

|                       |                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2% Agarosegel (50ml): | 50 ml 1xTBE-Puffer, 1 g <i>Small DNA</i> Agarose ( <i>Small DNA</i> Agarose; Fa. Biozym, Hessisch Oldendorf), 16 mg Ethidiumbromid.                                              |
| OrangeG-Puffer:       | 0.25% (w/v) Orange G (Natriumsalz, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 1xTBE-Puffer, 60% Glycerin (v/v) (wasserfrei, reinst; Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt), ddH <sub>2</sub> O. |

## 2.4 Statistische Analyse der Daten

### 2.4.1 Signifikanz- und Varianzanalysen

Die ermittelten genotypischen und phänotypischen Daten wurden in Excel-Tabellen (Version 7.0) zusammengefasst und auf vorliegende Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp hin untersucht. So konnte das gesamte Genom auf Zusammenhänge von Genotyp und Phänotyp analysiert werden. Die phänotypischen Merkmale folgten mit Ausnahme der Insulinwerte annähernd einer Normalverteilung. Es wurden daher die logarithmierten Insulinwerte zur Auswertung herangezogen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Hilfe von Pivot-Tabellen des Microsoft Excel-Programms (Version 7.0) errechnet. Unterschiede der verschiedenen Parameter zwischen den beiden Genotyp (S/N vs. N/N)-, den beiden Geschlechts (m vs. w)- und den beiden Diätgruppen (SD vs. FD) wurden mit Hilfe des unverbundenen, zweiseitigen (Student)-t-Tests auf einem Signifikanzniveau von 5% untersucht. Dieser Arbeit liegt ein explorativer Studienansatz zu Grunde, d.h. p-Werte von  $\leq 0.05$  werden als statistisch signifikant beurteilt. Zur Interaktionsanalyse zweier Genloci und zur Analyse von multifaktoriell bedingten Variablen wurden die verschiedenen Gruppen in einer Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) verglichen. Sowohl t-Tests als auch Varianzanalysen wurden mit dem statistischen *Software*-Paket SAS-Analyst (Version 8.2) durchgeführt. Neben den erwähnten Phänotypen wurden zusätzliche Parameter aus den erhobenen Rohdaten errechnet und mit denselben Verfahren ausgewertet:

*Body Mass Index* (BMI) = Körpergewicht [g] / Quadrat der Körperlänge [cm<sup>2</sup>]

Absolutes Körperfett (AFF) = prozentualer Körperfettanteil x Körpergewicht [g] x 100

Absolutes Magergewicht (ALF) = Körpergewicht [g] – absolutes Körperfett [g]

Insulinsekretion (ISK) =  $\log(100 \times \text{IRI}/\text{PG})$

Insulinsensitivität (ISN) =  $\log[100/(\text{IRI} \times \text{PG})]$

#### 2.4.2 Analyse mit Mapmaker/EXP und Mapmaker/QTL

Zunächst wurden genetische Chromosomen-Karten mit dem Programm Mapmaker/EXP 3.0 (Lincoln *et al.*, 1992b) erstellt. Chromosomen-Karten werden anhand der Rekombinationshäufigkeit zwischen den Mikrosatellitenmarkern erstellt (Paterson *et al.* 1988). Je weiter zwei Mikrosatellitenmarker auseinander liegen, desto mehr *Crossing-Over*, d.h. Chromosomenstrangbrüche während der Meiose, und folglich Rekombinationen gibt es zwischen den Markern. Somit erhält man neben der Reihenfolge der Marker auf dem Chromosom auch ein relatives Maß für die Abstände zwischen den Markern. Bei einem relativen Abstand von 1 cM erwartet man eine Rekombinationshäufigkeit von 1%, d.h. 1 Rekombination/100 Tiere. Danach wurde eine *Quantitative Trait Locus* (QTL)-Analyse (Paterson *et al.*, 1991) mit dem Programm Mapmaker/QTL 1.1 (Lincoln *et al.*, 1992a) durchgeführt. *Quantitative Trait Loci* (QTL) sind chromosomale Bereiche, in denen sich Gene befinden, die multifaktoriell oder polygen die phänotypische Ausprägung quantitativer Merkmale beeinflussen. Zur Suche nach QTL werden Kopplungsanalysen durchgeführt. Unter Kopplung versteht man die gemeinsame Vererbung zweier Genloci. Die genetische Kopplung ist umso grösser, je näher die Loci beieinanderliegen, d.h. je geringer die Rekombinationshäufigkeit ist. Die Rekombinationshäufigkeit kann einen Maximalwert von 50% annehmen. Dieses entspricht der erwarteten Rekombinationshäufigkeit bei getrennter Vererbung. Als ein statistisches Maß für das mögliche Vorliegen eines QTL gibt man den *Logarithm of the Odds* (LOD)-score an. Dieser ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass die beobachteten phänotypischen Effekte durch das Vorhandensein eines QTL und nicht durch das Fehlen eines solchen zustande kommen (Lander und Botstein, 1989). Der kritische Wert des LOD-scores ist abhängig von der Größe des untersuchten Genoms, der Dichte der genotypisierten Marker und der Kollektivgröße. Mapmaker/QTL 1.1 liefert unter Berücksichtigung dieser Kriterien einen korrigierten LOD-score für jeden Punkt des untersuchten Genoms. Bei der Kopplungsanalyse von Maus-Rückkreuzungen gilt bei einem 5%-Signifikanzniveau (1 Freiheitsgrad) ein LOD-score von  $\geq 3.3$  als signifikant (Lander und Schork, 1994). LOD-scores in einem Bereich von 2-3 wurden als suggestiv bezeichnet.

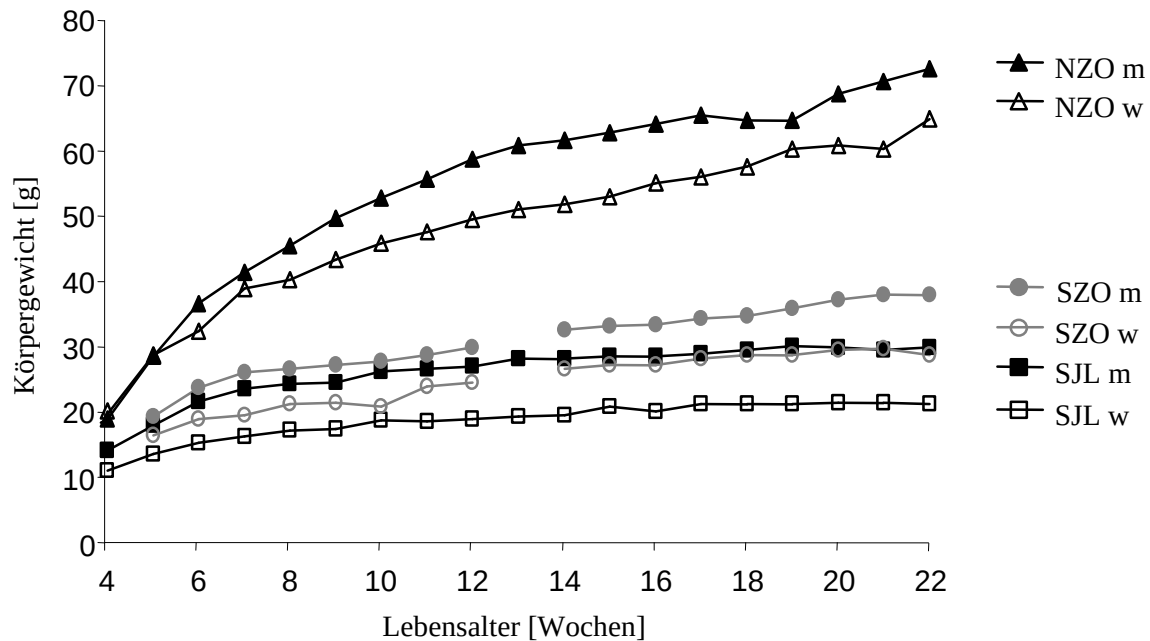
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Phänotypische Charakterisierung der verschiedenen Populationen

##### 3.1.1 Parental- und F1-Generation

Die weiblichen und männlichen Parentaltiere und die Tiere der F1-Generation (SJLxNZO) wurden phänotypisch hinsichtlich bestimmter Körpermaße sowie klinisch-chemischer Parameter charakterisiert (s. Tab. 3.1, Anhang). So weisen sowohl die männlichen als auch die weiblichen NZO-Tiere bereits ab der 4. Lebenswoche ein signifikant höheres Körpergewicht auf als die jeweiligen SJL-Tiere (s. Tab. 3.2, Anhang). Neben einem höheren BMI und erhöhten Triglycerid- und Cholesterin-Werten finden sich erhöhte Glucose- und Insulin-Spiegel. Diese Merkmale sind kennzeichnend für die Stoffwechselstörungen der NZO-Maus. Der bei der NZO-Maus auftretende Komplex aus Adipositas, Insulinresistenz und Dyslipidämie ist damit dem humanen metabolischen Syndrom vergleichbar. Die genotypisch intermediäre F1-Generation ist der SJL-Parentalgeneration hinsichtlich der phänotypischen Eigenschaften ähnlicher als der NZO-Parentalgeneration. So sind die männlichen und weiblichen F1 (SJLxNZO)-Tiere in der 22. Lebenswoche im Mittel 8.1 und 7.6 g schwerer als die SJL-Tiere, jedoch 34.6 bzw. 36.0 g leichter als die NZO-Tiere (s. Abb. 3.1, S.24). Phänotypisch gesehen besteht also keine intermediäre F1-Generation. Die NZO-Gene zeigen somit eine geringere Auswirkung auf den Phänotyp der F1-Generation als die Gene, die vom SJL-Genom stammen. Für die Entwicklung und Ausprägung des metabolischen Syndroms der NZO-Maus scheinen daher in dieser Kreuzungspopulation größtenteils rezessive NZO-Gene oder dominante Suppressoren von SJL verantwortlich zu sein.

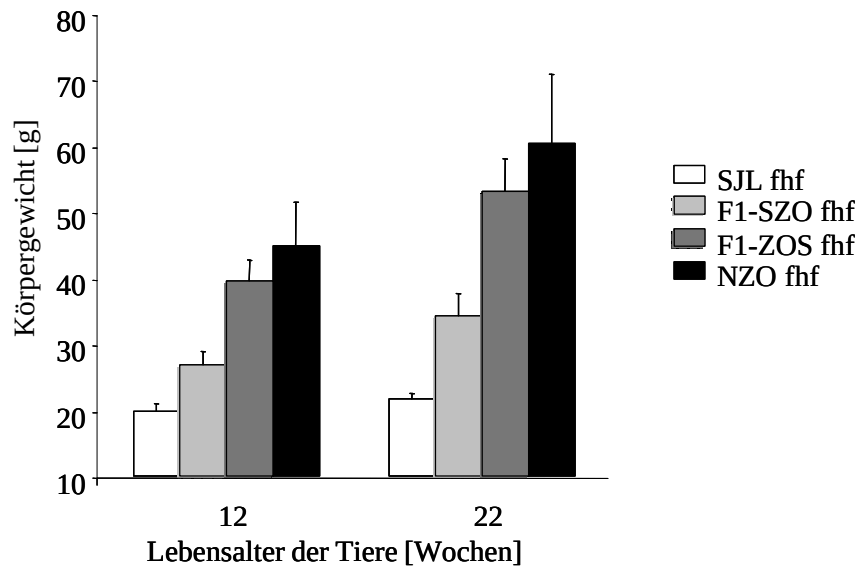
Weiterhin ist jedoch zu beobachten, dass die Tiere der F1-Generation, die aus Kreuzungen von NZO-Weibchen und SJL-Männchen entstanden sind (ZOS, NZOxSJL), ein höheres Körpergewicht aufweisen als die Tiere der reziproken Kreuzung, die eine dünne SJL-Mutter haben (SZO, SJLxNZO). Es scheint also einen von der Mutter ausgehenden Einfluss auf das Körpergewicht zu geben (s. Abb. 3.2, S.25).



**Abb. 3.1 Körpergewichtsverlauf der fettreich ernährten Parental- und der F1 (SJLxNZO)-Tiere.** Dargestellt sind die gemittelten Körpergewichte der weiblichen und männlichen SJL-, NZO- und SZO-Tiere von der 4. bis zur 22. Lebenswoche. Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte finden sich in der Tabelle 3.2.

Neben diesen genotypspezifischen Unterschieden lassen sich geschlechtsgebundene Unterschiede nachweisen. Die männlichen SJL-, NZO- und F1-Tiere zeigen ein höheres Körpergewicht, einen höheren BMI, höhere Plasma-Glucose-, Triglycerid- und Cholesterinwerte als die jeweiligen weiblichen Tiere. Einen Typ-2-Diabetes mellitus, definiert als Plasma-Glucose  $\geq 20$  mM, entwickeln 75% der NZO-Männchen, jedoch kein weibliches Tier. Im Verlauf der Erkrankung kommt es bei den männlichen Tieren oftmals zu einer Dekompensation des Glucosestoffwechsels mit hohen Glucosewerten und niedrigen Insulinkonzentrationen. Somit scheinen geschlechtsspezifische Faktoren, wie z.B. Hormone, einen Einfluss auf die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes mellitus zu haben.

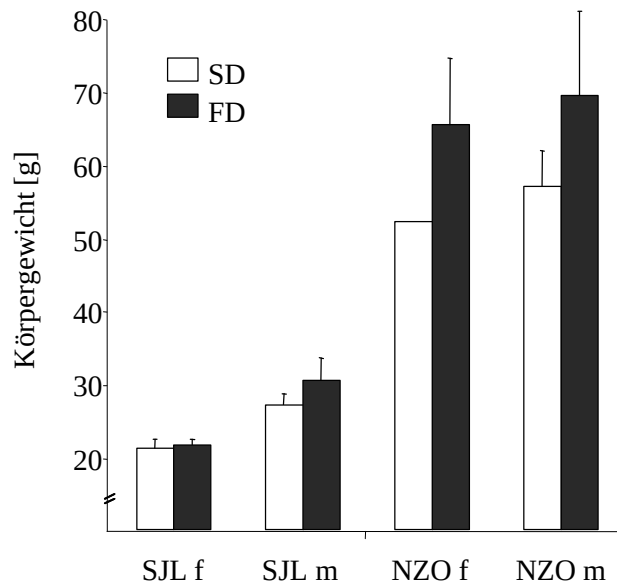




**Abb. 3.2 Vergleich der Körpergewichte der Parental- und der beiden reziproken F1-Generationen (SJLxNZO; NZOxSJL).** Dargestellt sind die gemittelten Körpergewichte der 12. und der 22. Lebenswoche.

Um den Effekt der Diät auf die beiden Parentalstämme zu untersuchen, wurde eine Gruppe von fettreich ernährten Parentaltieren mit einer entsprechenden Gruppe Standard-Diät ernährter Tiere verglichen. Dabei zeigte sich, dass die NZO-Maus, wie in der Literatur beschrieben (s.1.5), diätempfindlich ist, wohingegen die SJL-Tiere resistent gegenüber eine fettreichen Ernährung sind (s.

Abb. 3.3, S.26). Die fettreiche Diät führt bei den männlichen und weiblichen NZO-Tieren zu einer deutlichen Gewichtszunahme (FD vs. SD; männliche Tiere:  $69.1 \pm 11.4$  g vs.  $56.8 \pm 4.7$  g,  $p=0.0006$  ; weibliche Tiere:  $65.1 \pm 9.1$  g vs.  $52.0 \pm 0.0$  g,  $p=0.0845$ ), wohingegen das mittlere Körpergewicht der männlichen und weiblichen SJL-Tiere nahezu unbeeinflusst von dem Fettgehalt der Nahrung bleibt (FD vs. SD; männliche Tiere:  $30.2 \pm 3.2$  g vs.  $26.9 \pm 1.6$  g,  $p=0.0569$ ; weibliche Tiere:  $21.5 \pm 0.7$  g vs.  $21.1 \pm 1.1$  g;  $p=0.4862$ ). Aufgrund dieser Verstärkung des Effektes der Adipositas-Gene der NZO-Maus durch eine fettreiche Diät wurde die initiale genomweite Suche nach Suszeptibilitätsloci für Adipositas in einer fettreich ernährten Tierpopulation durchgeführt.



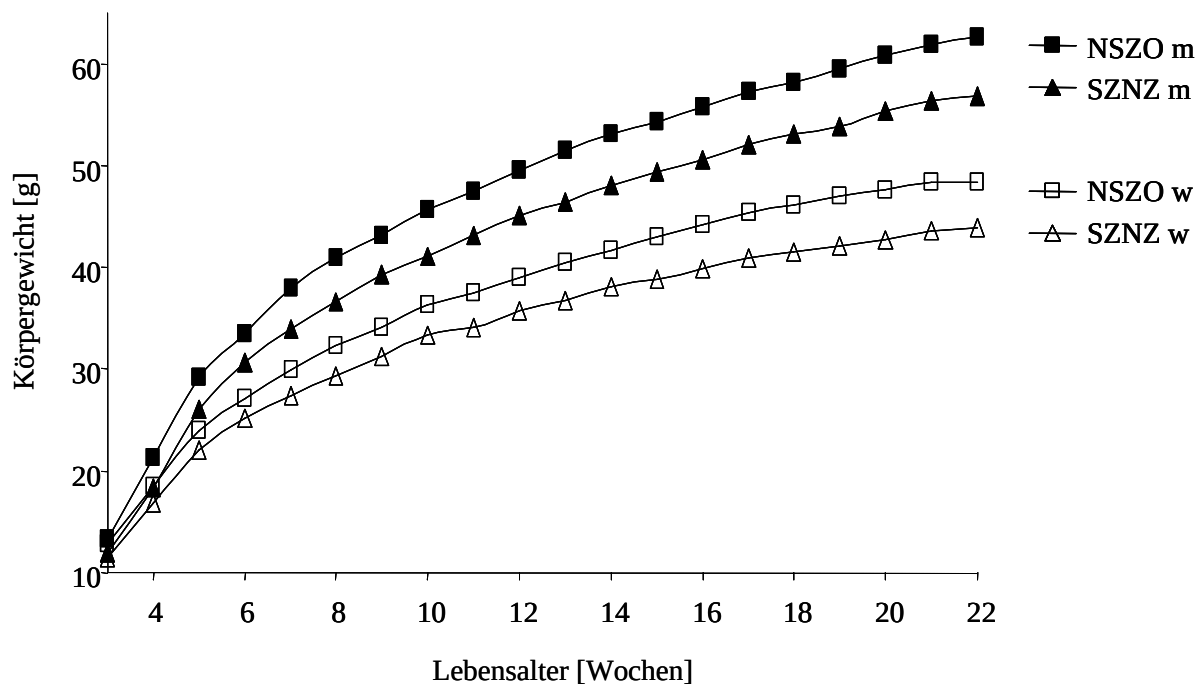
**Abb. 3.3 Effekt der fettreichen Diät auf das Körpergewicht in der 22. Woche von weiblichen und männlichen SJL- und NZO-Tieren.** Mittelwert±Standardabweichung

### 3.1.2 Rückkreuzungspopulationen

Die bei den Parentaltieren beobachtete Abhängigkeit der Ausprägung des metabolischen Syndroms vom Geschlecht lässt sich auch bei den Rückkreuzungstieren nachweisen. Die männlichen NSZO (NZOxSZO)- und SZNZ (SZOxNZO)-Tiere sind deutlich schwerer und weisen eine deutlich höhere Diabetes-Prävalenz auf als die entsprechenden weiblichen Tiere. Selbst in einem Alter von 52 Wochen ist die Diabetes-Prävalenz in den weiblichen Populationen unverändert niedrig (Daten nicht gezeigt). Um die in der genomweiten Suche identifizierten QTL zu bestätigen und genauer zu charakterisieren, wurde eine zweite Rückkreuzung gezüchtet. Die zweite Versuchsreihe diente im besonderen zur Untersuchung des Einflusses der Diät auf die Ausprägung der bereits für eine fettreiche Ernährung charakterisierten Suszeptibilitätsloci. Daher wurden mit Standard-Diät ernährte Tiere mit fettreich ernährten Tieren verglichen. Wie für die NZO-Tiere bereits gezeigt, führt eine fettreiche Ernährung auch bei den Rückkreuzungstieren zu einer Verstärkung des adipösen Krankheitsbildes. In der 22. Lebenswoche lassen sich mittlere Gewichtsunterschiede von 5.5 bis 10.9 g bei dem Vergleich von fettreichen und mit Standard-Diät ernährten Populationen feststellen (s. Tab. 3.2, Anhang).

Der für die F1-Generation beschriebene maternale Effekt lässt sich auch in den Rückkreuzungspopulationen nachweisen (s. Abb. 3.4, S.27). So entwickeln die NSZO-

Rückkreuzungstiere mit adipösen NZO-Müttern bis zur 22. Lebenswoche ein 4-6 g höheres Körpergewicht ( $p < 0.0001$ ) als die Tiere der SZNZ-Kreuzungen mit den dünneren SZO-Müttern. Eine signifikante Körpergewichtsdifferenz von 1.3 g ( $p < 0.0001$ ) lässt sich bereits in der 4. Lebenswoche nachweisen. Ein gonosomaler Vererbungsmodus kann als Ursache ausgeschlossen werden, da männliche und weibliche F1- und Rückkreuzungstiere in gleichem Maße betroffen sind. Ob maternales *Imprinting*, mitochondriale Vererbung oder exogene Faktoren eine Rolle spielen, wurde nicht weiter untersucht. Die Auswirkung der maternalen Umgebung auf die Ausprägung der Adipositas der NZO-Maus ist jedoch bekannt. Reifsynder und Mitarbeiter konnten durch Experimente mit Pflegemüttern zeigen, dass dieser Effekt postpartal bedingt ist. Möglicherweise ist der Lipidgehalt der Muttermilch für die Prägung verantwortlich (Reifsynder *et al.*, 2000).



**Abb. 3.4 Körpergewichtsverlauf der fettreich ernährten NSZO- und SZNZ-Rückkreuzungspopulationen.** Darstellung der Körpergewichtsmittelwerte der weiblichen und männlichen SZNZ- und NSZO- Rückkreuzungstiere von der 3. bis zur 22. Lebenswoche.

### 3.2 Auswahl des Kollektives für die genomweite Suche

Bei der Auswahl des Kollektives für die genomweite Suche nach Suszeptibilitätsloci für Adipositas, wurden grundlegende Überlegungen hinsichtlich des möglichen Vererbungsmodus, der Größe der zu erwartenden Effekte und des Einflusses von Umweltfaktoren (z.B. Zusammensetzung der Diät) berücksichtigt. Da für die Entstehung der

Adipositas in unserem Modell größtenteils rezessive Gene verantwortlich sind und die adipogenen Effekte des NZO-Genoms durch eine fettreiche Diät verstärkt werden, wurde die genomweite Suche in einer NSZO-Rückkreuzungspopulation bei fettreicher Diät durchgeführt. Somit waren die zu erwartenden Effekte groß genug, um diese auch in kleineren Tierpopulationen ermitteln zu können. Die männlichen Tiere wurden wegen der hohen Diabetes-Prävalenz von der Suche nach Adipositas-QTL ausgenommen. Aufgrund der Erkrankung kommt es bei diesen Tieren häufig zu einer Gewichtsabnahme, die zu einer Instabilität des Parameters Körpergewicht führt. Lediglich eine früh einsetzende Adipositas (bis zur 12. Lebenswoche) ist in diesem Kollektiv detektierbar.

### 3.2.1 Genomweite Suche

Zur genomweiten Suche nach Suszeptibilitätsloci für Adipositas, Insulinresistenz und Hypercholesterinämie wurden 53 weibliche Tiere der NZOxSZO-Rückkreuzungspopulation mit 92 polymorphen Mikrosatellitenmarkern genotypisiert. Die Marker umfassten alle Autosomen mit einem mittleren Abstand von ca. 10 cM. Die bei dieser Suche entdeckten möglichen QTL wurden durch die Genotypisierung einer größeren Tierzahl und der Verwendung weiterer polymorpher Marker näher eingegrenzt und charakterisiert. So wurden die Chromosomen 1, 3-8, 13, 15, 18, 19 für insgesamt 95 weibliche Tiere genotypisiert, Chromosom 5 und 19 sogar für 133 Tiere. Zur genaueren Charakterisierung der Suszeptibilitätsloci wurde eine zweite Kreuzung mit 347 weiblichen und 405 männlichen Tieren der NSZO- und SZNZ-Rückkreuzungen aufgelegt. Die phänotypischen Parameter Körpergewicht und Blutglucose wurden dabei engmaschiger kontrolliert. Weiterhin wurde der Einfluss des Fettgehaltes der Diät auf die QTL durch den Vergleich der Effekte in standard- und fettreich ernährten Gruppen untersucht. Dadurch konnten die pathophysiologischen Grundlagen des metabolischen Syndroms der NZO-Maus und der identifizierten Suszeptibilitätsloci genauer klassifiziert werden.

So konnten neben kleineren Suszeptibilitätsloci für Adipositas und Dyslipidämie zwei wesentliche Suszeptibilitätsloci für Adipositas und Hypercholesterinämie auf dem proximalen bzw. distalen Chromosom 5 der Maus identifiziert werden. Ein wichtiger QTL für Hyperglykämie und Hypoinsulinämie auf Chromosom 4 und ein weiterer QTL für Hyperglykämie sind bei Plum, 2002 beschrieben.

### 3.3 Identifizierung und Charakterisierung des Adipositas-Suszeptibilitätslocus *Nob1* auf dem proximalen Chromosom 5

#### 3.3.1 Identifizierung von *Nob1*

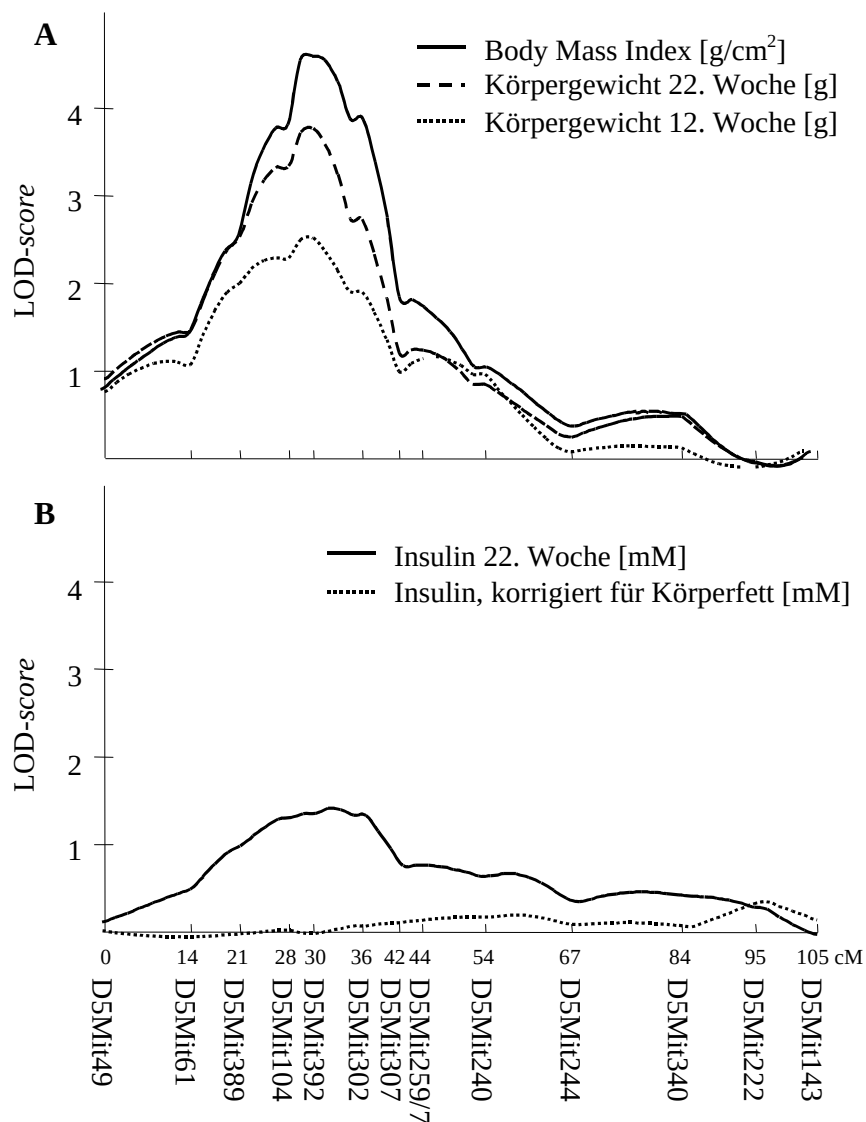
In der genomweiten Suche nach Suszeptibilitätsloci für Adipositas-Merkmale wurde ein Suszeptibilitätslocus für frühe Adipositas und Insulinresistenz auf dem proximalen Chromosom 5 der Maus identifiziert. Dieser wurde, da das verantwortliche Gen vermutlich von dem NZO Genom stammt, *Nob1* genannt. *Nob1* ist sowohl bei weiblichen als auch bei nicht-diabetischen männlichen Tieren zu finden. Es ergaben sich für 133 fettreich ernährte weibliche NSZO-Tiere der ersten Kreuzung maximale LOD-scores bei dem Marker D5Mit392 (32 cM laut MGD, Chromosome Committee Reports, <http://www.informatics.jax.org>; s. Abb. 3.5, S.30). Folgende LOD-scores wurden ermittelt: Körpergewicht/BMI in der 22. Lebenswoche (3.8/4.7), absolutes Körperfett (3.6), Körpergewicht in der 12. Lebenswoche (2.6) und Serum-Insulin in der 22. Lebenswoche (1.4). *Nob1* ist für ca. 15% der Varianz der Adipositas-Merkmale (Körpergewicht und BMI) verantwortlich. Die für das NZO-Allel homozygoten weiblichen Tiere zeigten ein ca. 6 g höheres Körpergewicht und ca. 2-fach höhere Serum-Insuline in der 22. Lebenswoche als die Gruppe der heterozygoten Tiere (s. Tab. 3.3).

**Tab. 3.3 Effekt des Genotyps bei D5Mit392 (*Nob1*) auf den Phänotyp in weiblichen und nicht-diabetischen männlichen Tieren (BG < 17 mM) der NSZO-Rückkreuzung.**

| FD Merkmal               | weibliche Tiere |           |         | männliche Tiere |           |        |
|--------------------------|-----------------|-----------|---------|-----------------|-----------|--------|
|                          | S/N (72)        | N/N (61)  | p-Wert  | S/N (36)        | N/N (22)  | p-Wert |
| KG12 [g]                 | 39.6±5.8        | 43.1±5.6  | 0.0007  | 47.1±6.2        | 51.5±6.6  | 0.0172 |
| KG22 [g]                 | 51.7±7.9        | 57.8±8.6  | 0.0001  | 62.8±9.3        | 67.6±9.6  | 0.0692 |
| BMI [g/cm <sup>2</sup> ] | 0.40±0.04       | 0.43±0.05 | <0.0001 | 0.43±0.06       | 0.48±0.05 | 0.1744 |
| AFG [g]                  | 19.7±4.5        | 23.0±4.6  | 0.0001  | 20.7±5.5        | 22.3±4.7  | 0.3044 |
| IRI22 [ng/ml]            | 12.7±21.6       | 24.0±34.5 | 0.0303  | 22.9±23.8       | 19.8±19.8 | 0.5970 |
| PG22 [mM]                | 10.6±3.8        | 12.0±4.9  | 0.0743  | 11.6±3.4        | 11.8±3.5  | 0.8433 |
| TG [mM]                  | 1.50±0.40       | 1.61±0.55 | 0.2329  | 1.69±0.68       | 1.30±0.44 | 0.0139 |
| Chol [mM]                | 3.84±0.45       | 3.86±0.58 | 0.8248  | 4.73±0.56       | 4.91±0.46 | 0.1910 |

Mittelwert ± Standardabweichung, S/N heterozygot für das NZO-Allel, N/N homozygot für das NZO-Allel.

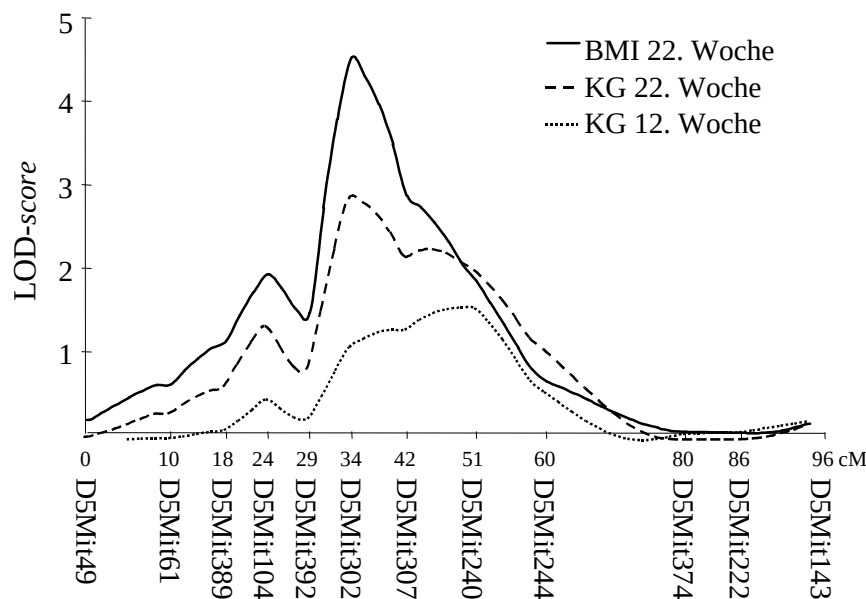
Anhand der linearen Regression von Serum-Insulin und absolutem Fettgehalt ( $R^2=0.303$ ;  $y=0.0609x-0.3849$ ) wurden die Residuen für den Parameter Serum-Insulin berechnet und auf Zusammenhänge mit den Genotypen untersucht. Für die so ermittelten Serum-Insulin-Residualwerte ergab sich kein signifikanter LOD-score mehr (s. Abb. 3.5). Der Effekt von *Nob1* auf Serum-Insulin ist abhängig von dem Effekt auf das Körpergewicht.



**Abb. 3.5 Verteilung der LOD-score Quotienten auf dem Chromosom 5 der Maus** für Körpergewicht 12. und 22. Woche und BMI (A), Plasma-Insulin 22. Woche und für Körperfett korrigiertes Plasma-Insulin (B). Die Daten wurden in einer Population aus 133 weiblichen NSZO-Tieren der ersten Kreuzung erhoben. Analyse mit Mapmaker/EXP und Mapmaker/QTL.

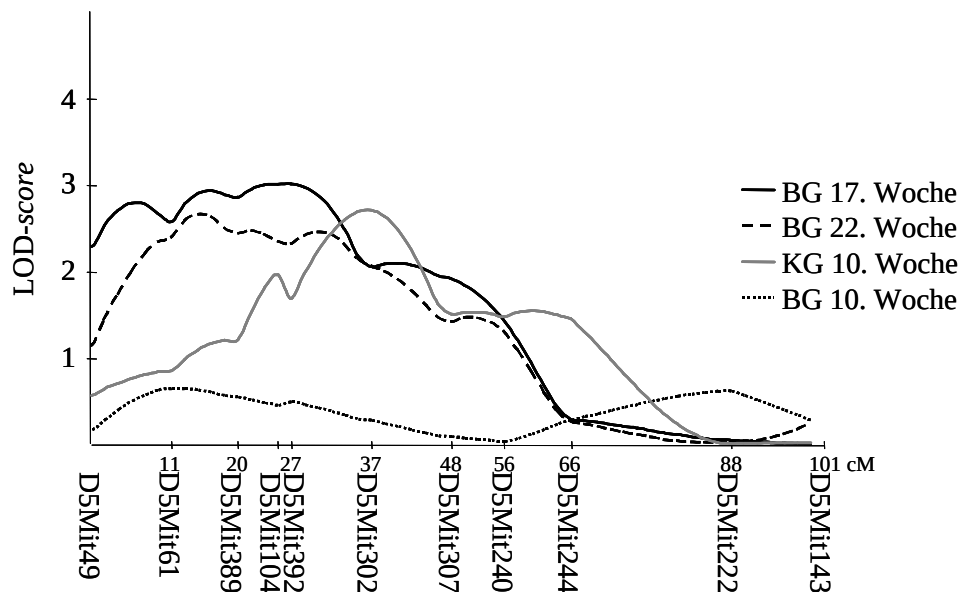
Der so identifizierte Suszeptibilitätslocus *Nob1* wurde in einer zweiten Kreuzung bestätigt. Der maximale LOD-score für BMI und Körpergewicht in den weiblichen und nicht-diabetischen NSZO-Population lag bei dem Marker D5Mit302, der ca. 8 cM distal von

D5Mit392 auf dem Chromosom 5 liegt (s. Abb. 3.6, S.31). Nach Auswertung der Daten aus den beiden unabhängigen Versuchsansätzen ergab sich in einer gemischten Population aus 476 Tieren ein maximaler LOD-score von 11.4 für BMI (Daten nicht gezeigt). *Nob1* kann somit auf einen Bereich von ca. 24 cM zwischen den Markern D5Mit389 und D5Mit307 eingegrenzt werden.



**Abb. 3.6 Verteilung der LOD-score Quotienten für Körpergewicht und BMI auf dem Chromosom 5 der Maus in den weiblichen NSZO-Tieren der zweiten Kreuzung bei fettreicher Diät (n=169).** Daten wurden mit Mapmaker/EXP und Mapmaker/QTL erhoben.

Zusätzlich zu der adipogenen Wirkung von *Nob1* und der damit assoziierten Insulinresistenz lassen sich in der männlichen NZOxF1(SJLxNZO)-Generation, neben dem Effekt auf Körpergewicht in der 10. Woche, signifikante LOD-scores für Blutglucose ab der 12. Woche nahe dem Adipositas-Locus *Nob1* detektieren. Die maximalen LOD-scores für Blutglucose liegen ca. 28 cM proximal von *Nob1* (s. Abb. 3.7, S.32). Dieser Effekt konnte in keiner der weiteren Kreuzungen bestätigt werden. Nach Ausschluss der Träger des in diesem Modell identifizierten diabetogenen *Nidd/SJL*-Allels ist dieser Effekt deutlich verringert. Lediglich in der 22. Woche zeigt sich im Vergleich zu den heterozygoten Tieren ein leicht erhöhter Blutglucosewert der homozygoten Tiere ( $11.8 \pm 5.1$  mM vs.  $15.6 \pm 7.7$  mM,  $p=0.0040$ ). Wahrscheinlich handelt es sich um einen indirekten *Nob1*-Effekt, der durch interaktive Effekte mit dem Diabetes-Locus *Nidd/SJL* und anderen nicht identifizierten Diabetes-Genen bedingt ist.



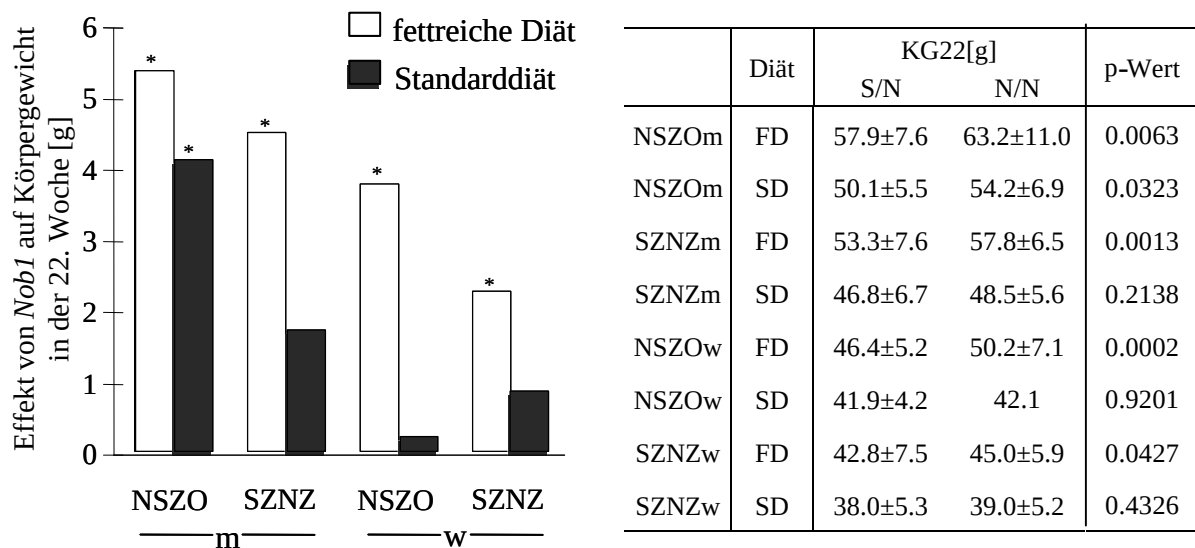
**Abb. 3.7 Verteilung der LOD-score Quotienten für Blut-Glucose und Körpergewicht** auf dem Chromosom 5 der Maus in den NSZO-Männchen der zweiten Kreuzung (n=176). Analyse mit Mapmaker/EXP und Mapmaker/QTL.

### 3.3.2 Einfluss der Diät auf die Effekte von *Nob1*

Um die Abhängigkeit des Adipositas-QTL *Nob1* von dem Fettgehalt der Diät zu untersuchen, wurde die Wirkung in einer Gruppe mit Standard-Diät ernährten Tiere der zweiten Kreuzung untersucht. Bei Standard-Diät-Bedingungen zeigte sich ein abgeschwächter bis nicht vorhandener Effekt von *Nob1* (s. Abb. 3.8, S.33). Lediglich für die männliche NZOxF1 (SJLxNZO)- Population ergaben sich signifikante Körpergewichtseffekte von *Nob1*. Eine Hyperphagie verbunden mit einem hohen Körpergewicht scheint somit ebenso wie die fettreiche Diät zu einer Verstärkung des *Nob1*-Effektes zu führen. In den übrigen mit Standard-Diät ernährten Rückkreuzungen konnte kein Einfluss (LOD score <2) von *Nob1* auf Körpergewicht und Insulin nachgewiesen werden. Das Ausmaß des absoluten *Nob1*-Effektes auf das Körpergewicht korreliert zwar mit dem mittleren Körpergewicht der jeweiligen Rückkreuzung ( $R^2=0.843$ ). Der fehlende Effekt von *Nob1* bei der Standardernährung ist jedoch nicht alleine durch die niedrigeren mittleren Körpergewichte zu erklären. Bei gleichen mittleren Körpergewichten der fettreich ernährten weiblichen NSZO- und der mit Standard-Diät ernährten männlichen SZNZ-Population ( $48.3 \pm 6.6$  g bzw.  $47.8 \pm 6.1$  g,  $p=0.3883$ ), ist ein *Nob1*-Effekt bei den fettreich ernährten Tieren, jedoch nicht bei den mit Standard-Diät ernährten Tieren nachweisbar. Die Wirkung von *Nob1* ist somit abhängig von dem Fettgehalt



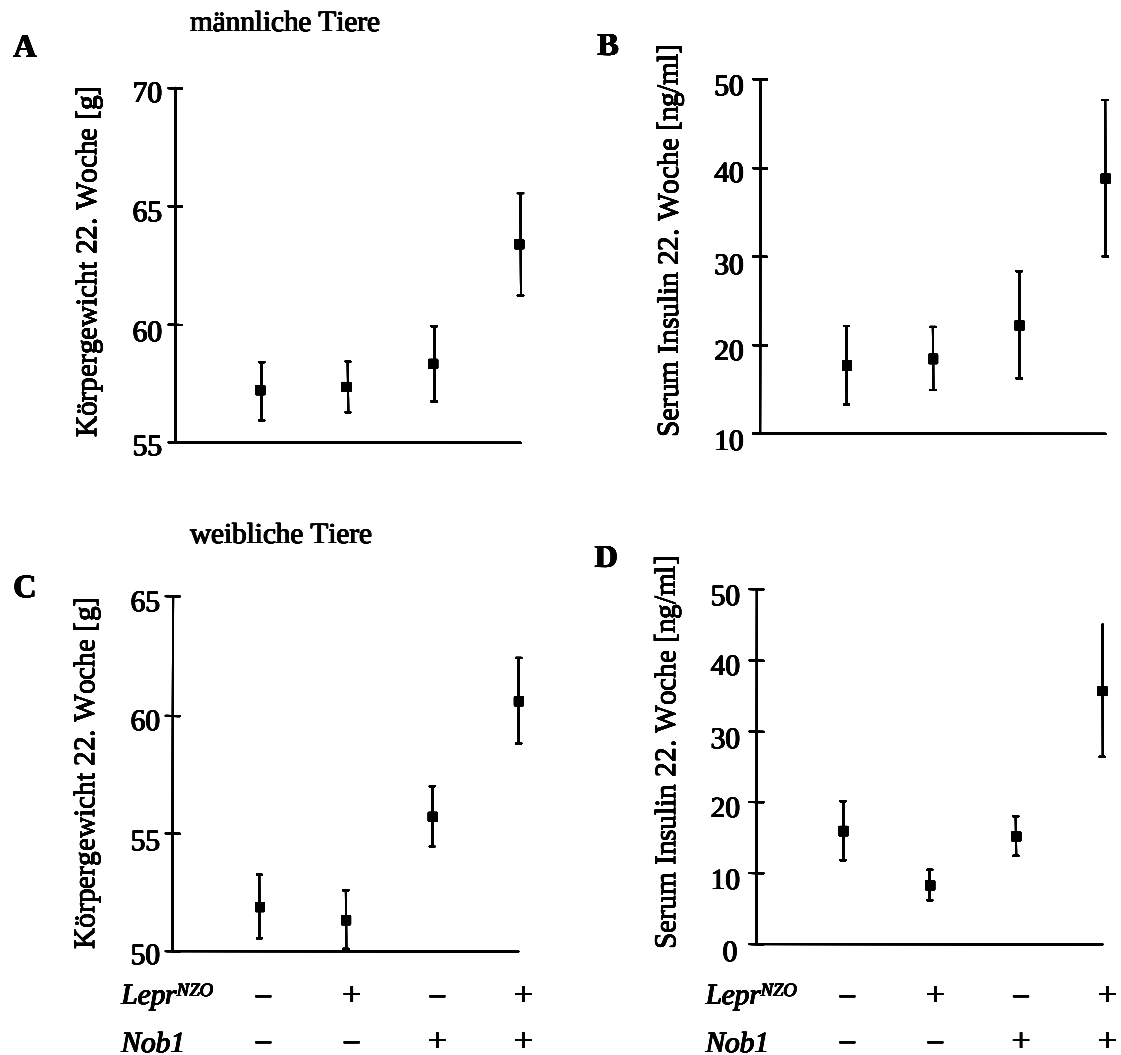
der Diät. Der Effekt der fettreichen Diät kann durch eine hohe Futteraufnahme und entsprechende Gewichtszunahme ersetzt werden.



**Abb. 3.8 Effekt von *Nob1* auf Körpergewicht in der 22. Woche** in nicht-diabetischen männlichen und weiblichen NSZO- und SZNZ-Rückkreuzungen bei Standard- und fettreicher Ernährung. Dargestellt ist jeweils die Differenz der Mittelwerte (=Effekt) zwischen den homozygoten und den heterozygoten *Nob1*-Allelträger. Ein signifikanter *Nob1*-Effekt ( $p \leq 0.05$ ) für die jeweilige Population ist durch ein \* symbolisiert. Mittelwerte, Standardabweichungen und die exakten p-Werte sind der nebenstehenden Tabelle zu entnehmen.

### 3.3.3 Interaktion von *Nob1* mit der Leptinrezeptorvariante *Lepr*<sup>NZO</sup>

Um den Effekt der Leptinrezeptorvariante der NZO-Maus auf die Entwicklung und Ausprägung des Adipositas-Syndroms aufzuklären, wurden die Rückkreuzungstiere für den *Lepr*-Locus genotypisiert. Es ergab sich für die weiblichen Tiere kein alleiniger signifikanter Effekt des varianten *Lepr*<sup>NZO</sup>-Allels auf Körpergewicht und Serum-Insulin. Die homozygoten männlichen Tiere zeigen in der 22. Lebenswoche ein höheres Körpergewicht als die heterozygoten *Lepr*-Allelträger. Dieser Effekt ist jedoch wahrscheinlich durch den benachbart liegenden Diabetes-Locus *Nidd/SJL* bedingt, da bei den heterozygoten Tieren von einer krankheitsbedingten Körpergewichtsabnahme ausgegangen werden muss. Betrachtet man nur die nicht-diabetischen männlichen Tiere lässt sich kein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen den beiden Genotypgruppen mehr nachweisen (s. Abb. 3.9, S.34). Lediglich für die nicht-diabetischen männlichen SZNZ-Tiere, die bei Standard-Diät gehalten wurden, zeigt sich ein statistisch auffälliger Effekt von *Lepr*<sup>NZO</sup> auf das Körpergewicht (KG22: 45.3±4.7 g vs. 50.7±6.3 g,  $p=0.04$ ).



**Abb. 3.9 Verstärkung des *Nob1*-Effektes auf Körpergewicht (A,C) und Serum Insulin (B,D) durch den *Lepr*-Locus bei fettreicher Diät.** Anhand des Genotyps bei *Lepr* und *Nob1* wurden die fettreich ernährten weiblichen (C,D) und nicht-diabetischen männlichen (A,B) NSZO-Tiere in vier Gruppen aufgeteilt und die jeweiligen Mittelwerte für Körpergewicht und Serum Insulin bestimmt (Mittelwert $\pm$ Standardfehler). +, Homozygotie; -, Heterozygotie für den jeweiligen Locus. Die exakten Mittelwerte, Standardabweichungen und Ergebnisse der Varianzanalyse sind in Tab. 3.4, S.37 zusammengestellt.

*Lepr<sup>NZO</sup>* verstärkt jedoch den Effekt von *Nob1* auf Körpergewicht und Serum-Insulin der weiblichen und männlichen Tiere (s. Abb. 3.9, S.34). Die an beiden Loci für das NZO-Allel homozygoten Tiere (*Lepr<sup>NZO</sup>* N/N und *Nob1* N/N) haben ein 6-9 g höheres Körpergewicht in der 22. Lebenswoche und 2-fach höhere Serum-Insuline als die doppelt heterozygoten Tiere (*Lepr<sup>NZO</sup>* S/N und *Nob1* S/N). Bei Standard-Diät-Bedingungen ist die Interaktion von *Nob1* mit dem varianten Leptinrezeptor-Allel auf die nicht-diabetischen männlichen Tiere der NSZO-Rückkreuzung beschränkt (KG22: *Nob1*: 52.5 $\pm$ 8.1 g vs. *Nob1+Lepr<sup>NZO</sup>*: 56.4 $\pm$ 4.6 g). Der Effekt ist jedoch nicht signifikant (p=0.2).

**Tab. 3.4 Additive Effekte von *Lepr*<sup>NZO</sup> und *Nob1***  
**a) nicht-diabetische männliche NSZO-Tiere der zweiten Kreuzung**

| Genotypen                             |          | n      | Merkmal  |          |                         |             |              |          |
|---------------------------------------|----------|--------|----------|----------|-------------------------|-------------|--------------|----------|
| D4Mit175                              | D5Mit302 |        | KG12 [g] | KG22 [g] | BMI[g/cm <sup>2</sup> ] | IRI10ng/ml] | IRI22[ng/ml] | PG[mM]   |
| N/N (+)                               | N/N (+)  | 26     | 44.7±4.9 | 60.6±9.3 | 0.44±0.05               | -           | 35.7±43.4    | 11.7±4.0 |
| N/N (+)                               | S/N (-)  | 32     | 39.1±5.7 | 51.3±7.1 | 0.39±0.04               | -           | 8.4±14.0     | 10.0±4.0 |
| S/N (-)                               | N/N (+)  | 35     | 42.0±5.9 | 55.7±7.6 | 0.43±0.04               | -           | 15.3±17.1    | 12.3±5.4 |
| S/N (-)                               | S/N (-)  | 40     | 40.0±6.0 | 51.9±8.5 | 0.40±0.05               | -           | 16.0±28.9    | 11.1±3.6 |
| einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) |          | p-Wert | 0.0013   | <0.0001  | <0.0001                 | -           | 0.0024       | 0.1805   |

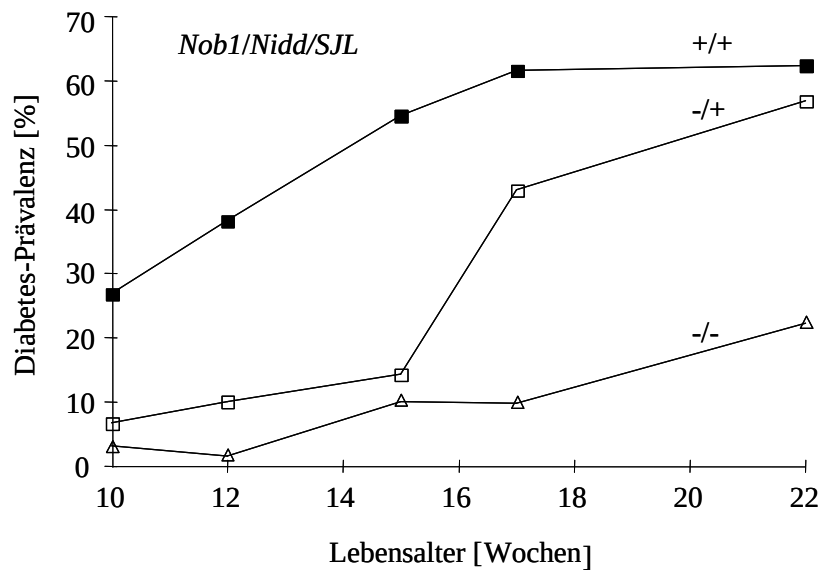
**b) weibliche NSZO-Tiere der ersten Kreuzung**

| Genotypen                             |          | n      | Merkmal  |           |                         |             |              |          |
|---------------------------------------|----------|--------|----------|-----------|-------------------------|-------------|--------------|----------|
| D4Mit175                              | D5Mit302 |        | KG12 [g] | KG22 [g]  | BMI[g/cm <sup>2</sup> ] | IRI10ng/ml] | IRI22[ng/ml] | PG[mM]   |
| N/N (+)                               | N/N (+)  | 30     | 47.8±7.2 | 63.4±11.8 | 0.47±0.07               | 9.2±1.0     | 38.9±48.4    | 12.3±3.9 |
| N/N (+)                               | S/N (-)  | 40     | 45.4±4.1 | 57.4±6.8  | 0.44±0.04               | 4.5±5.8     | 18.5±22.5    | 12.3±5.0 |
| S/N (-)                               | N/N (+)  | 14     | 46.5±4.9 | 58.3±6.0  | 0.44±0.04               | 4.6±2.2     | 22.3±22.7    | 13.0±6.0 |
| S/N (-)                               | S/N (-)  | 19     | 46.7±3.9 | 57.2±5.4  | 0.43±0.03               | 3.3±3.3     | 17.8±19.2    | 12.7±5.6 |
| einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) |          | p-Wert | 0.0622   | 0.0019    | 0.0015                  | 0.0053      | 0.0154       | 0.6762   |

Mittelwert ± Standardabweichung, S/N heterozygot für das NZO-Allel, N/N homozygot für das NZO-Allel.

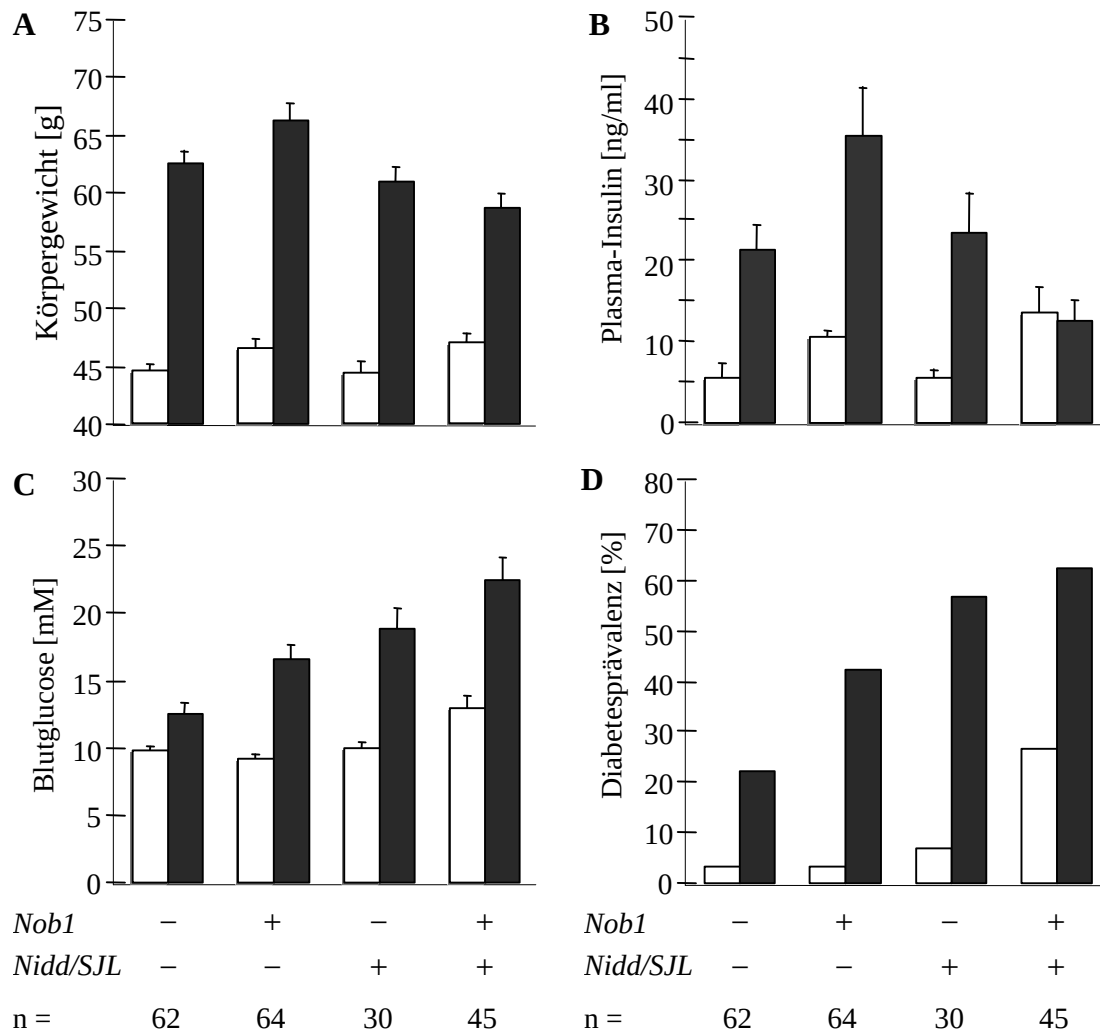
### 3.3.4 Interaktion von *Nob1* mit *Nidd/SJL*

Neben dem Adipositas-QTL *Nob1* konnte in dem NZO-Modell ein Suszeptibilitätslocus für Hyperglykämie und Inselzellversagen (*Nidd/SJL*) auf Chromosom 4 identifiziert werden (Plum, 2002). Das krankmachende Allel stammt interessanterweise von dem SJL-Genom. *Nidd/SJL* ist zwischen den Markern D4Mit278 und D4Mit203 lokalisiert. In diesem Bereich befinden sich wahrscheinlich mehrerer Gene, die für die phänotypische Ausprägung des QTL verantwortlich sind. Die heterozygoten *Nidd/SJL*-Träger zeigen eine deutliche Hyperglykämie und Hypoinsulinämie, jedoch keine frühe Adipositas oder Hyperinsulinämie/Insulinresistenz. Eine signifikante Reduktion des relativen Inselzellvolumens und des Insulingehaltes der Beta-Zellen wurde lichtmikroskopisch bzw. immunhistologisch nachgewiesen.



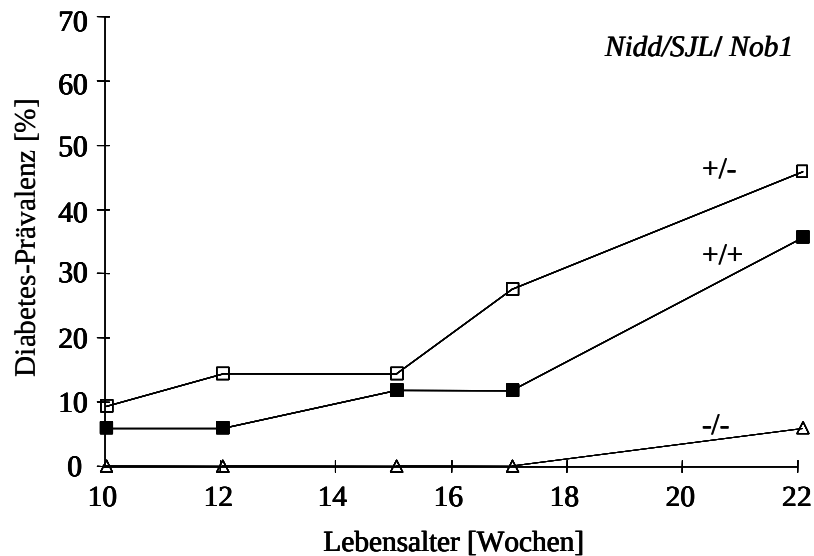
**Abb. 3.10 Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Diabetes-Prävalenz (BG  $\geq 17$  mM) in fettreich ernährten männlichen NSZO-Tieren.** Die Tiere sind anhand des Genotyps bei *Nob1* (+, homozygot bei D5Mit392; -, heterozygot bei D5Mit392) und *Nidd/SJL* (+, heterozygot bei D4Mit278 und D4Mit203; -, homozygot bei D4Mit278 und D4Mit203) in Gruppen aufgeteilt.

Bei der weiteren Charakterisierung der beiden Suszeptibilitätsloci zeigte sich eine Interaktion von *Nob1* mit *Nidd/SJL*. *Nob1* führt in Kombination mit *Nidd/SJL* zu einer schwereren Ausprägung des diabetischen Krankheitsbildes in den Rückkreuzungspopulationen. *Nob1* erhöht die Diabetes-Prävalenz in der 22. Woche zwar nur geringfügig, Tiere, die beide Loci (*Nidd/SJL* und *Nob1*) tragen, erkranken jedoch zu einem früheren Zeitpunkt (s. Abb. 3.10, S.36) und weisen in der 22. Woche eine schwerere Hypoinsulinämie und Hyperglykämie auf (s. Abb. 3.11, S.37). Weiterhin zeigen die Träger beider Loci krankheitsbedingt ein signifikant geringeres Körpergewicht in der 22. Woche.



**Abb. 3.11 Interaktion von *Nob1* mit dem Diabetes-QTL *Nidd/SJL*.** Die 201 männlichen NSZO-Tiere wurden hinsichtlich des Genotyps für *Nob1* (+, homozygot bei D5Mit392) und *Nidd/SJL* (+, heterozygot bei D4Mit278 und D4Mit203) in vier Gruppen aufgeteilt. Graphisch dargestellt sind phänotypische Merkmale (Mittelwert±Standardfehler) der 10.(helle Balken) und der 22. Woche (dunkle Balken). A Körpergewicht in der 10./22. Woche als Marker für frühe Adipositas/krankheitsbedingt geringeres Körpergewicht. B Insulinwerte der 10./22. Woche als Parameter für frühe Insulinresistenz/Inselzellversagen. C Blutglucose in der 10./22. Woche. D Diabetes-Prävalenz (Hyperglykämie  $\geq 16$  mM).

Bei Standard-Diät ist eine Verstärkung der diabetogenen Wirkung des QTL *Nidd/SJL* durch *Nob1* nicht mehr nachweisbar. Weder der Schweregrad des diabetischen Krankheitsbildes, gekennzeichnet durch den Erkrankungsbeginn und das Ausmaß des Inselzellversagens (Grad der Hyperglykämie und Hypoinsulinämie) ist aggraviert, noch ist eine Erhöhung der Diabetes-Prävalenz zu beobachten (s. Abb. 3.12, S.38). Eine fettreiche Ernährung ist somit grundlegend für die Interaktion der beiden Loci.



**Abb. 3.12 Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Diabetes-Prävalenz (BG  $\geq 17$  mM) in einer Gruppe Standard-Diät ernährter männlicher NSZO-Tiere.** Die Tiere sind anhand des Genotyps bei *Nob1* (+, homozygot bei D5Mit392; -, heterozygot bei D5Mit392) und *Nidd/SJL* (+, heterozygot bei D4Mit278 und D4Mit203; -, homozygot bei D4Mit278 und D4Mit203) in Gruppen aufgeteilt.

### 3.4 Identifizierung eines Suszeptibilitätslocus für Hypercholesterinämie (*Chol1/NZO*) auf dem distalen Chromosom 5

Ein Suszeptibilitätslocus für Hypercholesterinämie (*Chol1/NZO*) konnte bei der genomweiten Suche auf dem distalen Chromosom 5 identifiziert werden. *Chol1/NZO* liegt 69 cM distal vom Centromer nahe dem Marker D5Mit244. Dieser QTL für Hypercholesterinämie ist von *Nob1* abzugrenzen, welcher sich ca. 40 cM weiter proximal auf Chromosom 5 befindet. Homozygote Träger des NZO-Allels weisen signifikant höhere Plasma-Cholesterinwerte auf als die heterozygoten Allelträger ( $3.90 \pm 0.41$  mM vs.  $3.47 \pm 0.59$  mM,  $p < 0.0001$ ). Ein maximaler LOD-score von 13.5 ergibt sich für Plasma-Cholesterin in einer fettreich ernährten Populationen aus männlichen und weiblichen Tieren ( $n=585$ , Abb. 3.13). *Chol1/NZO* ist nicht assoziiert mit Adipositas, Hyperinsulinämie oder Hyperglykämie. Im Gegensatz zu *Nob1* ist der Effekt von *Chol1/NZO* unabhängig von der Diät. So führt die fettreiche Diät zwar im Vergleich zur Standardernährung zu deutlich erhöhten Plasma-Cholesterinwerten (z.B.  $3.7 \pm 0.5$  mM vs.  $2.9 \pm 0.5$  mM,  $p < 0.0001$ , s. Tab. 3.2, Anhang), der absolute Effekt von *Chol1/NZO* ist jedoch sowohl bei fettreicher Diät als auch bei Standard-Diät in gleichem Maße ausgeprägt (s. Tab. 3.5, Anhang). Es wurden keine Interaktionen von *Chol1/NZO* mit anderen QTL gefunden.

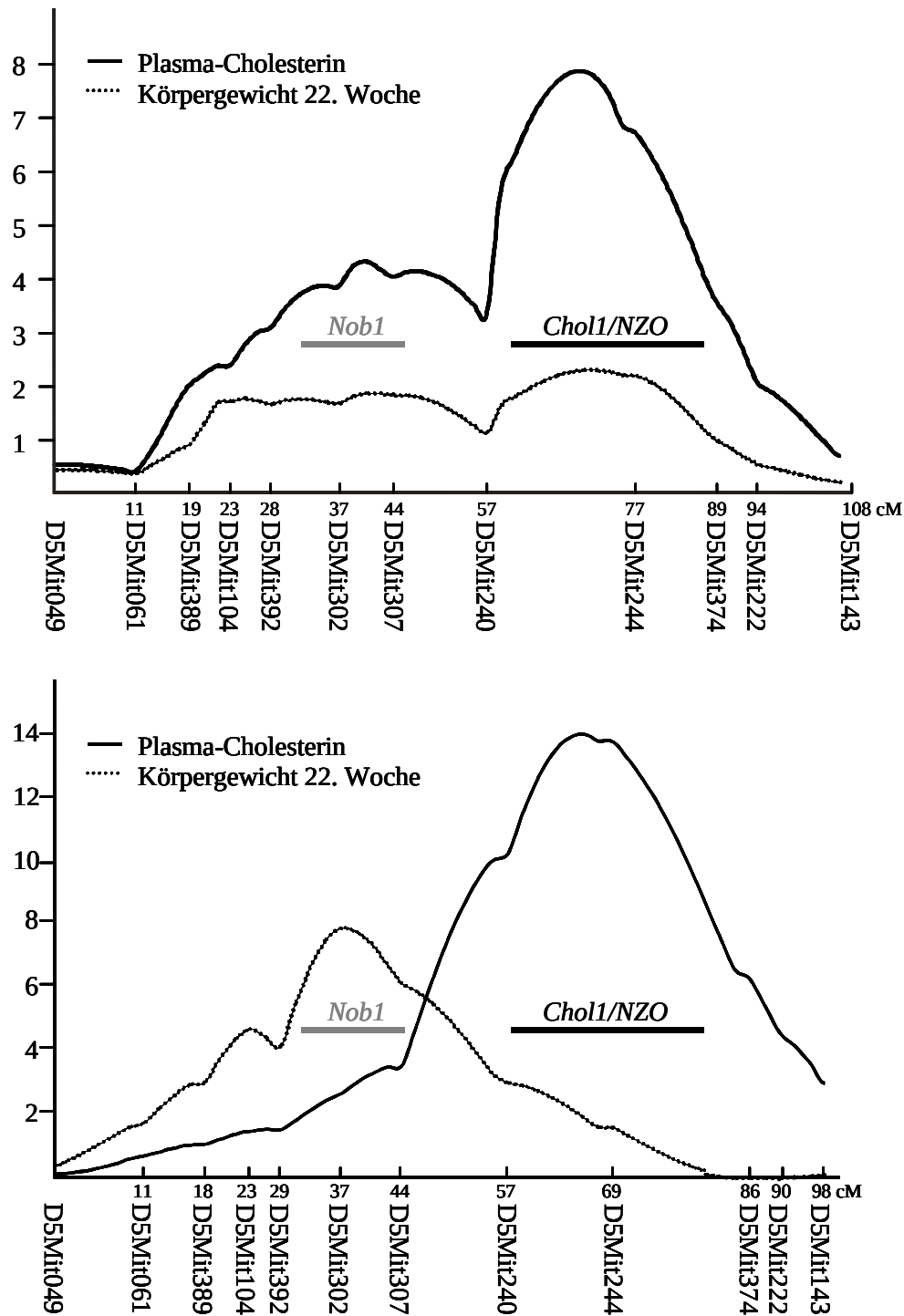


Abb. 3.13 Verteilung der LOD-scores für Körpergewicht und Cholesterin in der 22. Lebenswoche auf dem Chromosom 5 der Maus. Die Daten wurden in einer gemischten NSZO-Population bei Standard-Diät (A, n=297) und fettreicher Diät (B, n=585). Die Körpergewichts- und Cholesterin-Daten der männlichen Tiere wurden durch Subtraktion der Differenz zwischen den Mittelwerten der männlichen und weiblichen Tiere korrigiert.

### 3.5 Identifizierung von kleineren Suszeptibilitätsloci für Adipositas und Dyslipidämie

Bei der genomweiten Suche nach QTL für Adipositas, Hyperinsulinämie und Dyslipidämie ergaben sich neben den bereits beschriebenen Suszeptibilitätsloci *Nob1* und *Chol1/NZO* weitere QTL, die geringere Effekte und eine niedrigere Penetranz zeigten. Diese Loci scheinen in besonderem Maße von nicht-kontrollierten, diskreten Umwelteinflüssen abhängig zu sein. Eine tabellarische Auflistung zeigt die Lokalisation und die Effekte dieser suggestiven Adipositas-QTL (s. Tab. 3.6, S.43). Im folgenden wird der QTL auf Chromosom 19 genauer dargestellt.

Die Daten der ersten Kreuzung legten nahe, dass sich auf Chromosom 19 eine QTL für Hyperinsulinämie und Körpergewicht in der Nähe des Markers D19Mit91 (44 cM) befindet. Dieser QTL wurde *Nob2* genannt. Es ergaben sich suggestive LOD-scores für BMI (2.1) und Körpergewicht (2.0) in der 22. Lebenswoche. Ein maximaler LOD-score von 3.2 für Plasma-Insulin konnte in einer Population aus 95 weiblichen NSZO-Tiere ermittelt werden. Die homozygoten NZO-Allelträger wiesen ein 3-fach höheres Plasma-Insulin auf als die heterozygoten Tiere. Der LOD-score der Residualwerte für Plasma-Insulin, berechnet anhand der Regression von absolutem Körperfett und Plasma-Insulin, lag bei 2.6. *Nob2* scheint somit unabhängig von dem Effekt auf das Körpergewicht eine Hyperinsulinämie zu bedingen. Die zweite Kreuzung erbrachte keinen Hinweis für ein Kopplungsungleichgewicht bei D19Mit91. *Nob2* konnte nicht bestätigt werden und stellt somit einen suggestiven QTL für Hypercholesterinämie und Adipositas dar.



Tab. 3.6 Weitere QTL für Adipositas

| Marker    | Kreuzung                                     | Merkmal                  | n=  | NN        | SN        | Effekt<br>[g] | p-Wert |
|-----------|----------------------------------------------|--------------------------|-----|-----------|-----------|---------------|--------|
| D1Mit232  | <u>NSZOwSD</u>                               | KG 22 [g]                | 49  | 40.9±4.3  | 44.1±4.4  | 3.2           | 0.0167 |
|           | (SZNZwFD)                                    | BMI [g/cm <sup>2</sup> ] |     | 0.34±0.02 | 0.36±0.02 |               | 0.0100 |
| D3Mit224  | <u>SZNZwFD</u>                               | KG 22 [g]                | 151 | 45.7±6.9  | 42.6±6.3  | 3.1           | 0.0045 |
|           | (NSZOwFD-alt, BCSJL)                         | BMI [g/cm <sup>2</sup> ] |     | 0.38±0.04 | 0.35±0.04 |               | 0.0011 |
| D8Mit8    | <u>NSZOwFD-alt</u>                           | KG 22 [g]                | 125 | 51.5±8.1  | 56.6±8.7  | 5.1           | 0.0011 |
|           | (NSZOmFD, NSZOmSD,<br>NSZOwFD, SZNZmSD)      | BMI [g/cm <sup>2</sup> ] |     | 0.39±0.05 | 0.43±0.07 |               | 0.0002 |
| D11Mit61  | <u>SZNZwSD</u>                               | KG 22 [g]                | 102 | 40.3±5.1  | 36.5±4.8  | 3.8           | 0.0003 |
|           |                                              | BMI [g/cm <sup>2</sup> ] |     | 0.34±0.03 | 0.32±0.03 |               | 0.0020 |
| D12Mit204 | <u>NSZOmSD</u>                               | KG22 [g]                 | 71  | 50.3±6.0  | 54.5±6.1  | 4.2           | 0.0084 |
|           | (SZNZmSD)                                    | BMI [g/cm <sup>2</sup> ] |     | 0.39±0.03 | 0.41±0.03 |               | 0.0095 |
| D15Mit136 | <u>NSZOwSD</u>                               | KG22 [g]                 | 49  | 44.0±4.0  | 40.9±4.7  | 3.1           | 0.0200 |
|           | (NSZOmSD, NSZOwFD-<br>alt, SZNZmSD, SZNZwSD) | BMI [g/cm <sup>2</sup> ] |     | 0.36±0.02 | 0.34±0.02 |               | 0.0095 |
| D17Mit175 | <u>NSZOmSD</u>                               | KG12 [g]                 | 76  | 46.3±5.4  | 43.4±5.0  | 2.9           | 0.0184 |
|           | (SZNZwSD, BCSJL)                             | KG22 [g]                 |     | 52.3±6.5  | 51.4±6.2  | 0.9           | 0.5591 |
| D18Mit60  | <u>BCSJL</u>                                 | KG22 [g]                 | 120 | 36.0±5.5  | 39.0±5.8  | 3.0           | 0.0051 |
|           |                                              | BMI [g/cm <sup>2</sup> ] |     | 0.33±0.04 | 0.35±0.04 |               | 0.0081 |
| D19Mit91  | <u>NSZOwFD-alt</u>                           | KG22 [g]                 | 98  | 56.2±7.5  | 51.8±8.5  | 4.4           | 0.0096 |
|           | (SZNZmSD, SZNZwFD)                           | BMI [g/cm <sup>2</sup> ] |     | 0.42±0.04 | 0.40±0.05 |               | 0.0085 |

Die Bezeichnung alt entspricht der ersten Auflage der Kreuzungen. Die angegebenen Mittelwerte±Standardabweichung beziehen sich auf die unterstrichenen Kreuzungen. In den in Klammern stehenden Kreuzungen sind ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen homozygoten (NN) und heterozygoten (SN) NZO-Allelträgern zu finden.

## 4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit identifiziert einen bedeutenden Suszeptibilitätslocus für Adipositas und Hyperinsulinämie (*Nob1*) und einen Suszeptibilitätslocus für Hypercholesterinämie (*Chol1/NZO*) auf dem Mauschromosom 5. Die beiden krankmachenden Allele stammen von dem NZO-Genom und führen bei homozygotem Vorliegen zur Ausprägung des jeweiligen Phänotyps.

### 4.1 *Nob1*, ein Suszeptibilitätslocus für Adipositas und Hyperinsulinämie

*Nob1* führt zu früh einsetzender Adipositas (ab der 8. Woche) und assoziierter Hyperinsulinämie in der 22. Lebenswoche. Die Wirkung von *Nob1* auf das Körpergewicht ist in den weiblichen und nicht-diabetischen männlichen Tieren ähnlich stark ausgeprägt. Zwei unabhängige Kreuzungen bestätigen den Adipositas-QTL *Nob1*. Der Bereich des maximalen LOD-scores verschiebt sich in der zweiten Kreuzung um 8 cM nach distal. *Nob1* konnte daher nur auf einen Bereich von ca. 20 cM eingegrenzt werden. Möglicherweise ist diese geringfügige Variation in der Lokalisation durch die bei relativ kleiner Tierzahl methodenbedingte Ungenauigkeit einer genetischen Karte verursacht. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in diesem Bereich mehrere Gene liegen, die zu dem beobachteten Phänotyp beitragen und deren Penetranz durch diskret variierende Umweltfaktoren beeinflusst wird. Bei der in der männlichen NSZO-Generation beobachteten hyperglykämischen Wirkung des *Nob1*-Allels handelt es sich wahrscheinlich um eine Interaktion von *Nob1* mit *Nidd/SJL* und weiteren nicht identifizierten Diabetes-Loci. Die Existenz eines in seiner Ausprägung instabilen Diabetes-QTL proximal von *Nob1* kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

#### 4.1.1 Einfluss der Diät und der maternalen Umgebung auf *Nob1*

Der Effekt von *Nob1* auf die Entstehung von Adipositas und Insulinresistenz wird durch exogene Faktoren beeinflusst. So verstärkt eine fettreiche Diät die Wirkung von *Nob1*. In den meisten der fettarm ernährten Tiergruppen lässt sich kein *Nob1*-Effekt nachweisen. Lediglich in der nicht-diabetischen männlichen NSZO-Rückkreuzung weisen die *Nob1* Allelträger einen adipösen Phänotyp auf. Die Diätabhängigkeit von *Nob1* reicht jedoch nicht

aus, um den körpergewichtsteigernden Effekt der fettreichen Diät zu erklären. Es muss also weitere diätabhängige Adipositasgene der NZO-Maus geben, die in diesem Rückkreuzungsmodell nicht identifiziert werden konnten. Von Reifsnyder und Mitarbeitern wurde ein Effekt der maternalen Umgebung auf die Penetranz von Diabetes und Adipositas-QTL beschrieben. Es konnte in Experimenten mit Pflegemüttern gezeigt werden, dass es sich bei diesem Faktor um einen postpartalen Einfluss handelt, die wahrscheinlich durch die Zusammensetzung der Muttermilch bedingt ist (Reifsnyder *et al.*, 2000). Auch in dem von uns untersuchten NZO-Kreuzungsmodell entwickeln Tiere, die von dicken NZO-Müttern aufgezogen wurden, signifikant höhere Körpergewichte und eine ausgeprägtere Hyperinsulinämie als die Nachkommen von SJL- bzw. F1-Muttertieren. Der absolute Effekt des Adipositas-QTL *Nob1* ist jedoch in den Rückkreuzungen auf NZO-Weibchen nur geringfügig größer als in den entsprechenden Kreuzungen mit F1-Muttertieren. Bezogen auf das mittlere Körpergewicht ist der Effekt unabhängig von der maternalen Umgebung. Es scheint daher größtenteils nicht identifizierte Adipositas-Gene zu geben, die von der maternalen Umgebung in ihrer Ausprägung abhängig und somit für den Gewichtsunterschied der reziproken Rückkreuzungen verantwortlich sind.

#### 4.1.2 Interaktion von *Nob1* mit *Lepr*<sup>NZO</sup> und *Nidd/SJL*

Die Aufklärung der genetischen Grundlagen des Adipositassyndroms der NZO-Maus beinhaltete eine Untersuchung der bekannten Leptinrezeptorvariante *Lepr*<sup>A720T/T1044I</sup> der NZO-Maus und deren mögliche adipogene Wirkung (Igel *et al.*, 1997). Es konnte kein spezifischer Effekt dieser Leptinrezeptorvariante auf Körpergewicht und Insulinresistenz der weiblichen Tiere nachgewiesen werden. Der Gewichtsunterschied der für das *Lepr*-Allel homo- bzw. heterozygoten männlichen Tiere ergibt sich durch einen Diabetes-bedingten Gewichtsverlust der für das *Nidd/SJL*-Allel heterozygoten Tiere. Der Diabetes-Locus *Nidd/SJL* befindet sich ca. 10 cM distal des *Lepr*-Locus auf dem Chromosom 4 der Maus. Nach Ausschluss der diabetischen Tiere ist dieser Körpergewichtseffekt nicht mehr vorhanden. Ein Effekt der Leptinrezeptorvariante *Lepr*<sup>A720T/T1044I</sup> auf das Körpergewicht der männlichen Tiere, der durch das Auftreten eines Typ-2-Diabetes maskiert wird, kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. In weiteren Analysen wurde eine Interaktion von *Nob1* und dem *Lepr*-Locus hinsichtlich der Entwicklung einer Adipositas und Insulinresistenz deutlich. Die homozygoten Träger beider Allele zeichneten sich durch ein signifikant höheres Körpergewicht und eine ausgeprägtere Hyperinsulinämie aus. Dies gilt in gleichem Maße für die weiblichen und

nicht-diabetischen männlichen Tiere. Um zu einer phänotypischen Ausprägung zu gelangen, erfordert der *Lepr*-Locus anscheinend einen bestimmten Adipositas-induzierenden genetischen Hintergrund, zu dem der *Nob1*-Locus gehört. Diese Verstärkung des *Nob1*-Effektes durch den *Lepr*-Locus legt nahe, dass die verantwortlichen Gene in einem gemeinsamen Regelkreis zur Kontrolle des Körpergewichtes und der Insulinsensitivität mitwirken.

Die Bedeutung der durch *Nob1* verursachten Adipositas für die Entstehung eines Typ-2-Diabetes in den männlichen Rückkreuzungstieren wurde durch Interaktionsanalysen des Adipositas-Locus mit dem Diabetes-QTL *Nidd/SJL* aufgeklärt. So wurde der diabetogene Effekt des *Nidd/SJL*-Allels durch den Adipositas- und Hyperinsulinämie- QTL *Nob1* beschleunigt und verstärkt. Dieser Effekt ist abhängig von einer fettreichen Diät. Zusammen waren die Loci für über 90% der Diabetes-Prävalenz verantwortlich. Die durch *Nob1* hervorgerufene, adipositasassoziierte Insulinresistenz wird durch eine kompensatorische Hyperinsulinämie ausgeglichen. Zu einer Dekompensation des Glucosestoffwechsels mit der Manifestation eines Typ-2-Diabetes mellitus kommt es bei Vorliegen von *Nidd/SJL* durch ein Betazellversagen der Langerhans-Inseln mit unzureichender Insulinproduktion. Diese Befunde bestärken die Theorie, dass die Entstehung eines Typ-2-Diabetes mellitus im Mausmodell durch die Kombination von Adipositas- und Diabetesgenen bedingt ist („diabesity“).

#### 4.1.3 *Nob1* und weitere in der Literatur beschriebene Suszeptibilitätsloci für Adipositas auf dem Mauschromosom 5

Nach Veröffentlichung meiner Daten wurde ein mit *Nob1* überlappender Adipositas-QTL in einer NZO-Kreuzung beschrieben (s. Abb. 4.1): *Obq 12* in einem Intercross der NZO- und der SM (*small mouse*)-Maus mit maximalen LOD-scores bei D5Mit233 lokalisiert (29 cM vom Centromer entfernt, maximaler LOD-score 4.7; Taylor *et al.*, 2001). Ein suggestiver QTL wurde bei 28 cM in der Nähe des Markers D5Mit81 in einer Rückkreuzung aus NZO- und NON (*Nonobese Nondiabetic*)-Tieren identifiziert (maximaler LOD-score 2.8; Reifsnyder *et al.*, 2000). Wahrscheinlich liegt allen o.g. QTL das gleiche NZO-Allel zugrunde; damit wurde der in der vorliegenden Arbeit gefundene QTL *Nob1* in anderen Kreuzungen bestätigt. Das Auffinden dieses Allels in mehreren unabhängigen Kreuzungen unterstreicht zudem seine Bedeutung für die Entwicklung der Adipositas der NZO-Maus.

Beide Arbeitsgruppen berichten in den genannten Kreuzungsmodellen von weiteren Suszeptibilitätsloci für Adipositas auf dem Chromosom 5 der Maus außerhalb der *Nob1*-Region bei D5Mit180 (*Obq 11*; 10 cM von dem Centromer entfernt, maximaler LOD-score 4.3; Taylor *et al.*, 2001) und bei D5Mit7 (45 cM vom Centromer entfernt, maximaler LOD-score 3.9; Reifsnyder *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit ergaben sich für Marker, die in unmittelbarer Umgebung dieser QTL liegen (D5Mit61 und respektive D5Mit259), für die 133 weiblichen NSZO-Tiere der ersten Kreuzung keine signifikanten LOD-scores (LOD-scores <2; s. Abb. 3.5, S.30). In der Gruppe der weiblichen NSZO-Tiere der zweiten Kreuzung wurden suggestive LOD-scores zwischen 2 und 3 für Körpergewicht in der 22. Lebenswoche und BMI für den Bereich um D5Mit7 (zwischen D5Mit307 und D5Mit240) erhoben. Die maximalen LOD-score Werte liegen jedoch ca. 10 cM weiter proximal bei D5Mit302 (s. Abb. 3.6, S.31). Bei den von Reifsnyder und Taylor beschriebenen QTL handelt es sich daher wahrscheinlich um von *Nob1* distinkte Suszeptibilitätsloci. Es gibt jedoch auch in der von uns untersuchten NZO-Rückkreuzung Hinweise für das Vorliegen des QTL für Adipositas bei D5Mit7 (Reifsnyder *et al.*, 2000).

#### 4.1.4 Bedeutung von *Nob1* für die Körpergewichtsregulation bei verschiedenen Mausstämmen

Möglicherweise ist das *Nob1* verursachende Gen nicht nur für die Adipositasentwicklung der NZO-Maus sondern auch für andere Stämme von Bedeutung. So konnte in einem F2-Intercross aus einem Auszuchtstamm mit hohem Körpergewicht, DU6 mit einem Kontrollstamm (DUK) ein QTL für Körpergewicht in der 8. Woche bei 42 cM auf dem Chromosom 5 der Maus entdeckt werden (Brockman *et al.*, 1998). Ein weiterer, rezessiv vererbter QTL für Körpergewicht in der 8. Woche wurde in einer adipösen F2-Generation eines Intercross aus dünnen BALB/cJ-Weibchen und Leptin-behandelten, männlichen C57BL/6J *ob/ob* bei D5Mit271 lokalisiert (44 cM, Ewart-Toland *et al.*, 1999). Ein Körperfettgehalt beeinflussender Locus wurde in einem F2-Intercross (C57BL/6J hg/hg x CAST/EiJ) bei 38 cM identifiziert (Corva *et al.*, 2001). Es besteht die Möglichkeit, dass allen genannten QTL ein identisches, variantes Gen zugrunde liegt. Dieses Gen würde somit eine bedeutende Rolle bei der Körpergewichtsregulation verschiedener Mausstämmen spielen. Die Bedeutung dieses Gens für die Regulation des menschlichen Körpergewichtes ist jedoch noch unklar.

#### 4.1.5 Kandidatengene für *Nob1*

In der *Nob1*-Region befinden sich ungefähr 120 bekannte Gene (s. Abb. 4.1, Anhang). Ohne weitere Daten zur Charakterisierung des metabolischen Effektes des *Nob1*-Allels kann zur Zeit nur über die verantwortlichen Gene spekuliert werden. Die Verstärkung des *Nob1*-Effektes durch eine fettreiche Diät könnte auf eine Beteiligung am Lipidstoffwechsel hindeuten. Neben zahlreichen Transkriptionsfaktoren und anderen Genprodukten, deren Bedeutung für die Körpergewichtsregulation unklar ist, liegen in dem verantwortlichen Bereich Gene, die bereits mit der Entwicklung von Adipositas in Verbindung gebracht wurden. So befinden sich die Gene für Urocortin (*Ucn*; Delplanque *et al.*, 2002; Kastin *et al.*, 2002), Adducin 1 (*Add1*; Ribot *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2003), Hepatozyten-Wachstumsfaktor Coaktivator (*Hgfac*; Rehman *et al.*, 2003), Pristanoyl (*Acox3*; Reddy und Hashimoto, 2001), Peroxisomen Proliferator aktivierter Rezeptor Rezeptor Coaktivator 1 (*Pgc1*; Patti *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2003; Puigserver und Spiegelman, 2003; Esterbauer *et al.*, 2002), Cholezystokinin A Rezeptor (*Cckar*; Inoue *et al.*, 1997; Takiguchi *et al.*, 1998; Takata *et al.*, 2002), Neuromedin (*Nmu*; Howard *et al.*, 2000; Ivanov *et al.*, 2002) in diesem Chromosomenabschnitt.

### 4.2 *Chol1/NZO*, ein Suszeptibilitätslocus für Hypercholesterinämie

Der Suszeptibilitätslocus *Chol1/NZO* ist verantwortlich für einen Großteil der Cholesterinerhöhung der NZO-Maus. Das Gesamt-Cholesterin der homozygoten Allelträger ist in gleichem Maße bei weiblichen und männlichen Tieren signifikant erhöht. Obwohl Tiere, die eine fettreiche Diät erhalten, ein deutlich höheres Cholesterin zeigen als die jeweiligen mit Standard-Diät ernährten Tiere, ist der absolute *Chol1/NZO* Effekt von dem Fettgehalt der Nahrung unbeeinflusst. Die Wirkung von *Chol1/NZO* ist somit unabhängig von der Diät und dem Geschlecht. Da jedoch sowohl das männliche Geschlecht als auch eine fettreiche Diät zu einem erhöhten Plasma-Cholesterin der NZO-Tiere führen, scheint es zusätzlich zu *Chol1/NZO* diät- und geschlechtsabhängige QTL zu geben.

#### 4.2.1 *Chol1/NZO* und weitere in der Literatur beschriebene Suszeptibilitätsloci für Hypercholesterinämie auf dem Mausechromosom 5

*Chol1/NZO* liegt in der Nähe des kürzlich identifizierten QTL *Hdlq1* für erhöhtes HDL- und Gesamt-Cholesterin, der in einer Rückkreuzung aus NZB- und SM/J-Mäusen

identifiziert wurde (Pitman *et al.*, 2002). *Hdlq1* liegt ca. 3 cM proximal von *Nob1* auf dem Chromosom 5 der Maus bei dem Marker D5Mit370 (66cM von dem Centromer entfernt, maximaler LOD-score 2.7). In einer F2-Generation der gleichen Parentalstämme konnten bereits Purcell-Huynh und Mitarbeiter einen HDL- und Gesamt-Cholesterin steigernden Effekt des NZB-Alleles feststellen (Purcell-Huynh *et al.*, 1995). Wahrscheinlich ist dieser QTL mit *Hdlq1* identisch. Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades des NZB- und NZO-Stammes, die beide aus einer gemischten Kolonie unter Fixierung der schwarzen Fellfarbe bzw. der Adipositas ingezüchtet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um ein den Stämmen NZB und NZO gemeinsames Allel handelt.

In der (SM x NZB) x NZB Rückkreuzung wurde ein zweiter QTL für Hypercholesterinämie auf dem Chromosom 5 bei D5Mit239 entdeckt (*Hdlq2*, 42 cM, maximaler LOD-score 3.6, Pitman *et al.*, 2002). In diesem Bereich, der sich mit dem Adipositas-QTL *Nob1* überschneidet, wurde in unserer Studie ein Kopplungsungleichgewicht besonders für die mit Standard-Diät ernährten Tiere gefunden. Möglicherweise gibt es proximal von *Chol1/NZO* einen weiteren Suszeptibilitätslocus für Hypercholesterinämie auf dem Chromosom 5.

In anderen Maustämmen konnten zwei weitere Hypercholesterinämie hervorrufende QTL gefunden werden, deren Ausprägung jedoch von einer fettreichen, atherogenen Diät abhängig waren. Bei D5Mit205 (45 cM) ergab sich ein maximaler LOD-score von 3.4 für HDL-Cholesterin in einem Intercross des C3H- und des B6- Stammes (Machleder *et al.*, 1997). Der in einem Intercross von CAST/Ei- und C57BL/6J- Mäusen identifizierte QTL *Hdlq2* ist ebenfalls mit erhöhten HDL-Cholesterinwerten assoziiert. Der maximale LOD-score von 6.1 für HDL-Cholesterin liegt bei D5Mit10 (45 cM). Aufgrund der unterschiedlichen metabolischen Effekte, die sich in einer alleinigen Erhöhung der HDL-Fraktion und nicht des Gesamt-Cholesterins widerspiegeln, und der Abhängigkeit von einer atherogenen Diät sind diese QTL wahrscheinlich nicht identisch mit *Chol1/NZO*.

#### 4.2.2 Kandidatengene für *Chol1/NZO*

In der *Chol1/NZO*-Region sind mehr als 300 Gene bekannt (UCSC Genome Browser, <http://genome.cse.ucsc.edu>, Karolchik *et al.*, 2003; s. Abb. 4.2, Anhang). Ein mögliches Kandidatengen ist die Mevalonatkinase, die mit der Phosphorylierung des Mevalonats einen

wichtigen Schritt in der Cholesterin-Biosynthese katalysiert (Bonne *et al.*, 2002). Weiterhin liegen einige Gene, die an dem Lipid- und Fettsäure-Metabolismus beteiligt sind, in dem QTL-Bereich, so z.B. die Acetyl CoA Dehydrogenase (Acads), ein Isotyp der Cytochrom C Oxidase (Cox6a1) und eine Phospholipase A2 Isoform (Pla2g1b).

### 4.3 Ausblick

Die beiden identifizierten QTL für Adipositas und Hyperinsulinämie bzw. für Hypercholesterinämie konnten jeweils auf einen Bereich von 24 bzw. 37 cM eingegrenzt werden. Entsprechend liegen mehr als 120 bzw. 300 Gene in den beiden QTL-Regionen. Eine Eingrenzung und eine funktionelle Charakterisierung der Suszeptibilitätsloci durch die Züchtung von kongenen Linien erscheint daher sinnvoll. Der zu untersuchende Chromosomenabschnitt wird dabei fixiert und in einen anderen, gesunden Mausstamm eingekreuzt. Ob und in wie weit die so generierten kongenen Linien den erwarteten NZO-typischen Phänotyp aufweisen, hängt u.a. von der Abhängigkeit der QTL von dem NZO-Hintergrund ab. Da für beide QTL keine für die phänotypische Ausprägung essentiellen Interaktionen nachzuweisen waren, erscheint die Generierung von kongenen Linien eine sinnvolle und erfolgversprechende Weiterführung des Projektes zu sein. Als Ansatz zur Identifizierung der zugrundeliegenden Gene ist sowohl eine Sequenzierung der Kandidatengene als auch eine Expressionsanalyse der bekannten Gene und EST (*Expressed Sequence Tag*) denkbar. Bislang konnten weder in Tiermodellen noch in Analysen des menschlichen Genoms Adipositas- und Diabetes-Gene gefunden werden, die für das polygen bedingte metabolische Syndrom verantwortlich sind. Aufgrund der Stabilität und der Signifikanz der in dieser Arbeit identifizierten QTL erscheint jedoch die Identifikation des *Nob1* und *Chol1/NZO* zugrundeliegenden Adipositas- bzw. Hypercholesterinämie-Gens möglich.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die NZO-Maus entwickelt ein dem menschlichen metabolischen Syndrom ähnliches Krankheitsbild mit Adipositas, Dyslipidämie und Insulinresistenz bzw. Typ-2-Diabetes mellitus. Zur Aufklärung der genetischen Grundlagen wurde ein Rückkreuzungsmodell der NZO-Maus mit der normalgewichtigen SJL-Maus als Kontrollstamm etabliert. Die hinsichtlich der Parameter des metabolischen Syndroms segregierenden Rückkreuzungspopulationen wurden zur genomweiten Suche nach QTL für Adipositas, Hyperglykämie und Dyslipidämie untersucht.

Es konnte ein bedeutender Suszeptibilitätslocus für Adipositas und Hyperinsulinämie auf dem proximalen Anteil des Mauschromosoms 5 identifiziert werden (LOD-score >11). *Nob1* erhöht signifikant das Körpergewicht sowohl der weiblichen als auch der männlichen Tiere. Mit der Adipositas assoziiert ist eine Insulinresistenz der homozygoten NZO-Allelträger. Der adipogene Effekt von *Nob1* wird durch eine fettreiche Diät verstärkt. Es konnten synergistische Effekte von *Nob1* und *Lepr*, der Leptinrezeptorvariante der NZO-Maus, hinsichtlich der Entwicklung einer Adipositas und Insulinresistenz festgestellt werden. Weiterhin spielt *Nob1* eine bedeutende Rolle für die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes mellitus der männlichen Rückkreuzungstiere. *Nob1* verstärkt den diabetogenen Effekt des Diabetes-Locus *Nidd/SJL*. Die in dem NZO-Modell zu beobachtende Dekompensation des Glucosestoffwechsels ist somit durch synergistische Effekte von *Nob1* mit Diabetes-Genen, die zu einem Inselzellversagen führen (*Nidd/SJL*), bedingt.

Ein Suzeptibilitätslocus für Gesamt-Cholesterin konnte 40 cM distal von *Nob1* auf dem Chromosom 5 der Maus lokalisiert werden. *Chol1/NZO* führt unabhängig vom Geschlecht zu einer Hypercholesterinämie der homozygoten NZO-Allelträger (LOD-score >14) ohne weitere Parameter des metabolischen Syndroms zu beeinflussen. Trotz einer deutlichen Erhöhung des Gesamt-Cholesterins durch eine fettreiche Ernährung ist der *Chol1/NZO*-Effekt unabhängig von dem Fettgehalt der Nahrung. Das zugrundeliegende Gen ist vermutlich am Cholesterinstoffwechsel beteiligt.

## 6 ABSTRACT

A backcross model of the obese, hyperglycemic New Zealand obese (NZO) mouse with the lean SJL strain was established in order to locate genes responsible for obesity and the associated syndrome of insulin resistance, hyperglycemia and dyslipidemia, and to compare the effects under a standard and a high fat diet. The pattern of symptoms presented by the NZO mouse closely resembles the human metabolic syndrome, suggesting a common pathophysiology.

A genome wide scan revealed a susceptibility locus for obesity and hyperinsulinemia (*Nob1*) on mouse chromosome 5 in the vicinity of the markers D5Mit392 and D5Mit302. *Nob1* contributed to higher body weight and insulin resistance (LOD-score for BMI > 11). The effect of *Nob1* on body weight and insulin resistance was enhanced by a high fat diet. Although a sole effect of the leptin receptor variant of the NZO mouse (*Lepr*<sup>A720T/T1044I</sup>) on the development of obesity could not be observed, *Lepr*<sup>NZO</sup> significantly contributed to higher body weight in combination with *Nob1*. Furthermore, *Nob1* accelerated and aggravated the development of diabetes in carriers of the diabetogenic *Nidd/SJL* allele. The synergistic effects of the susceptibility locus for hyperglycemia and islet cell failure *Nidd/SJL*, and the obesity locus *Nob1* accounted for 90% of the diabetes observed in the backcross population. The combined effects were dependent on a high dietary fat content. The data indicate that the decompensation of glucose homeostasis in the NZO mouse reflects the synergistic effects of diabetes (*Nidd/SJL*) and obesity genes (*Nob1*).

A susceptibility locus for hypercholesterolemia, but not obesity, insulin resistance or hyperglycemia, was located 44 cM distal from *Nob1* on the mouse chromosome 5 near D5Mit244. Homozygous male and female carriers of the responsible NZO allele exhibited significantly elevated cholesterol levels. Although the cholesterol levels of mice raised on a standard diet were significantly lower compared to animals fed a high fat diet, the absolute effect of *Chol1/NZO* was not altered by the dietary fat content. It is suggested that the responsible gene is involved in the cholesterol metabolism.

---

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Allison DB, Kaprio J, Korkelia M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K: The heretability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20, 501-506, 1996.
2. Azuma K, Katsukawa F, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T: Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obes Res* 11(8), 997-1001, 2003.
3. Barker DJ: The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 301(6761), 1111, 1990.
4. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36(1), 62-67, 1993.
5. Barsh GS, Farooqi IS, O`Rahilly S: Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404, 644-651, 2000.
6. Bielschowsky M, Bielschowsky F: A new strain of mice with hereditary obesity. *Proc Univ Otago Med School* 31, 29-31, 1953.
7. Bielschowsky M, Goodall CM: Origin of inbred NZ mouse strains. *Cancer Res* 30, 834-836, 1970.
8. Boden G: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 45, 3-10, 1996.
9. Bonne AC, den Bieman MG, Gillissen GF, van Lith HA, van Zutphen LF. Chromosomal localization of genes involved in biosynthesis, metabolism or transport of cholesterol in the rat. *Cytogenet Genome Res* 97(3-4), 183-186, 2002
10. Bonow RO, Eckel RH: Diet, Obesity, and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med* **348**, 2057-2058, 2003.
11. Bouchard C: Genetics of Obesity: an update on molecular markers. *Int J Obesity* **19**, S10-13, 1995.

12. Brockmann GA, Bevova MR. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *Trends Genet* 18(7), 367-376, 2002. Review.
13. Brockmann GA, Haley CS, Renne U, Knott SA, Schwerin M: Quantitative Trait Loci Affecting Body Weight and Fatness from a Mouse Line Selected for Extreme High Growth. *Genetics* 150, 369-381, 1998.
14. Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW Jr.: Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 341, 1097-1105, 1999.
15. Chagnon YC, Rankinen T, Snyder EE, Weisnagel SJ, Perusse L, Bouchard C: The human obesity gene map: the 2002 update. *Obes Res* 11(3), 313-367, 2003. Review.
16. Chopra M, Galbraith S, Darnton-Hill I: A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bulletin of the World Health Organization* 2002 80, 952-958, 2002.
17. Cohen B, Novick D, Rubinstein M: Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274, 1185-1188, 1996.
18. Coleman DL: Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14, 141-148, 1978.
19. Comuzzie AG, Allison DB: The search for human obesity genes. *Science* 280, 1374-1377, 1998.
20. Corva PM, Horvat S, Medrano JF: Quantitative trait loci affecting growth in high growth (hg) mice. *Mamm Genome* 12, 284-290, 2001.
21. Crofford OB, Davis CK: Growth characteristics, glucose tolerance and insulin sensitivity of New Zealand Obese mice. *Metabolism* 14, 271-280, 1956.
22. DeFronzo RA, Ferranini E: Insulin Resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14, 173-194, 1991.
23. Delplanque J, Vasseur F, Durand E, Abderrahmani A, Dina C, Waeber G, Guy-Grand B, Clement K, Weill J, Boutin P, Froguel P: Mutation screening of the urocortin gene:

- identification of new single nucleotide polymorphisms and association studies with obesity in French Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 87(2), 867-869, 2002.
24. Dinulescu DM, Fan W, Boston BA, McCall K, Lamoreux ML, Moore KJ, Montagno J, Cone RD: Mahogany (mg) stimulates feeding and increases basal metabolic rate independent of ist suppression of agouti. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(21), 12707-12712, 1998.
25. Echwald SM: Genetics of human obesity: lessons from mouse models and candidate genes. *J Intern Med* 245, 653-666, 1999.
26. Echwald SM: Genetics of human obesity: lessons from mouse models and candidate genes. *J Intern Med* 245, 653-666, 1999.
27. Eslami-Matin F, Christen U, Bartels H: Vergleichende Überprüfung von Methoden zur Fettbestimmung bei Fleischerzeugnissen. Sonderdruck aus „Die Fleischwirtschaft“, 54. Jahrgang (12), 1975-1978, 1981-1984, 1974.
28. Esterbauer H, Oberkofler H, Linnemayr V, Iglseder B, Hedegger M, Wolfsgruber P, Paulweber B, Fastner G, Krempler F, Patsch W : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene locus: associations with obesity indices in middle-aged women. *Diabetes* 51(4), 1281-1286, 2002.
29. Ewart-Toland A, Mounzih K, Qiu J, Chehab FF: Effect of the Genetic Background on the Reproduction of Leptin-Deficient Obese Mice. *Endocrinology* 140, 732-738, 1999.
30. Expert Panel on detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285, 2486-2497, 2001.
31. Faith MS, Pietrobelli A, Nunez C, Heo M, Heymsfield SB, Allison DB : Evidence for independent genetic influence on fat mass and body mass in pediatric twin sample. *Pediatrics* 104, 61-67, 1999.
32. Festing MFW: Inbred strains of mice. *Mouse Genome* 95, 631-633, 1997.

- 
33. Flier JS: The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? *Cell* 80(1), 15-18, 1995.
34. Haalas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM: Physiological response to long-term peripheral leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 8878-8883, 1997.
35. Hales CN, Barker DJ: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35(7), 595-601, 1992.
36. Herberg L, Coleman DL: Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. *Metabolism* 26, 59-98, 1977.
37. Hill JO und Peters JC: Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* 280, 1371-1374, 1998.
38. Hirayama I, Yi Z, Izumi S, Arai I, Suzuki W, Nagamachi Y, Kuwano H, Takeuchi T, Izumi T. Genetic analysis of obese diabetes in the TSOD mouse. *Diabetes* 48(5), 1183-1191, 1999.
39. Howard AD, Wang R, Pong SS, Mellin TN, Strack A, Guan XM, Zeng Z, Williams DL Jr, Feighner SD, Nunes CN, Murphy B, Stair JN, Yu H, Jiang Q, Clements MK, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL, McDonald TP, Lynch KR, Evans JF, Austin CP, Caskey CT, Van der Ploeg LH, Liu Q: Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature* 406(6791), 70-74, 2000.
40. Igel M, Becker W, Herberg L, Joost HG: Hyperleptinemia, leptin resistance and polymorphic leptin receptor in the New Zealand Obese (NZO) mouse. *Endocrinology* 138: 4234-4239, 1997.
41. Inoue H, Iannotti CA, Welling CM, Veile R, Donis-Keller H, Permutt MA: Human cholecystokinin type A receptor gene: cytogenetic localization, physical mapping, and identification of two missense variants in patients with obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Genomics* 42(2), 331-335, 1997.
42. Ivanov TR, Lawrence CB, Stanley PJ, Luckman SM: Evaluation of neuromedin U actions in energy homeostasis and pituitary function. *Endocrinology* 143(10), 3813-3821, 2002.

- 
43. Jazet IM, Pijl H, Meinders AE: Adipose tissue as an endocrine organ: impact on insulin resistance. *Neth J Med* 61(6), 194-212, 2003.
44. Kahn, BB: When insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell* 92, 593-596, 1998.
45. Karolchik D, Baertsch R, Diekhans M, Furey TS, Hinrichs A, Lu YT, Roskin KM, Schwartz M, Sugnet CW, Thomas DJ, Weber RJ, Haussler D, Kent WJ; University of California Santa Cruz: The UCSC Genome Browser Database. *Nucleic Acids Res* 31(1), 51-54, 2003.
46. Kastin AJ, Pan W, Akerstrom V, Hackler L, Wang C, Kotz CM: Novel peptide-peptide cooperation may transform feeding behavior. *Peptides* 23(12), 2189-2196, 2002.
47. Kluge R: Beziehungen zwischen markierten Chromosomenabschnitten und quantitativen Merkmalen bei der Labormaus. *Diss*: 25-27, 1980.
48. Kluge R, Giesen K, Bahrenberg G, Plum L, Ortlepp JR, Joost HG: Quantitative trait loci for obesity and insulin resistance (*Nob1*, *Nob2*) and their interaction with the leptin receptor allele (LeprA720T/T1044I) in the New Zealand obese mice. *Diabetologia* 43, 1565-1572, 2000.
49. Kondo K, Nozawa K, Tomita T, Ezaki K: Inbred strains resulting from Japanese mice. *Bull Exp Anim* 6, 107-112, 1957.
50. Kopelman PG: Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-643, 2000.
51. Lander ES, Schork NJ: Genetic dissection of complex traits. *Science* 265, 2037-2048, 1994.
52. Lincoln S, Daly M, Lander ES: Constructing genetic maps with Mapmaker/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report, 3rd edition, 1992a.
53. Lincoln S, Daly M, Lander ES: Mapping genes controlling quantitative traits with Mapmaker/QTL 1.1. Whitehead Institute Technical Report, 2nd edition, 1992b.
54. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ: Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 27, 325-351, 1997.

- 
55. McFarlane SI, Banerji M, Sowers JR: Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 713-718, 2001.
56. Miller KA, Gunn TM, Carrasquillo MM, Lamoreux ML, Galbraith DB, Barsh GS: Genetic studies of the mouse mutations mahogany and mahoganoid. *Genetics* 146(4), 1407-1415, 1997.
57. Muller YL, Bogardus C, Pedersen O, Baier L: A Gly482Ser missense mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 is associated with altered lipid oxidation and early insulin secretion in Pima Indians. *Diabetes* 52(3), 895-898, 2003.
58. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH: The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 282, 1523-1529, 1999.
59. Nishina PM, Wang J, Toyofuku W, Kuypers FA, Ishida BY, Paigen B: Atherosclerosis and plasma and liver lipids in nine inbred strains of mice. *Lipids* 28, 599-605, 1993.
60. Ortlepp JR, Kluge R, Giesen K, Plum L, Hanrath P, Joost HG: A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse. *Europ J Clin Invest* 30, 195-202, 2000.
61. Page DL, Glenner GG: Social interaction and wounding in the genesis of "spontaneous" murine amyloidosis. *Am J Pathol* 67(3), 555-567, 1972.
62. Paigen B: Genetics of responsiveness to high fat and high cholesterol diets in mice. *Am J Clin Nutr* 62, 458S-462S, 1995.
63. Paterson A, Hewitt J, Peterson S, Lincoln S, Lander ES, Tanksley S: Mendelian factors underlying quantitative traits: Comparison across species, generations, and environments. *Genetics* 127, 169-179, 1991.
64. Paterson A, Lander ES, Lincoln S, Hewitt J, Peterson S, Tanksley S: Resolution of quantitative traits into mendelian factors using a complete RFLP linkage map. *Nature* 335, 721-726, 1988.
65. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ: Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in



- humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14), 8466-8471, 2003.
66. Pérusse L, Bouchard C: Genotype-environment interaction in human obesity. *Nutr Rev* 57, S31-S37, 1999.
67. Pitman WA, Korstanje R, Churchill GA, Nicodeme E, Albers JJ, Cheung MC, Staton MA, Sampson SS, Harris S, Paigen B: Quantitative trait locus mapping of genes that regulate HDL cholesterol in SM/J and NZB/B1NJ inbred mice. *Physiol Genom* 9, 93-102, 2002.
68. Printz MP, Jirout M, Jaworski R, Alemayehu A, Kren V. Genetic Models in Applied Physiology. HXB/BXH rat recombinant inbred strain platform: a newly enhanced tool for cardiovascular, behavioral, and developmental genetics and genomics. *J Appl Physiol* 94(6), 2510-22, 2003. Review.
69. Plum L: Identifizierung und Charakterisierung von Suszeptibilitätsloci für Typ-2-Diabetes mellitus in einem Mausmodell für das metabolische Syndrom. *Diss*: 9-30, 2002.
70. Puigserver P, Spiegelman BM: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24(1), 78-90, 2003.
71. Reaven GM: Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev* 75, 473-486, 1995.
72. Reddy JK, Hashimoto T: Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 21, 193-230, 2001.
73. Rehman J, Considine RV, Bovenkerk JE, Li J, Slavens CA, Jones RM, March KL: Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. *J Am Coll Cardiol* 41(8), 1408-1413, 2003.
74. Reifsnyder PC, Churchill G, Leiter EH: Maternal Environment and Genotype Interact to Establish Diabetes in Mice. *Genome Res* 10, 1568-1578, 2000.
75. Reifsnyder PC, Leiter EH: Deconstructing and reconstructing obesity-induced diabetes (diabetes) in mice. *Diabetes* 51(3), 825-832, 2002.

- 
76. Reifsynder PC, Churchill G, Leiter EH: Maternal Environment and Genotype Interact to Establish Diabetes in Mice. *Genome Research* 10, 1568-1578, 2000.
77. Ribot J, Rantala M, Kesaniemi YA, Palou A, Savolainen MJ: Weight loss reduces expression of SREBP1c/ADD1 and PPARgamma2 in adipose tissue of obese women. *Pflugers Arch* 441(4), 498-505, 2001.
78. Rice T, Després JP, Daw EW, Gagnon J, Borecki IB, Périusse L, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard : Familial resemblance for abdominal visceral fat : the HERITAGE family study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21, 1024-1031, 1997.
79. Rice T, Périusse L, Bouchard C, Rao DC : Familial aggregation of body mass index and subcutaneous fat measures in the longitudinal Quebec family study. *Genet Epidemiol* 16, 316-334, 1999.
80. Sakurai Y, Umeda T, Shinichi K, Honjo S, Wakabayashi K, Todoroki I, Nishikawa H, Ogawa S, Katsurada M: Relation of total and beverage-specific alcohol intake to body mass index and waist-to-hip ratio: a study of self-defense officials in Japan. *Eur J Epidemiol* 13, 893-898, 1997.
81. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG: Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778), 661-671, 2000. Review.
82. Scott CL: Diagnosis, Prevention, and Intervention for the Metabolic Syndrome. *Am J Cardiol* 92(suppl), 35i-42i, 2003.
83. Seidell JC, Verschuren WM, van Leer EM, Kromhout D: Overweight, underweight, and mortality. A prospective study of 48,287 men and women. *Arch Intern Med* 156, 958-963, 1996.
84. Seidell JC: The impact of obesity on health status: some implications for health care costs. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19, Suppl 6, S 13-16, 1995.
85. Seo JB, Noh MJ, Yoo EJ, Park SY, Park J, Lee IK, Park SD, Kim JB: Functional characterization of the human resistin promoter with adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c and CCAAT enhancer binding protein-alpha. *Mol Endocrinol* 17(8), 1522-1533, 2003.

- 
86. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409(6818), 307-312, 2001.
87. Storer JB: Relation of lifespan to brain weight, body weight, and metabolic rate among inbred mouse strains. *Exp. Gerontol* 2, 173-182, 1967.
88. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg A: A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature Genet* 18, 213-215, 1998.
89. Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z: A twin study of human obesity. *JAMA* 256, 51-54, 1986.
90. Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE: The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 322, 1483-1487, 1990.
91. Subrahmanyam K: Metabolism in the New Zealand strain of obese mice. *Biochem J* 76, 548-556, 1960.
92. Takata Y, Takeda S, Kawanami T, Takiguchi S, Yoshida Y, Miyasaka K, Funakoshi A: Promoter analysis of human cholecystokinin type-A receptor gene. *J Gastroenterol* 37(10), 815-820, 2002.
93. Takiguchi S, Takata Y, Takahashi N, Kataoka K, Hirashima T, Kawano K, Miyasaka K, Funakoshi A, Kono A : A disrupted cholecystokinin A receptor gene induces diabetes in obese rats synergistically with ODB1 gene. *Am J Physiol* 274(2 Pt 1), E265-270, 1998.
94. Taylor BA, Wnek C, Schroeder D, Phillips SJ: Multiple obesity QTLs identified in an intercross between the NZO (New Zealand obese) and the SM (small) mouse strains. *Mamm Genome* 12, 95-103, 2001.
95. Veroni MC, Proietto J, Larkins RG: Evolution of insulin resistance in New Zealand Obese mice. *Diabetes* 40, 1480-1478, 1991.
96. Visscher TL, Kromhout D, Seidell JC: Long-term and recent time trends in the prevalence of obesity among Dutch men and women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(9), 1218-1224, 2002.

97. Vogler GP, Sorensen TI, Stunkard AJ, Srinivasan MR, Rao DC: Influences of genes and shared family environment on adult body mass index assessed in an adoption study by a comprehensive path model. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19, 40-45, 1995.
98. Wabitsch M, Kunze D, Keller E, Kiess W, Kromeyer-Hauschild K: Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. Deutliche und anhaltende Zunahme der Prävalenz- Aufruf zum Handeln. *Fortschritte der Medizin* 120(4), 99-106, 2002.
99. Walkley SU, Hunt CE, Clements RS, Lindsey JR. Description of obesity in the PBB/Ld mouse. *J Lipid Res* 19(3), 335-341, 1978.
100. Weber JL, May PE: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44 (3), 388-396, 1989.
101. Weibust RS: Inheritance of plasma cholesterol levels in mice. *Genetics* 73, 303-312, 1973.
102. West DB, Boozer CN, Moody DL, Atkinson RL: Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am J Physiol* 262, R1025-R1032, 1992.
103. World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic (World Health Organization, Geneva, 1998).
104. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505), 425-432, 1994.

## ANHANG

**Tab. 3.1 Charakterisierung der weiblichen und männlichen Parental-, F1-, und Rückkreuzungspopulationen der ersten Kreuzung bei fettreicher Diät**

| Merkmal                  | weibliche Tiere |             |             |             |             | männliche Tiere |             |             |             |             |
|--------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                          | SJL             | NZO         | SZO (F1)    | SZNZ        | NSZO        | SJL             | NZO         | SZO (F1)    | SZNZ        | NSZO        |
| n=                       | 9               | 18          | 20          | 49          | 139         | 10              | 10          | 13          | 37          | 125         |
| KG12 [g]                 | 19.8±1.2        | 43.4±4.9    | 26.8±2.0    | 37.8±5.7    | 41.5±6.1    | 23.3±1.6        | 50.3±2.9    | 32.9±2.6    | 49.1±4.3    | 51.2±6.7    |
| KG22 [g]                 | 21.6±0.8        | 57.5±8.3    | 33.6±2.9    | 49.0±8.6    | 54.5±8.8    | 27.4±2.2        | 50.8±8.4    | 46.0±3.3    | 57.2±9.6    | 61.5±11.8   |
| BMI [g/cm <sup>2</sup> ] | 0.243±0.009     | 0.449±0.042 | 0.293±0.018 | 0.379±0.049 | 0.413±0.049 | 0.290±0.014     | 0.396±0.058 | 0.377±0.017 | 0.428±0.057 | 0.449±0.068 |
| PFF [%]                  | 9.7±1.3         | 41.5±2.5    | 26.9±4.3    | 36.7±4.6    | 38.5±21.2   | 9.5±2.3         | 23.9±6.8    | 40.7±14.4   | 30.7±6.7    | 30.4±8.2    |
| AFF [g]                  | 2.1±0.3         | 24.3±4.2    | 9.2±2.3     | 18.3±4.9    | 21.2±4.9    | 2.6±0.8         | 13.1±4.9    | 18.9±7.5    | 18.0±5.5    | 19.3±7.4    |
| PG [mM]                  | 8.5±1.7         | 11.6±3.4    | 11.6±1.8    | 9.8±3.1     | 11.4±4.6    | 9.5±1.1         | 23.2±7.3    | 12.4±2.0    | 21.5±13.0   | 21.7±11.9   |
| IRI [mM]                 | 1.1±0.4         | 39.5±36.5   | 1.6±0.7     | 7.8±8.1     | 17.9±28.8   | 1.4±1.2         | 6.9±8.9     | 11.9±7.7    | 27.3±42.8   | 14.4±20.4   |
| CHOL [mM]                | 1.7±0.5         | 4.4±0.4     | 2.7±0.2     | 3.5±0.9     | 3.8±0.5     | 3.1±0.3         | 4.9±0.9     | 4.2±0.3     | 4.4±0.9     | 4.6±0.9     |
| TG [mM]                  | 0.8±0.2         | 1.8±0.4     | 1.1±0.2     | 1.4±0.4     | 1.5±0.5     | 1.5±0.7         | 2.4±0.9     | 1.6±0.4     | 2.3±1.4     | 2.9±2.7     |

falls nicht anders vermerkt: Messwerte *post mortem* (22. Lebenswoche); Mittelwerte ± Standardabweichung

**Tab. 3.2 Charakterisierung der männlichen und weiblichen Rückkreuzungspopulationen der zweiten Kreuzung bei Standardernährung (SD) und fettreicher Diät (FD).**

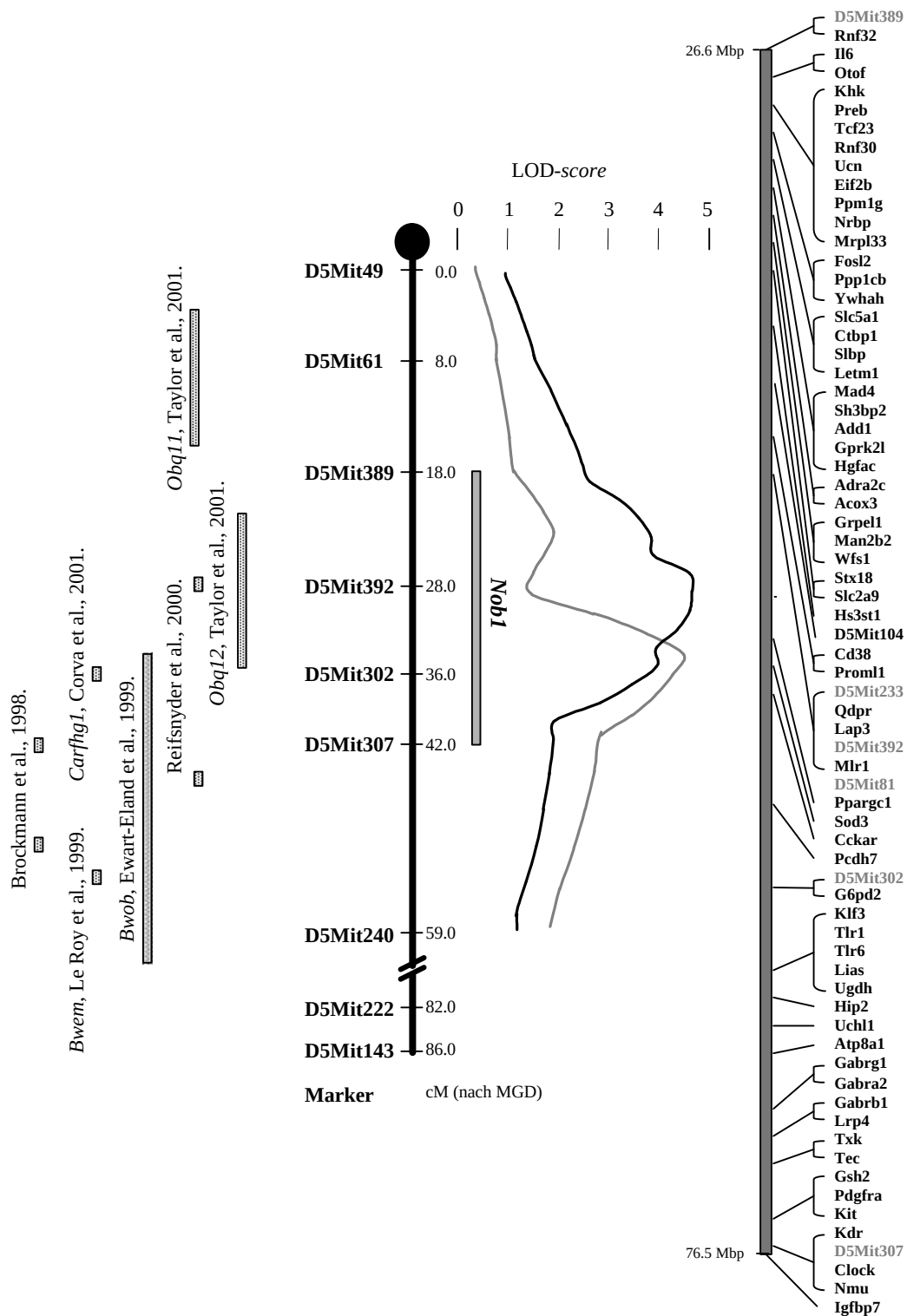
| Merkmal                 | SZNZ ? (1) |           | SZNZ ? (2) |           | NSZO ? (3) |           | NSZO ? (4) |           | Differenz SD vs. FD |      |      |      | mehrfaktorielle ANOVA, p-Wert |         |          |
|-------------------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|---------------------|------|------|------|-------------------------------|---------|----------|
|                         | SD         | FD        | SD         | FD        | SD         | FD        | SD         | FD        | 1                   | 2    | 3    | 4    | Geschlecht                    | Diät    | Kreuzung |
| n=                      | 102        | 176       | 102        | 198       | 54         | 171       | 77         | 207       |                     |      |      |      |                               |         |          |
| KG4 [g]                 | -          | 16.8±3.0  | -          | 18.3±3.4  | -          | 18.5±2.9  | -          | 21.3±3.7  | -                   | -    | -    | -    | <0.0001                       | -       | <0.0001  |
| KG6 [g]                 | -          | 25.2±2.7  | -          | 30.7±3.0  | -          | 27.1±2.9  | -          | 33.4±3.7  | -                   | -    | -    | -    | <0.0001                       | -       | <0.0001  |
| KG8 [g]                 | -          | 29.3±3.6  | -          | 36.6±3.9  | -          | 32.3±3.6  | -          | 41.0±5.1  | -                   | -    | -    | -    | <0.0001                       | -       | <0.0001  |
| KG10 [g]                | 30.2±2.9   | 33.3±4.2  | 38.0±3.9   | 41.1±4.7  | 35.3±3.2   | 36.3±4.1  | 43.0±5.3   | 45.7±5.3  | 3.1                 | 3.1  | 1.0  | 2.7  | <0.0001                       | <0.0001 | <0.0001  |
| KG12 [g]                | 32.0±3.5   | 35.7±4.6  | 40.5±4.4   | 45.1±5.0  | 36.9±3.4   | 39.0±4.5  | 44.9±5.3   | 49.5±6.1  | 3.8                 | 4.7  | 2.2  | 4.5  | <0.0001                       | <0.0001 | <0.0001  |
| KG14 [g]                | 33.3±3.6   | 38.1±4.9  | 41.4±4.2   | 48.0±5.9  | 38.0±3.2   | 41.7±4.9  | 46.4±5.5   | 53.1±6.8  | 4.8                 | 6.6  | 3.7  | 6.7  | <0.0001                       | <0.0001 | <0.0001  |
| KG16 [g]                | 35.3±4.3   | 39.8±5.2  | 43.8±5.2   | 50.6±6.0  | 39.7±3.8   | 44.3±5.2  | 48.3±6.0   | 55.7±7.4  | 4.5                 | 6.8  | 4.6  | 7.4  | <0.0001                       | <0.0001 | <0.0001  |
| KG18 [g]                | 36.8±4.7   | 41.5±5.9  | 45.1±5.4   | 53.1±7.0  | 40.9±4.3   | 46.1±5.7  | 49.7±5.9   | 58.1±8.6  | 4.6                 | 8.0  | 5.2  | 8.4  | <0.0001                       | <0.0001 | <0.0001  |
| KG20 [g]                | 37.6±5.3   | 42.8±6.4  | 46.9±6.0   | 55.4±7.2  | 41.8±4.3   | 47.6±6.2  | 51.0±6.0   | 60.8±9.0  | 5.1                 | 8.5  | 5.8  | 9.8  | <0.0001                       | <0.0001 | <0.0001  |
| KG22 [g]                | 38.4±5.3   | 43.8±6.7  | 47.7±6.6   | 56.8±8.1  | 42.0±6.2   | 48.3±6.6  | 51.7±6.3   | 62.6±9.7  | 5.5                 | 9.2  | 6.4  | 10.9 | <0.0001                       | <0.0001 | <0.0001  |
| BMI[g/cm <sup>2</sup> ] | 0.33±0.03  | 0.36±0.04 | 0.38±0.04  | 0.44±0.05 | 0.35±0.04  | 0.39±0.04 | 0.40±0.03  | 0.47±0.06 | 0.03                | 0.05 | 0.04 | 0.06 | <0.0001                       | <0.0001 | <0.0001  |
| PG [mM]                 | 9.9±2.4    | 10.7±3.1  | 14.7±10.5  | 19.5±13.3 | 9.9±2.8    | 10.6±3.1  | 19.1±13.0  | 20.8±14.5 | 0.7                 | 4.8  | 0.6  | 1.7  | <0.0001                       | 0.0013  | 0.0622   |
| IRI [mM]                | 3.7±12.0   | 3.66±8.1  | 16.9±23.1  | 20.6±26.4 | 4.5±6.8    | 4.3±6.6   | 21.1±27.0  | 23.6±33.2 | 3.8                 | 3.6  | 0.2  | 2.5  | <0.0001                       | 0.7147  | 0.4189   |
| TG [mM]                 | 1.7±0.5    | 1.2±0.5   | 2.5±0.9    | 1.8±1.3   | 1.6±0.4    | 1.4±0.5   | 2.6±0.9    | 1.7±1.4   | 0.5                 | 0.7  | 0.2  | 0.9  | <0.0001                       | <0.0001 | 0.2435   |
| CHOL[mM]                | 2.9±0.5    | 3.7±0.6   | 3.9±0.7    | 4.7±0.92  | 3.1±0.6    | 3.8±0.5   | 3.9±1.1    | 4.8±1.2   | 0.8                 | 0.8  | 0.6  | 0.9  | <0.0001                       | <0.0001 | 0.1438   |
| DP [%]                  | 0          | 1.1       | 15         | 35        | 0          | 1.2       | 30         | 37        |                     |      |      |      |                               |         |          |

falls nicht anders vermerkt: Messwerte *post mortem* (22.Lebenswoche); Mittelwerte ± Standardabweichung; Diabetes mellitus ≡ PG <sup>3</sup>20mM; rechter Tabellenteil: mehrfaktorielle Varianzanalyse

**Tab. 3.5 Effekt des Genotyps bei D5Mit244 (*Chol/NZO*) auf ausgewählte Parameter in standard- und fettreich ernährten männlichen und weiblichen SZNZ-Rückkreuzungen.**

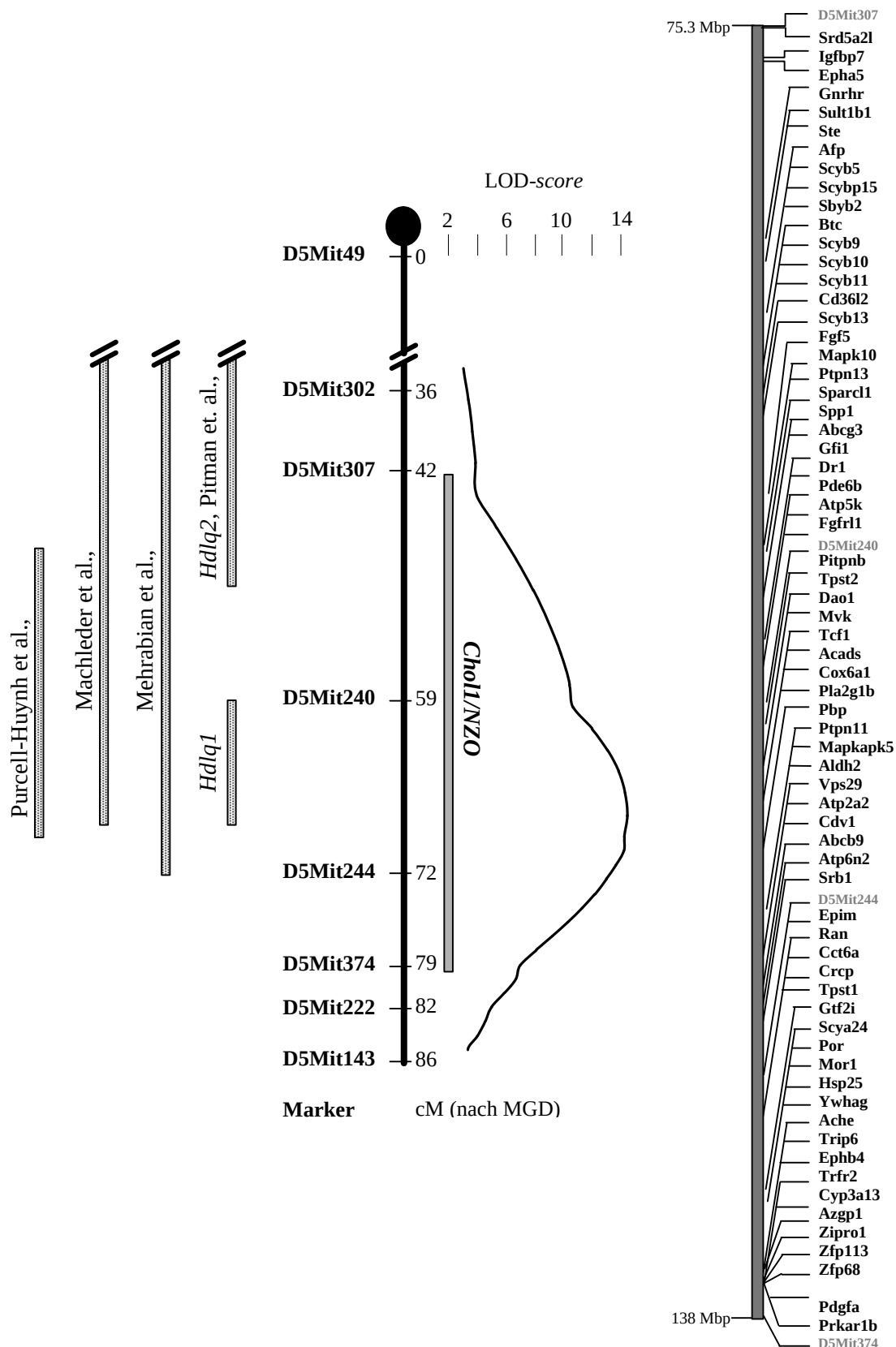
| Merkmal   | weibliche Tiere |           |        |          |          |         | männliche Tiere |           |        |           |           |        |
|-----------|-----------------|-----------|--------|----------|----------|---------|-----------------|-----------|--------|-----------|-----------|--------|
|           | SD              |           |        | FD       |          |         | SD              |           |        | FD        |           |        |
|           | S/N (56)        | N/N (46)  | p-Wert | S/N (78) | N/N (81) | p-Wert  | S/N (48)        | N/N (53)  | p-Wert | S/N (106) | N/N (89)  | p-Wert |
| KG12[g]   | 31.6±3.5        | 32.5±3.5  | 0.2563 | 35.9±5.0 | 35.7±4.2 | 0.9412  | 39.7±4.1        | 41.1±4.6  | 0.1748 | 45.0±4.6  | 45.3±4.8  | 0.6765 |
| KG22[g]   | 37.9±4.9        | 38.9±5.8  | 0.3394 | 43.9±7.7 | 43.9±5.9 | 0.8301  | 47.0±6.5        | 48.6±6.2  | 0.1965 | 56.4±7.7  | 57.4±8.6  | 0.4225 |
| IRI22[mM] | 4.0±14.5        | 11.8±57.5 | 0.3717 | 5.6±12.4 | 2.9±4.3  | 0.1156  | 17.2±27.3       | 16.7±18.8 | 0.9079 | 21.7±26.9 | 19.2±25.9 | 0.5036 |
| PG[mM]    | 10.1±2.3        | 9.7±2.7   | 0.4572 | 11.2±3.2 | 10.7±2.5 | 0.3286  | 14.9±9.4        | 14.7±11.5 | 0.9149 | 19.4±14.0 | 19.7±12.4 | 0.8615 |
| TG[mM]    | 1.8±0.5         | 1.6±0.5   | 0.0122 | 1.3±0.5  | 1.2±0.5  | 0.2707  | 2.5±0.7         | 2.5±1.1   | 0.8910 | 1.8±1.0   | 1.8±1.6   | 0.8955 |
| Chol[mM]  | 2.8±0.4         | 3.1±0.5   | 0.0038 | 3.5±0.6  | 3.9±0.4  | <0.0001 | 3.7±0.6         | 4.2±0.7   | 0.0002 | 4.5±0.7   | 4.9±1.1   | 0.0011 |

Mittelwerte ± Standardabweichung; S/N heterozygot für das NZO-Allel. N/N homozygot für das NZO-Allel



**Abb. 4.1 Lokalisation von *Nob1* und weiteren in der Literatur beschriebenen QTL in der *Nob1*-Region.** Die physikalische Karte zeigt eine erweiterte Liste von Kandidatengenen. Es sind ca. 120 Gene in der *Nob1*-Region bekannt.





**Abb. 4.2 Lokalisation von *Chol1/NZO* und weiterer QTL für Hypercholesterinämie.** Die physikalische Karte zeigt eine Liste von Kandidatengen der *Chol1/NZO* Region. Es befinden sich mehr als 300 bekannte Gene in diesem Bereich.



## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans-Georg Joost danke ich für die freundliche Überlassung des Themas meiner Promotionsarbeit, die hervorragende Betreuung, sowie die außergewöhnliche Unterstützung und Förderung, die ich erfahren habe.

Herrn Prof. Dr. Werner Küpper danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Reinhart Kluge danke ich für die Durchführung der Tierversuche, die freundschaftliche Zusammenarbeit, seine immerwährende Hilfsbereitschaft und die Durchsicht der vorliegenden Dissertationsschrift.

Frau Dr. Leona Plum danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit, ihr engagiertes Arbeiten, das mich so oft motiviert und mitgerissen hat, die Durchsicht der Dissertationsschrift und nicht zuletzt ihre Freundschaft.

Frau Stefanie Winandy und Frau Cathrin Müller danke ich für ihre ausgezeichnete Arbeit als medizinisch-technische Assistentinnen.

Herrn Prof. Dr. Ralf-Dieter Hilgers und Herrn Dipl.-Stat. Sven Stanzel danke ich für ihren fachlichen Rat zu den statistischen Auswertungen der vorliegenden Arbeit.

Meiner Schwester Astrid und Herrn Markus Voell danke ich für die technische Hilfe bei der Fertigstellung der Dissertationsschrift.

Meinen Eltern danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen und ihre Liebe.



# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

---

|                     |                |
|---------------------|----------------|
| Name                | Kirsten Giesen |
| Geburtsdatum        | 15.03.1976     |
| Geburtsort          | Aachen         |
| Familienstand       | ledig          |
| Staatsangehörigkeit | deutsch        |

## SCHULBILDUNG

---

|             |                                                 |
|-------------|-------------------------------------------------|
| 1982 – 1986 | Gemeinschaftsgrundschule Kölner Straße, Krefeld |
| 1986 – 1995 | Maria-Sibylla-Merian-Gymnasium, Krefeld         |
| 1995        | Erwerb der allgemeinen Hochschulreife           |

## HOCHSCHULBILDUNG

---

|             |                                             |
|-------------|---------------------------------------------|
| 1995 – 2002 | Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen |
| 1997        | ärztliche Vorprüfung                        |
| 1999        | erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung     |
| 2001        | zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung    |
| 2002        | dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung    |

## BERUFSAUSBILDUNG

---

|                 |                                                                                                                                                     |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8/2002 – 2/2003 | Royal Devon and Exeter Hospital, Exeter, England <ul style="list-style-type: none"><li>▪ <i>Junior House Officer</i>, Medizinische Klinik</li></ul> |
| 3/2003 – 2/2004 | Ärztin im Praktikum, Neurologische Klinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn                                                       |
| Seit 3/2004     | Assistenzärztin, Medizinisches Zentrum Kreis Aachen gGmbH, Abteilung für Innere Medizin                                                             |

Aachen, den 07.09.2004

Kirsten Giesen