

# **Der adipozytäre BK<sub>Ca</sub> Kaliumkanal und seine Rolle bei Prävention und Therapie von Adipositas**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Dipl.-Pharm. Julia Illison  
aus Bad Cannstatt

Tübingen  
2016



Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 18.10.2016

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: JProf. Dr. Robert Lukowski

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Ruth



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Supplement</b> .....	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Kaliumkanäle .....	1
1.1.1 Der BK-Kanal .....	3
1.2 Übergewicht und Adipositas: Ätiologie, Pathologie und Folgeerkrankungen einer Volkskrankheit.....	10
1.3 Die Energiehomöostase .....	14
1.3.1 Zentrale Energiehomöostase.....	14
1.3.2 Periphere Energiehomöostase .....	16
1.4 Charakterisierung von Funktion und Morphologie der unterschiedlichen Fettdepots.....	23
1.4.1 Weißes Fettgewebe als Sezernierungs- und Speicherorgan .....	24
1.4.2 Braunes Fettgewebe und seine Rolle im Energiestoffwechsel.....	25
1.4.3 Beiges Fettgewebe als wichtiger Intermediärtyp der verschiedenen Fettzelltypen.....	29
1.4.4 Bedeutung der cyclischen Nukleotide für Adipozytenreifung, Thermogenese und Adipositas.....	33
1.5 Ionenkanäle im Zusammenhang mit Übergewicht und Adipositas.....	36
1.6 Potentielle physiologische Funktion des BK-Kanals in Adipozyten .....	40
1.7 Zielsetzung .....	42
<b>2 Material</b> .....	<b>44</b>
2.1 Geräte.....	44
2.2 Software.....	45
2.3 Verbrauchsmaterialien und Kit-Systeme .....	45
2.3.1 Verbrauchsmaterialien.....	46
2.3.2 Kit-Systeme.....	47
2.4 Methoden-spezifische Materialien und Puffer.....	47
2.4.1 Genotypisierungen .....	47
2.4.2 Radiotelemetrische Messungen .....	48
2.4.3 Intraperitonealer Glucose-Toleranz-Test .....	49
2.4.4 Soxhlet-Fettextraktion .....	50
2.4.5 Immunhistochemie .....	50
2.4.6 mRNA-Analytik mittels qRT-PCR .....	53
2.4.7 Proteinanalytik mittels Western Blot .....	54
2.4.8 Primäre Präadipozytenkulturen .....	57
2.4.9 xCELLigence.....	61
<b>3 Methoden</b> .....	<b>62</b>
3.1 Haltung der Tiere .....	62
3.2 Generierung der konstitutiven und konditionalen BK-KO Mausmodelle, sowie transgener Mauslinien.....	62
3.2.1 BK.....	62
3.2.2 ob/ob X BK-Doppelmutanten.....	63

3.2.3	adipoBK.....	64
3.2.4	adipoBK X ROSA Tomato <sup>tom/+</sup> .....	66
3.3	Genotypisierungen.....	68
3.3.1	Extraktion von DNA aus Schwanzspitzenbiopsien.....	68
3.3.2	Vervielfältigung der DNA mittels Polymeraser Kettenreaktion.....	68
3.3.3	Enzymatischer Verdau von Schwanzspitzen-DNA mittels Dde1.....	70
3.3.4	Detektion der DNA mittels Ethidiumbromid und Agarose-Gelelektrophorese .....	71
3.3.5	Bestimmung der Genotypen mittels DNA-Fragmentgrößen-Analyse.....	72
3.4	<i>In vivo</i> Versuche.....	74
3.4.1	Fütterungsversuche.....	74
3.4.2	Modifizierter Metabolischer Käfig.....	76
3.4.3	Radiotelemetrische Ermittlung von Körpertemperatur und Aktivität.....	76
3.4.4	Intraperitonealer Glucose-Toleranz-Test (i.p. GTT).....	78
3.4.5	Organentnahme und Serumkollektion.....	79
3.4.6	Analyse von Körpergewicht und Fettdepotgewichten.....	80
3.5	<i>In vitro</i> Versuche.....	81
3.5.1	Determinierung der Körperstruktur mittels Soxhlet-Fettextraktion.....	81
3.5.2	Immunhistochemische Färbungen.....	82
3.5.3	Determinierung der Fettzellgröße.....	85
3.5.4	Bestimmung der Zellkerndichte.....	86
3.5.5	mRNA-Expressionsanalysen mittels quantitativer Echtzeit-PCR.....	86
3.5.6	Serumanalytik mittels ELISA.....	91
3.5.7	Proteinanalytik mittels Western Blot.....	92
3.5.8	Primäre Präadipozytenkulturen aus weißen und braunen Fettzelldepots....	96
3.5.9	Wachstumsanalyse mittels xCELLigence-System.....	102
3.6	Statistische Analyse.....	102
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>104</b>
4.1	Untersuchung global BK-Kanal defizienter Tiere.....	104
4.1.1	Nachweis des BK Kanales in verschiedenen Fettgeweben.....	104
4.1.2	Globale BK-Kanal-Deletion schützt vor übermäßiger Gewichtszunahme und Fetteinlagerung.....	107
4.1.3	Untersuchung zum BK-abhängigen Glucose-Metabolismus nach verschiedenen Diäten.....	111
4.1.4	Auswirkung der BK-Kanal-Defizienz auf Lebermetabolismus und Autophagie .....	113
4.1.5	Hypertrophie des braunen Fettgewebes in Abhängigkeit der BK-Kanal- Expression.....	116
4.1.6	Vermehrte Expression von Ucp1 in iWAT nach CD hat keinen Effekt auf die Körperkerntemperatur von BK <sup>L1/L1</sup> -Mäusen.....	118
4.1.7	Primärkulturen verschiedener Fettgewebe.....	119
4.2	Analyse der ob/ob X BK-Doppelmutanten.....	128
4.2.1	Partieller Schutz vor exzessiver Fetteinlagerung, Gewichts-zunahme und metabolischen Veränderungen in ob/ob Mäusen bei gleichzeitiger BK-Kanal- Defizienz.....	128
4.3	Untersuchungen zum metabolischen Phänotyp der Adipozyten-spezifischen BK- Mauslinie.....	133
4.3.1	Rekombinationsanalyse der adipoCreERT2-Mauslinie mittels ROSA26 Tomato-Reporter Tieren.....	133
4.3.2	Nachweis des BK-Kanals in verschiedenen Fettdepots der adipoBK-Tiere .....	136

4.3.3	AdipoBK <sup>L2/L1</sup> Mausmutanten sind partiell vor HFD-induzierter Adipositas geschützt.....	138
4.3.4	Untersuchungen zu Glucosemetabolismus, Insulin-ausschüttung und verschiedenen Adipositas-assoziierten Biomarkern nach diätetischer Fütterung von adipoBK-Mäusen .....	145
4.3.5	Verringerte Fettzell-Hypertrophie in adipoBK <sup>L2/L1</sup> Mäusen nach HFD-Fütterung geht mit verminderten Entzündungsparametern und erhöhten Ucp1-Leveln einher .....	148
4.3.6	Auswirkung der Adipozyten-spezifischen BK-Kanal-Deletion auf Lebergewicht und Fetteinlagerung in der Leber.....	151
4.3.7	Untersuchung der BAT-Morphologie im adipoBK-Mausmodell nach Fütterung verschiedener Diäten .....	153
4.3.8	Erhöhte Körpertemperatur und Aktivität in adipoBK <sup>L2/L1</sup> nach HFD-Fütterung .....	155
4.3.9	Hinweise auf vermehrtes <i>Browning</i> im iWAT von adipoBK <sup>L2/L1</sup> Tieren nach CD- und HFD-Fütterung .....	157
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>160</b>
5.1	Adipozytäre BK-Kanal-Deletion schützt effektiv vor exzessiver Gewichtszunahme und Adipositas .....	161
5.2	Schutz vor metabolischen und inflammatorischen Veränderungen durch adipozytäre BK-Kanal-Deletion.....	168
5.3	Hinweise auf vermehrtes Browning und zitterfreie Thermogenese in adipoBK-defizienten Tieren .....	173
5.4	Potentielle Interaktion von BK-Kanälen mit anderen (TRP)-Ionenkanälen als Ursache für Fetteinlagerung und Körpergewichtszunahme .....	177
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>183</b>
<b>7</b>	<b>Supplement .....</b>	<b>185</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>195</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen und Kongressbeiträge.....</b>	<b>221</b>
9.1	Publikationen .....	221
9.2	Kongressbeiträge.....	221
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>222</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>223</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung zur Einteilung der Kaliumkanäle.....	1
Abb. 1.2: Modelldarstellung des BK-Kanals und seiner Untereinheiten .....	4
Abb. 1.3: Schematische Darstellung verschiedener Fettdepots in der Maus .....	24
Abb. 1.4: Lokalisation brauner Fettdepots in Erwachsenen und Säuglingen .....	26
Abb. 1.5: Schematische Darstellung verschiedener Hypothesen zur Entstehung der unterschiedlichen Fettzelltypen .....	30
Abb. 1.6: Schematische Darstellung zum Einfluss cyclischer Nukleotide auf das thermogenetische Programm brauner Fettzellen .....	33
Abb. 3.1: Verpaarungsschema ob/ob X BK Doppelmutanten .....	63
Abb. 3.2: Verpaarungsschema adipoBK-Tiere .....	65
Abb. 3.3: Verpaarungsschema adipoCreERT2 <sup>tg/+</sup> X ROSA26 Tomato <sup>tom/+</sup> .....	67
Abb. 3.4: Repräsentative Aufnahmen der Fragmentgrößen-Analysen zur Genotypisierung ..	72
Abb. 3.5: Zusammenstellung der verschiedenen Diäten .....	74
Abb. 3.6: Protokolle der Fütterungsversuche .....	75
Abb. 3.7: Ablauf der Implantierung telemetrischer Transmitter .....	78
Abb. 3.8: Repräsentative Aufnahme von Gewebeschnitten zur Fettzellgrößenbestimmung ..	86
Abb. 3.9: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines ELISA-Assays .....	91
Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Kultivierung weißer Präadipozyten .....	100
Abb. 3.11: Schematische Darstellung der Kultivierung brauner Präadipozyten .....	101
Abb. 4.1: BK-Expression im Fettgewebe globaler BK <sup>+/+</sup> - und BK <sup>L1/L1</sup> -Tiere .....	105
Abb. 4.2: Morphologische Untersuchung von BAT globaler BK-Tiere .....	106
Abb. 4.3: CD- und HFD-Fütterung globaler BK-Tiere .....	109
Abb. 4.4: Glucose-Toleranz und Insulinausschüttung globaler BK-Tiere .....	113
Abb. 4.5: Hepatische Ölrot- und Autophagie-Analyse globaler BK-Tiere .....	115
Abb. 4.6: Einfluss von BK-Kanälen auf BAT-Morphologie und Ucp1-Expression in iWAT nach HFD-Fütterung .....	117
Abb. 4.7: Untersuchung zur Reifung und Fettakkumulation von Präadipozyten-Kulturen aus eWAT .....	121
Abb. 4.8: Untersuchung zur Reifung und Fettakkumulation von Präadipozyten-Kulturen aus iWAT .....	124
Abb. 4.9: Untersuchung zur Reifung und Fettakkumulation von Präadipozyten-Kulturen aus braunem Fettgewebe .....	127
Abb. 4.10: Untersuchung von BK X ob/ob Doppelmutanten .....	130
Abb. 4.11: Effizienz- und Spezifitäts-Analyse des adipoCreERT2 Mausmodells mittels ROSA26 Tomato-Reporter Tieren .....	135
Abb. 4.12: BK-Expression im Fettgewebe der adipoBK-Mauslinie .....	138
Abb. 4.13: CD- und HFD-Fütterung der adipoBK-Tiere .....	140
Abb. 4.14: Durchschnittlicher Futterkonsum von adipoBK-Tieren bei CD- und HFD-Fütterung .....	141
Abb. 4.15: Körperstrukturanalyse von adipoBK-Tieren bei CD- und HFD-Fütterung .....	143
Abb. 4.16: Pharmakologische Blockade des BK-Kanals in Adipozyten als Therapieoption bei HFD-induzierter Adipositas .....	145

Abb. 4.17: Glucose-Toleranz, Insulinausschüttung und Adipositas-assoziierte Biomarker in adipoBK-Tieren .....	147
Abb. 4.18: Fettzellgröße und Adipozytenmarker in iWAT von adipoBK-Tieren.....	150
Abb. 4.19: Analyse der Leber von adipoBK-Mäusen.....	152
Abb. 4.20: Verminderte BAT-Hypertrophie in adipoBK <sup>L2/L1</sup> nach HFD .....	154
Abb. 4.21: Telemetrische Erfassung von Körpertemperatur und Aktivität in adipoBK Mäusen während der CD-Fütterung.....	155
Abb. 4.22: Telemetrische Erfassung von Körpertemperatur und Aktivität in adipoBK Mäusen während der HFD-Fütterung.....	157
Abb. 4.23: Untersuchung der Ucp1-Expression im iWAT von adipoBK Tieren .....	158
Abb. 5.1: Hypothesenmodell zum Einfluss des adipozytären BK-Kanals auf Fettzellreifung, Differenzierung und Browning .....	179

## Supplement

Suppl. Abb. 1: Immunhistochemischer Nachweis von BK und HSL mittels DAB-Methode .	185
Suppl. Abb. 2: Größenparameter globaler BK-Tiere.....	186
Suppl. Abb. 3: Sucrose-Fütterung globaler BK-Tiere.....	187
Suppl. Abb. 4: Telemetrische Erfassung von Körpertemperatur und Aktivität globaler BK-Tiere.....	188
Suppl. Abb. 5: Untersuchung zur Reifung und Fettakkumulation von Präadipozyten-Kulturen.....	189
Suppl. Abb. 6: Untersuchung von weiblichen BK X ob/ob Doppelmutanten.....	191
Suppl. Abb. 7: Absolutes Körpergewicht und Tibialänge von adipoBK nach CD oder HFD	192
Suppl. Abb. 8: Ablation des BK-Kanals in Adipozyten als Therapieoption bei bestehender Adipositas.....	193
Suppl. Abb. 9: Telemetrische Erfassung von Körpertemperatur und lokomotorischer Aktivität in adipoBK-Tieren.....	194

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Klassifizierung von Adipositas anhand des Body-Mass-Index (BMI) .....	12
Tab. 2.1: verwendete Geräte .....	45
Tab. 2.2: verwendete Software .....	45
Tab. 2.3: Glaswaren und Plastikmaterialien .....	46
Tab. 2.4: Präparierbesteck.....	46
Tab. 2.5: verwendete Kitsysteme.....	47
Tab. 2.6: DNA-Isolation und Polymerase Kettenreaktion .....	47
Tab. 2.7: Oligonukleotide für Genotypisierung .....	47
Tab. 2.8: Agarose-Gele und Gelelektrophorese .....	48
Tab. 2.9: Material, Substanzen und Lösungen zur radiotelemetrische Messung .....	49
Tab. 2.10: verschiedene Lösungen, Reagenzien und Materialien für i.p. GTT .....	49
Tab. 2.11: verschiedene Lösungen, Reagenzien und Materialien für Soxhlett-Fettextraktion .....	50
Tab. 2.12: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, Immunhistochemie.....	50
Tab. 2.13: Fixieren von Gewebeschnitten .....	51
Tab. 2.14: Permeabilisierung von Zellen .....	51
Tab. 2.15: Blockade der endogenen Peroxidase.....	51
Tab. 2.16: Blockade unspezifischer Bindestellen .....	51
Tab. 2.17: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, HE-Färbung .....	52
Tab. 2.18: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, Immunfluoreszenzfärbung ....	52
Tab. 2.19: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, DAB-Färbung.....	53
Tab. 2.20: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, mRNA-Analytik .....	53
Tab. 2.21: Oligonukleotide für mRNA-Analyse .....	54
Tab. 2.22: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, Proteinanalytik .....	55
Tab. 2.23: Proteinanalytik und Konzentrationsbestimmung.....	55
Tab. 2.24: SDS-Gelelektrophorese .....	56
Tab. 2.25: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, Western Blot .....	57
Tab. 2.26: Antikörper für Western Blot .....	57
Tab. 2.27: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, Präadipozytenkulturen .....	58
Tab. 2.28: Isolation von Präadipozyten .....	58
Tab. 2.29: Stammlösungen für Zellkulturmedien .....	60
Tab. 2.30: Zellkulturmedien.....	60
Tab. 2.31: Ölrot-Lösungen .....	61
Tab. 2.32: Versuchsspezifische Substanzen und Materialien, xCELLigence.....	61
Tab. 3.1: Zusammensetzung Genotypisierungsansatz.....	69
Tab. 3.2: PCR-Programm Genotypisierung.....	70
Tab. 3.3: Zusammensetzung Dde1-Restriktionsverdau.....	70
Tab. 3.4: Programm Dde1-Restriktionsverdau .....	70
Tab. 3.5: DNase-Verdau Pipettieransatz .....	88
Tab. 3.6: cDNA-Synthese Pipettieransatz .....	89
Tab. 3.7: qRT-PCR Pipettieransatz.....	89
Tab. 3.8: qRT-PCR Ablauf .....	90

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
[Mg <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Magnesiumionenkonzentration
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
3T3-L1	Adipozyten-Zelllinie
8-Br-cGMP	8-Bromo cGMP, stabiles Analogon des cGMP
adipoBK <sup>L2/+</sup>	Adiponektin Cre-Rekombinase transgene BK-Kanal Kontroll-Maus
adipoBK <sup>L2/L1</sup>	Adiponektin Cre-Rekombinase transgene Maus mit Adipozyten-spezifischer Deletion des BK-Kanals
ADP	Adenosin-Diphosphat
AgRP	Agouti-related Protein
AMP	Adenosin-Monophosphat
AMSC	Vorläuferzelle weißer Fettzellen (adipose tissue derived mesenchymal stem cell)
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APQ7	Aquaporin-7 Kanal
APQ9	Aquaporin-9 Kanal
ATG12	Autophagie-assoziiertes Protein 12
ATG5	Autophagie-assoziiertes Protein 5
ATG7	Autophagie-assoziiertes Protein 7
ATP	Adenosin-Triphosphat
BAT	braunes Fettgewebe ( <i>brown adipose tissue</i> )
BAT-MSC-CM	Kulturmedium für mesenchymale Stammzellen aus braunem Fettgewebe
BK <sup>+/+</sup>	BK-Kanal Wildtyp-Tier
BK-Kanal	Spannungs- und Calcium-aktivierter Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit
BK <sup>L1/L1</sup>	globale BK-Kanal Knockout-Maus
BMI	Body-Mass-Index
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid ( <i>brain natriuretic peptide</i> )
Browning	Bräunungsprozess von Fettzellen
BSA	Rinder-Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
CD	Kontrolldiät (mit 10% der Energie aus Fett)
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I
Cicn3	Gen, welches für den Chloridkanal 3 codiert
CNG	cyclic nucleotide gated channel
CNTNAP2	contactin-associated protein-like 2
CO	Kohlenmonoxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
CREB	cAMP response element-binding protein
DIO	Diät-induzierte Adipositas ( <i>diet-induced obesity</i> )
DIT	Diät-induzierte Thermogenese
DMEM-F12	Dulbeccos modifiziertes Adler-Medium versetzt mit Ham's nährender F12-Mixtur
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP4	Dipeptidylpeptidase 4
ERK	Familie der durch extrazelluläre Signale regulierte Kinasen
etc.	et cetera
eWAT	epididymales WAT
FCS	fetales Kälberserum
FDG	18F-Fluordesoxyglucose

Abkürzung	Erklärung
FOXC2	Forkhead Box Protein C2
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIRK4	G-Protein aktivierter einwärtsgerichteter Kaliumkanal ( <i>g-protein activated inwardly rectifying K<sup>+</sup>-channel</i> )
GLUT2	Glucose-Transporter Typ 2
GLUT4	Glucose-Transporter Typ 4
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor ( <i>g-protein coupled receptor</i> )
GWAS	Genomweite Assoziations-Studie
H <sup>+</sup>	Proton
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HFD	Hochfettdiät
HMOX	Häm-Oxidase
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IK-Kanal	Kalium-Kanal mit mittlerer Leitfähigkeit ( <i>intermediate conductance K<sup>+</sup>-channel</i> )
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin 1
IL-10	Interleukin 10
IL-1ra	IL-1 Rezeptor-Antagonist
IL-6	Interleukin 6
intWAT	interscapuläres weißes Fettgewebe
IUPHAR	International Union of Pharmacology
iWAT	inguinal WAT, Leistenfett
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
K <sub>2P</sub>	Kaliumkanäle, welche durch das Vorhandensein von 2 Poren charakterisiert sind
K <sub>ATP</sub>	ATP-abhängiger Kaliumkanal
K <sub>Ca</sub>	Calcium-abhängiger Kaliumkanal
KCNJ5	Gen, welches für GIRK4-Kanal codiert
KCNMA1	Gen, welches für die $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals codiert
KCNQ1	Gen, welches für den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv7.1 codiert
K <sub>IR</sub>	einwärts-gerichteter Kaliumkanal ( <i>inward rectifier</i> )
Kir2.1	einwärtsgerichteter Kaliumkanal welcher durch KCNJ2 codiert wird ( <i>inward rectifying potassium channel</i> )
Kir6.2	Untereinheit des K <sub>ATP</sub> -Kanals, welche durch KCNJ11 codiert wird
K <sub>Na</sub>	Natrium-abhängiger Kaliumkanal
KO	Knockout
K <sub>V</sub>	spannungsabhängige Kaliumkanäle
K <sub>V</sub> 1.3	Spannungsabhängiger Kaliumkanals der Shaker-Familie, welcher durch KCNA3 codiert wird
K <sub>V</sub> 4.2	Spannungsabhängiger Kaliumkanals, welcher durch KCND2 codiert wird
LC3-I	leichte Kette 3 des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1A/1B, Form I
LC3-II	leichte Kette 3 des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1A/1B, Form II
LoxP	<i>locus of crossing over P1</i> , Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase
LRRC	leucin-rich repeat containing protein
M	Meter
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
MilliQ-Wasser	Reinstwasser, welches mittels des Umkehrosiose-Systems der Firma Millipore erzeugt wurde
min	Minute
mRNA	messenger RNA

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
mWAT	mesenterisches weißes Fettgewebe
Myf5	Regulator der Muskeldifferenzierung und Myogenese ( <i>myogenic factor 5</i> )
n	nano
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NDS	normales Eselserum ( <i>normal donkey serum</i> )
NE	Norepinephrin
NEG 50	Einbettungsmedium für Gewebe
NGS	normales Ziegenserum ( <i>normal goat serum</i> )
nM	nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NP	natriuretisches Peptid
NPR-A	Rezeptor für natriuretische Peptide, Typ A
NPY	Neuropeptid Y
OH-	Hydroxid-Ion
ORO	Ölrot (Oil red O)
P	statistische Irrtumswahrscheinlichkeit
p	pico
p38MK	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
Pax7	paired box protein 7
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PD	vor Beginn der Diät ( <i>prior diet</i> )
PDE	Phosphodiesterase
PEDF	Pigment epithelium-derived factor
PenStrep	Penicillin/Streptomycin-Lösung
PermaFluor	Einbettmedium für Fluoreszenz-gefärbte Gewebeschnitte
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PGC1 $\alpha$	PPAR $\gamma$ -Coaktivator $\alpha$
PGRN	Progranulin
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PPAR $\alpha$	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor $\alpha$
PPAR $\gamma$	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$
Prdm16	Transkriptionsfaktor (PR-Domain containing Protein 16)
pS	pico Siemens
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pWAT	perirenales weißes Fettgewebe
qRT-PCR	quantitative Echtzeit PCR mit reverser Transkriptase
rcf	relative Zentrifugalkraft
RCK	Regulator der Kaliumleitfähigkeit ( <i>regulator of conductance for K+</i> )
RhoA	kleines G-Protein Rho
RIP140	Co-Repressor Protein 140
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>standard error of the mean</i> )
SGLT1	Natrium-Glucose-Cotransporter ( <i>sodium/glucose co-transporter 1</i> )
SK-Kanal	Kaliumkanal mit geringer Leitfähigkeit ( <i>small conductance K<sup>+</sup>-channel</i> )
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
Sp-cAMPS	stabiles cAMP-Analogon ((S)-Adenosine, cyclic 3',5'-(hydrogenphosphorothioate) triethylammonium)
Src	Tyrosin-Kinase und Protoonkogen
Std.	Stunde
SUR1	Sulfonylharnstoff-bindende Untereinheit des K <sub>ATP</sub> -Kanals
T3	Triiod-Thyronin
TAG1	neuronaler Marker
TAM	Tamoxifen
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 ( <i>Tris buffered saline tween</i> )
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TL	Tibiallänge
TM	Transmembran Domäne
TRAM-34	selektiver Blocker des KCa <sub>3.1</sub>
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TritonX-100	Zellmembranpermeabilisator
TRP-Kanäle	Familie von Ionenkanälen (transient receptor potential channels)
TRPM	Melastin-Unterfamilie der TRP-Kanäle
TRPV	Vanilloid-Unterfamilie der TRP-Kanäle
Tween 20	Polysorbat 20
Ucp1	Atmungskette-entkoppelndes Protein 1 ( <i>Uncoupling Protein 1</i> )
VSD	Spannungssensor des BK-Kanals ( <i>voltage sensor domain</i> )
WAT	weißes Fettgewebe (white adipose tissue)
WT	Wildtyp-Tier



# 1 Einleitung

## 1.1 Kaliumkanäle

Ionenkanäle kommen in allen Plasmamembranen sowie den Membranen von Zellorganellen vor (Sandhiya and Dkhar, 2009). Sie stellen die Grundlage für das Ruhemembranpotential dar und sind von universeller Bedeutung für Erregungsbildung und Erregungsleitung in Muskel- und Nervenzellen. Weitere wichtige Funktionen sind Volumen- und Osmo-Regulation sowie die Regulation des Säure-Base-Haushalts, da sie als porenbildende Transmembranproteine eine wichtige Transfermöglichkeit für Ionen durch biologische Membranen darstellen. Sie spielen dementsprechend eine essentielle Rolle für die Funktionalität von Zellen hinsichtlich glattmuskulärer Kontraktion sowie für die Sekretion von Hormonen und Neurotransmittern (Sandhiya and Dkhar, 2009). Der In- und Efflux von Ionen folgt hierbei einem elektrochemischen Gradienten (passiver Transport) oder energieabhängig unter ATP-Verbrauch durch Ionenpumpen (primär aktiver Transport).

In der großen Klasse von Ionenkanälen stellen neben Natrium-, Calcium- und Chloridkanälen, insbesondere die Kaliumkanäle ( $K^+$ -Kanäle) eine sehr wichtige Subpopulation dar. Bislang sind in Säugetieren über 75 Gene bekannt, welche für diverse Kaliumkanal-Untereinheiten codieren. Kaliumkanäle sind essentiell für die physiologische Funktion von Zellen und sind mit einer Vielzahl von Erkrankungen, wie Diabetes mellitus (Burnett et al., 1987), Epilepsie (Dichter, 1989; Saitsu et al., 2015), plötzlichem Herztod (Abriel et al., 2015), entzündlichen Signalkaskaden bei *Colitis Ulcerosa* (Hansen, 2014) oder auch episodischer Ataxie (Sausbier et al., 2004; Zhang and Kaczmarek, 2015) assoziiert.

Kaliumkanäle werden entsprechend ihrer Struktur, Physiologie und pharmakologischer Kriterien unterschieden. In der Regel basiert diese Unterteilung in Sub-/Familien und Subtypen auf der Anzahl an Transmembran-Domänen (TM) pro Kanal-Untereinheit. (Jenkinson, 2006).

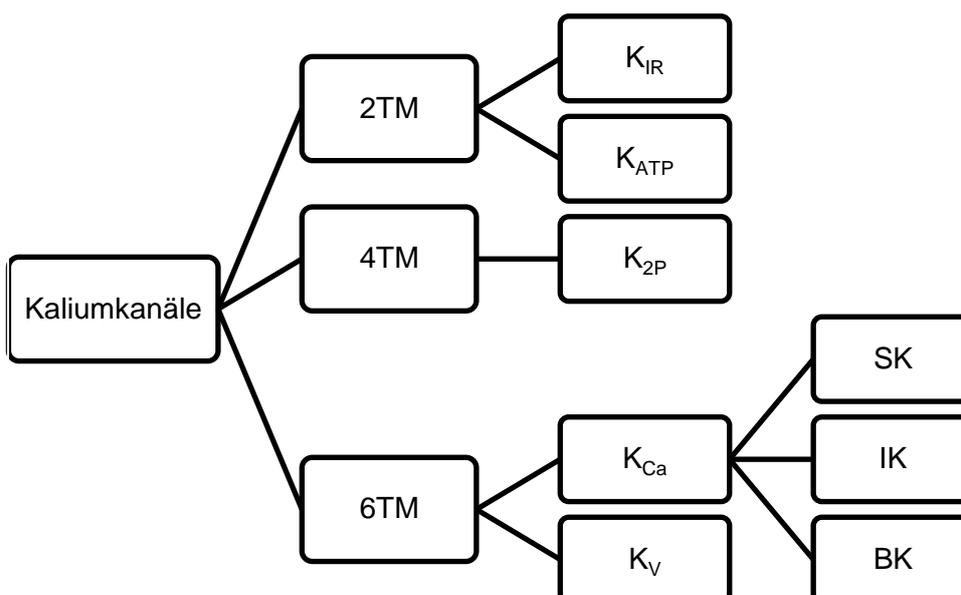


Abb. 1.1: Schematische Darstellung zur Einteilung der Kaliumkanäle

Die Einteilung erfolgt anhand der Anzahl transmembranärer Domänen (TM). Der BK-Kanal umfasst abweichend von dieser Klassifizierung 7 TM, wird aber auf Grund der hohen strukturellen Ähnlichkeit dennoch der 6TM-Klasse zugeordnet. Zur Klasse der 2TM-Kanäle zählen die einwärts-gleichrichtenden Kanäle ( $K_{IR}$ ) sowie ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ). 2-Porenkanäle ( $K_{2P}$ ) umfassen 4 TM-Domänen. Die 6TM-umfassenden Kanäle können in zwei Subfamilien unterteilt werden: Calcium-abhängige ( $K_{Ca}$ ) und Spannungs-abhängige Kaliumkanäle ( $K_V$ ), wobei sich letztere anhand ihrer Leitfähigkeit wiederum in 3 weitere Gruppen unterteilen lassen.

Bei 2TM-Kanälen setzen sich die einzelnen Untereinheiten aus zwei Membrandurchspannenden Regionen und einer dazwischen liegenden Poren-Domäne zusammen. Vier dieser Untereinheiten bilden gemeinsam die zentrale Kanalpore aus. Den 2TM-Kanälen werden sowohl die ATP-abhängigen Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ), welche eine zentrale Rolle bei der Insulinfreisetzung spielen (Miki et al., 1997; Miki et al., 1998; Kishore et al., 2011; Bonfanti et al., 2015) zugerechnet, als auch die einwärts-gleichrichtenden  $K^+$ -Kanäle ( $K_{IR}$ , *inward rectifier*), welche sich wiederum aus klassischen  $K_{IR}$  und G-Protein-gekoppelten  $K_{IR}$  zusammensetzen (Jenkinson, 2006).

Zur Familie der 4TM-Kanäle gehören die sogenannten 2-Poren Kaliumkanäle ( $K_{2P}$ ), wie beispielsweise die TREK-, TALK- und TASK-Sub-Familien. Eine Besonderheit dieser Kanäle ist, dass sie Untereinheiten 2 porenbildenden Domänen ausbilden. Ein funktionaler  $K_{2P}$ -Kanal besteht demnach aus zwei porenbildenden Untereinheiten.

Die 6TM Familie stellt innerhalb der Kaliumkanalsuperfamilie die größte und heterogenste Gruppe der Kaliumkanäle dar. Eine Untereinheit setzt sich hierbei aus sechs transmembranären Regionen zusammen und bildet die Poren-bildenden Domänen aus. Ein Tetramer der Poren-formenden Untereinheiten bildet letztlich die Kanalpore mit dem  $K^+$ -Selektivitätsfilter. Zur Familie der 6TM-Kanäle zählen 3 Sub-Familien: Zum einen die Gruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle ( $K_V$ , *voltage dependent  $K^+$ -channels*) mit ihren acht Subtypen, aber auch Natrium- ( $K_{Na}$ ) und Calcium-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) (Jenkinson, 2006). Zu den  $K_{Na}$  zählen streng genommen Slick und Slack, welche eine zentrale Rolle bei der neuronalen Entwicklung spielen, jedoch auf Grund der hohen strukturellen Ähnlichkeit ihrer Porenregion zu der des  $K_{Ca}$ -Kanals mit hoher Leitfähigkeit (BK-Kanal, *big conductance Kanal*), fälschlicherweise zu den  $K_{Ca}$ -Kanälen gezählt werden (Yuan et al., 2003; Kaczmarek, 2013). Slack ( $K_{Ca4.1}$ ) und Slick ( $K_{Ca4.2}$ ) werden jedoch durch Natrium- oder Chlorid-Ionen aktiviert (Yuan et al., 2003). Der  $K_{Ca5}$  Kanal, auch Slo3 genannt, wird unter anderem in Spermatozoen exprimiert und vor allem pH-anhängig, durch Alkalisierung mittels Hydroxid-Ionen ( $OH^-$ ), aktiviert. Der Logik der hier zugrundeliegenden Nomenklatur folgend können  $K_{Ca4}$ - und  $K_{Ca5}$ -Kanäle nur auf Grund struktureller Merkmale als „Calcium-aktivierte“-Kanäle bezeichnet werden.

Die große Vielfalt innerhalb der Kaliumkanal-Superfamilie wird außerdem durch eine Vielzahl verschiedener Spleißvarianten, post-translationale Modifikationen, der Ausbildung von heteromeren Kanal-Komplexen aus verschiedenen Untereinheiten derselben Subfamilie, sowie durch Anlagerung modulatorischer Untereinheiten noch deutlich erweitert (Shi et al., 2005; Jenkinson, 2006; Kaczmarek, 2013).

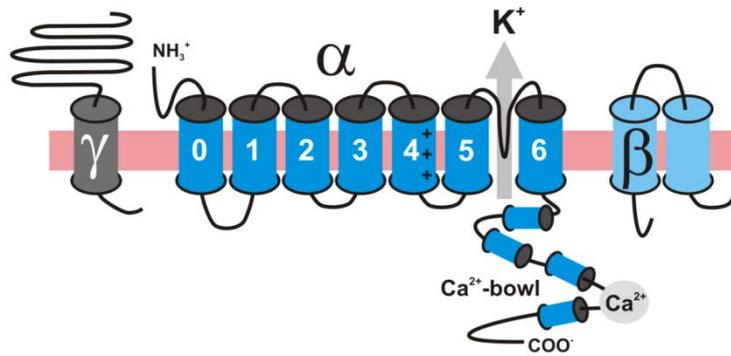
Wie mittels Röntgen-basierter Kristallstrukturanalyse gezeigt werden konnte ist allen Poren-bildenden  $\alpha$ -Untereinheiten, trotz der hohen Variabilität, eine fünf Aminosäuren lange Primärsequenz gemein (Doyle et al., 1998). Diese Abfolge von Threonin, Valin, Glycin, Tyrosin

und einem weiteren Glycin (TVGYG) bildet einen essentiellen Teil des Kanales aus, den sogenannten K<sup>+</sup>-Selektivitätsfilter. Dieser stellt eine Engstelle in der Pore dar und erlaubt auf Grund eines Ringes aus Sauerstoff-Atomen aus umgebenden Aminosäuren lediglich K<sup>+</sup>-Ionen den Kanal zu durchströmen (Doyle et al., 1998; Jenkinson, 2006). Die Sauerstoffatome ahmen hierbei die Hydrathülle nach, welche K<sup>+</sup>-Ionen normalerweise umgibt, so dass dehydriertes, Sauerstoff-komplexiertes K<sup>+</sup> die Pore durchlaufen kann. Da dieser dehydrierte Zustand für Na<sup>+</sup>-Ionen energetisch deutlich weniger günstig ist, trägt diese Struktur essentiell zur Kalium-Selektivität der Kanäle bei (Hodgkin and Keynes, 1955).

### 1.1.1 Der BK-Kanal

Der BK-Kanal zählt wie bereits ausgeführt (s. Kapitel 1.1) zur Familie der Calcium-abhängigen Kaliumkanäle. Ihnen ist gemein, dass sie, durch Öffnen oder Schließen, auf oszillierende intrazelluläre Calciumspiegel ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) reagieren. Sie können auf Grund ihrer biophysikalischen Eigenschaften, insbesondere ihrer Leitfähigkeit, weiter charakterisiert und unterschieden werden. Die SK-Kanäle SK1-3 (*small conductance*) weisen mit 2-25 pS die geringste Leitfähigkeit auf (Kaczorowski and Garcia, 1999) und können im Gegensatz zu anderen K<sub>Ca</sub> durch Apamin blockiert werden. Physiologisch scheinen sie vor allem bei der Verlängerung der Nach-Hyperpolarisation sowie der Erregbarkeit und Regulation der glatten Muskelzellen des Harnblasen-Detrusors eine wichtige Rolle zu spielen (Herrera and Nelson, 2002; Herrera et al., 2005). IK-Kanäle (*intermediate conductance*) weisen eine mittlere Leitfähigkeit von 25-100 pS auf (Kaczorowski and Garcia, 1999) und sind vor allem für die Einstellung des Membranpotentials auf stark negative Werte von Bedeutung (Matos et al., 2007).

Der BK-Kanal nimmt, wie bereits erwähnt, aus mehrfacher Sicht innerhalb der K<sub>Ca</sub> Kanalfamilie eine Sonderstellung ein. Abgesehen von den sieben, anstatt der üblichen sechs TM-Domänen (Wei et al., 2005; Jenkinson, 2006; Sandhiya and Dkhar, 2009), ist der BK-Kanal sowohl Liganden-gesteuert, durch [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> und [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, als auch durch Spannungsänderungen aktivierbar. Auf Grund seiner beachtlichen strukturellen Ähnlichkeit wird er dennoch den 6TM-Kanälen zugeordnet (Wei et al., 2005; Jenkinson, 2006). Mit einer Leitfähigkeit von 100-300 pS (Kaczorowski and Garcia, 1999) weist er außerdem die höchste Einzelkanal-Leitfähigkeit auf (Marty and Neher, 1985). Der BK-Kanal ist unter einer Reihe weiterer Synonyme (MaxiK, K<sub>Ca</sub>1.1, KCNMA1 und Slo1) bekannt, wobei Slowpoke1 (Slo1) das für den BK-Kanal codierende Gen in *Drosophila melanogaster* darstellt (Latorre and Brauchi, 2006; Soom et al., 2008), während KCNMA1 der Gennamen für die humane α-Untereinheit des BK-Kanals ist. Der BK-Kanal setzt sich aus einem Tetramer aus vier α-Untereinheiten zusammen (Shen et al., 1994), welche mit einer variablen Anzahl an modulatorischen β- und γ-Untereinheiten assoziiert sein können (Ramanathan and Fuchs, 2002; Kotlikoff and Hall, 2003; Yan and Aldrich, 2010; Zhang and Yan, 2014; Gonzalez-Perez et al., 2015)



**Abb. 1.2: Modelldarstellung des BK-Kanals und seiner Untereinheiten**

Die  $\alpha$ -Untereinheit setzt sich aus sieben Transmembrandomänen (0-6) zusammen, die den Spannungssensor beinhalten und die Kanalpore ausbilden. Der etwa 800 Aminosäuren lange C-Terminus enthält 4 hydrophobe Segmente (dunkelblau) und ist intrazellulär lokalisiert. Die hierin enthaltene Calcium-bowl stellt eine von zwei RCK-Domänen dar und dient als Calciumsensor. Die akzessorische  $\beta$ -Untereinheit setzt sich aus 2 Transmembrandomänen zusammen, welche über einen extrazellulären Loop verbunden sind und kann die Kanalaktivität über Interaktion mit der  $\alpha$ -Untereinheit modulieren. Die ebenfalls akzessorische  $\gamma$ -Untereinheit beinhaltet eine Transmembrandomäne und zeichnet sich durch einen großen extrazellulären Rest mit einer Abfolge von Leucin-reichen Motiven aus. Sie besitzt ebenfalls modulatorische Eigenschaften und ermöglicht eine Kanalaktivierung bei sehr negativen Membranpotentialen. (Quelle: JProf. Dr. Robert Lukowski, Univ. Tübingen)

### 1.1.1.1 Aufbau, Struktur und Aktivierung des BK-Kanals

#### $\alpha$ -Untereinheiten

Die  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals beinhaltet eine zusätzliche TM S0-Domäne, wodurch die kurze N-terminale Sequenz extrazellulär lokalisiert ist und mit akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten interagieren kann (Wallner et al., 1996). Außerdem kommuniziert die S0-Domäne direkt mit dem Spannungssensor des Kanals und beeinflusst hierüber sowohl die Konformation des offenen, als auch jene, des geschlossenen BK-Kanals (Koval et al., 2007; Liu et al., 2008b). Der C-Terminus ist hingegen nach intrazellulär orientiert. Er umfasst vier weitere hydrophobe Abschnitte (S7-S10) (Wallner et al., 1996; Meera et al., 1997; Toro et al., 1998). Die eigentliche Kanalpore wird durch eine, in die Membran hinein ragende, Aminosäuresequenz zwischen den Segmenten S5 und S6 ausgebildet und enthält die für Kaliumkanäle typische Konsensus-Sequenz, welche den  $K^+$ -Selektivitätsfilter darstellt (s. Kapitel 1.1) (Salkoff et al., 2006). Das S4-Segment beinhaltet eine konservierte Sequenz aus mehreren positiv geladenen Arginin-Resten und bildet zusammen mit vier weiteren Aspartat- und Argininresten innerhalb der S1-S3 Domänen den primären Spannungssensor (VSD, *voltage sensor domain*) (Horrigan and Aldrich, 1999; Liu et al., 2008a). Durch dessen Aktivierung kommt es, wie auch bei der Aktivierung durch  $Ca^{2+}$ , zu einer Konformationsänderung des Kanals, wodurch die Porenregion öffnet und somit einen Kalium-Ausstrom ermöglicht (Xia et al., 2002; Magleby, 2003; Niu et al., 2004). Die Spannungsabhängigkeit der BK-Öffnung variiert dabei stark in Abhängigkeit der intrazellulären Calcium-Konzentration, weshalb BK-Kanäle sehr oft in Caveolin-reichen Abschnitten der Zellmembranen physiologisch an spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle gekoppelt sind. Hierüber werden lokal hohe  $[Ca^{2+}]_i$  erreicht, was wiederum die BK-Kanal-Öffnung erleichtert (Lu et al., 2006). Auch das Ruhemembranpotential spielt für die spannungsabhängige Aktivierung des

Kanales eine zentrale Rolle. So kann der BK-Kanal in erregbaren Zellen im Bereich positiver Spannungen auch unabhängig von einer Aktivierung der VSDs in den aktiven Zustand übergehen (Horrigan and Aldrich, 1999). Eine Erklärung hierfür bietet das von *Horrigan et al.* entwickelte Modell zur allosterischen Öffnung des Kanals, welches zwei Schritte der Konformationsänderung beschreibt. Zum einen die Aktivierung der VSD, zum anderen die Öffnung des BK-Kanals. Keiner der beiden Schritte ist für den anderen unabdingbar, allerdings beeinflussen sie sich gegenseitig über einen allosterischen Mechanismus (Cui et al., 1997; Horrigan and Aldrich, 1999; Cui et al., 2009).

Der große intrazelluläre C-Terminus weist mehrere verschiedene Sequenzen zur Regulation der Kaliumleitfähigkeit auf, die sogenannten RCK-Domänen (*regulator of conductance for K<sup>+</sup>*), und beinhaltet außerdem mehrere sensorische Abschnitte für weitere intrazelluläre Liganden. Während geringe Änderungen im intrazellulären Haushalt nur wenige BK-Kanäle aktivieren, können lokale Ca<sup>2+</sup>-Spitzen zusätzliche Kanäle akquirieren (Clapham, 2007). Durch den starken Kalium-Efflux kommt es über einen negativen Feedback-Mechanismus zu einer effizienten Repolarisation der Membran in Folge dessen spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle wieder schließen und der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom versiegt. Wie in den späten 1990er Jahren entdeckt wurde, kann neben Calcium-Ionen und Spannungsänderungen auch intrazelluläres Magnesium ([Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) den BK-Kanal Calcium-unabhängig aktivieren (Golowasch et al., 1986; Oberhauser et al., 1988; Shi and Cui, 2001; Zhang et al., 2001; Yang et al., 2007).

Native BK-Kanäle sind sehr oft Teil makro-molekularer Signalkomplexe, welche weitere Ionenkanäle (Berkefeld et al., 2006; Fakler and Adelman, 2008) und/oder Enzyme (Alioua et al., 2002; Williams et al., 2004; Lu et al., 2006) beinhalten, die beispielsweise über De-/Phosphorylierung und/oder Oxidationsmechanismen die BK-Aktivität beeinflussen (Schubert and Nelson, 2001; Santarelli et al., 2004). Darüber hinaus können auch Moleküle wie Lipide, Häm, Protonen (H<sup>+</sup>) Kohlenstoffmonoxid (CO) oder Stickstoffspezies die BK-Kanalfunktion modulieren. Proteinkinasen wie die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI) oder auch die Proteinkinase C (PKC) beeinflussen die Zellfunktion, indem sie die apparente Ca<sup>2+</sup>- und Spannungs-Sensitivität des BK-Kanals modulieren (Schubert and Nelson, 2001). Letztere scheint in glatten Muskelzellen den BK-Kanal zu inhibieren, während sowohl die PKA als auch die cGKI zu einer Aktivierung führen, was sich primär in einem Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität des BK-Kanals manifestiert (Nelson and Quayle, 1995; Jaggar et al., 2000). Darüber hinaus scheinen auch die cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP sowohl über eine Kreuzaktivierung der cGKI und nachfolgender Phosphorylierung (White et al., 2000) sowie über direkte Interaktion mit einer Kanal-assoziierten Kinase BK-Kanäle zu aktivieren (Peng et al., 1996; Schubert and Nelson, 2001; Zhou et al., 2001). Der BK-Kanal reagiert außerdem auf steigende [H<sup>+</sup>]<sub>i</sub> durch Öffnung der Kanalpore (Maingret et al., 1999), wodurch der Kaliumstrom erhöht wird ohne dabei die Einzelkanal-Ströme zu beeinflussen (Hayabuchi et al., 1998; Avdonin et al., 2003; Park et al., 2007; Hou et al., 2008). Auch freies intrazelluläres Häm fungiert möglicherweise als Signalmolekül am BK-Kanal. Durch die Koordination von Häm kommt es möglicherweise zu einer Vergrößerung des *gating rings* und somit zu dessen Interaktion mit der VSD (Horrigan et al., 2005). Auch das durch den Abbau von Häm mittels Häm-Oxygenase (HMOX) entstehende Degradationsprodukt CO übt modulatorische Effekte auf den BK-Kanal aus.

Dabei scheint sowohl eine direkte Aktivierung des Kanals durch CO zu erfolgen, wie auch eine cGMP-abhängige Phosphorylierung des Kanals nach CO Stimulation (White et al., 2000; Jaggar et al., 2002; Johnson et al., 2003; Xi et al., 2004). Die Hypothese, dass es sich bei dem BK-Kanal um einen membranständigen Gas-Sensor handelt (Jaggar et al., 2002) wird von der Modifikation des Kanals durch reaktive Sauerstoff-Spezies und Stickstoff-haltige Gase untermauert (Hou et al., 2009). Auch eine Modulierung des BK-Kanals durch Lipide, insbesondere die Beeinflussung der spannungs-abhängigen Öffnung durch membranständige Phospholipide, konnte gezeigt werden (Xu et al., 2008; Zhou et al., 2012).

Neben der Vielzahl an modulierenden intrazellulären Liganden, ist die Funktion des BK-Kanals sehr stark von der Interaktion mit modulatorischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten abhängig (Lu et al., 2006; Yan and Aldrich, 2010; Gonzalez-Perez et al., 2015). Jeder BK-Kanal-Komplex besteht hierbei aus einem Tetramer aus  $\alpha$ -Untereinheiten, welche mit 0-4  $\beta$ - sowie 0-4  $\gamma$ -Untereinheiten interagieren können (Garcia-Calvo et al., 1994; Yan and Aldrich, 2012; Zhang and Yan, 2014; Gonzalez-Perez et al., 2015).

### **$\beta$ -Untereinheiten**

Bislang wurden vier Gene identifiziert, welche für die verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ) des BK-Kanals codieren (Tseng-Crank et al., 1996; Wallner et al., 1996; Jiang et al., 1999; Behrens et al., 2000; Brenner et al., 2000). Die unterschiedlichen Isoformen werden Gewebe-abhängig exprimiert (Zarei et al., 2001) und besitzen eine Reihe gemeinsamer struktureller Eigenschaften. Allen vier  $\beta$ -Untereinheiten ist gemein, dass sie aus jeweils zwei transmembranären Domänen (TM) aufgebaut sind, welche über eine extrazelluläre Schleife miteinander verbunden sind. Sowohl der C- als auch der N-Terminus sind dementsprechend intrazellulär lokalisiert (Orio et al., 2002). Ihre modulatorische Wirkung auf die  $\alpha$ -Untereinheiten des BK-Kanals kommt vermutlich durch eine Interaktion der extrazellulären Schleife mit der S0-Einheit und dem ebenfalls extrazellulär lokalisierten N-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit zustande. Die  $\beta_1$ -Untereinheit wird vor allem in der glatten Muskulatur sowie in Haarzellen der Cochlea exprimiert (Orio et al., 2002), während  $\beta_2$ -Untereinheiten besonders im Gehirn und den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks exprimiert werden (Xia et al., 1998).  $\beta_3$ -Untereinheiten konnten vor allem in Pankreas und Hoden nachgewiesen werden (Xia et al., 2000),  $\beta_4$ -Untereinheiten hingegen in erster Linie im Gehirn sowie im Detrusormuskel der Blase (Brenner et al., 2000; Chen and Petkov, 2009). Die  $\beta_1$  und  $\beta_2$  Untereinheiten scheinen in erster Linie einen Anstieg der Calcium-Sensitivität des Kanals zu bedingen (Behrens et al., 2000; Brenner et al., 2000; Orio et al., 2002). Außerdem sind  $\beta_2$  Untereinheiten in der Lage, den BK-Kanal schnell und vollständig zu inaktivieren (Wallner et al., 1999; Xia et al., 1999; Uebele et al., 2000). Die verschiedenen Spleißvarianten der  $\beta_3$  Untereinheit medieren eine schnelle aber unvollständige Inaktivierung von BK-Strömen (Uebele et al., 2000; Xia et al., 2000), wohingegen  $\beta_4$  Untereinheiten komplexe Effekte auf die BK-Kanalfunktion ausüben, welche von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig sind. Während die Calcium-Sensitivität bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zusätzlich verringert wird sorgt die  $\beta_4$  Untereinheit bei hohen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  für eine höhere Sensitivität der BK-Kanäle (Brenner et al., 2000; Ha et al., 2004; Wang et al., 2006; Contreras et al., 2012)

### **$\gamma$ -Untereinheiten**

Im Laufe der letzten Jahre wurden vier weitere Strukturen identifiziert, welche mit BK- $\alpha$ -Untereinheiten interagieren und sich darüber hinaus durch ein wiederkehrendes Leucinreiches Motiv (LRRC, *leucin-rich repeat containing protein*) auszeichnen (Yan and Aldrich, 2012; Hoshi et al., 2013; Zhang and Yan, 2014). Auf Grund gegenüber den  $\beta$ -Untereinheiten klar verschiedenen modulatorischen Eigenschaften wurden diese als neue Gruppe von Untereinheiten klassifiziert. Die  $\gamma$ -Untereinheiten entfalten ihre BK-Kanal modulierenden Eigenschaften, indem sie dessen Spannungs-Abhängigkeit hin zu negativeren Spannungen verschieben. Das heißt, der Kanal kann auch bei sehr negativen Membranpotentialen unabhängig von der  $[Ca^{2+}]_i$  aktiviert werden (Yan and Aldrich, 2012; Zhang and Yan, 2014). Das Ausmaß dieser Linksverschiebung der spannungsabhängigen Aktivierbarkeit differiert hierbei stark zwischen den jeweiligen Untereinheiten (Yan and Aldrich, 2010, 2012; Hoshi et al., 2013; Zhang and Yan, 2014). Darüber hinaus scheint LRRC55 ( $\gamma_3$ ) auch Effekte auf die Calcium-Sensitivität des BK-Kanals zu haben (Yan and Aldrich, 2012). Auf Grund dieser Veränderung der BK-Aktivierungs-Modalitäten ermöglichen die  $\gamma$ -Untereinheiten auch in nicht-erregbaren Zellen eine Aktivierung des BK-Kanals unter physiologischen Bedingungen. Auch hinsichtlich ihres Expressionsmusters unterschieden sich die  $\gamma$ -Untereinheiten: Während  $\gamma_1$  vor allem in Trachea, Prostata und den Speicheldrüsen exprimiert wird ist  $\gamma_2$  vor allem im Skelettmuskel und den Hoden vorzufinden. Die  $\gamma_3$ -Untereinheit hingegen scheint spezifisch für das neuronale System zu sein, wohingegen sich das breite Expressionsmuster der  $\gamma_4$ -Untereinheiten über Skelettmuskel, Thymus, Nebenniere und auch Cerebellum und Hoden erstreckt (Yan and Aldrich, 2012; Evanson et al., 2014; Zhang and Yan, 2014). Für Fettgewebe wurde unseres Wissens bislang keine Untersuchung zur Expression der  $\gamma$ -Untereinheiten durchgeführt.

#### **1.1.1.2 Gewebeverteilung von BK-Kanälen**

Der BK-Kanal wird weitgehend ubiquitär in einer Vielzahl von verschiedenen Zellen und Geweben exprimiert (Salkoff et al., 2006). Insbesondere in erregbaren Zellen wie glatten Muskelzellen und Neuronen des zentralen sowie des enterischen Nervensystems ist die BK-Expression signifikant stärker ausgeprägt, als in anderen Gewebetypen (Gribkoff et al., 2001; Latorre and Brauchi, 2006). Diese weitreichende BK-Kanalexpression spiegelt, neben den vielfältigen Möglichkeiten der Aktivierung und Modulation, die besondere Bedeutung des BK-Kanals und seine facettenreichen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen wieder. Der BK-Kanal wurde jedoch nicht nur in der äußeren Zellmembran verschiedener Gewebe (Wellman and Nelson, 2003), sondern auch in den inneren Mitochondrien-Membranen von Monozyten, Kardiomyozyten, Neuronen und anderen Zellsystemen nachgewiesen (Zoratti et al., 2009; Balderas et al., 2015). Insbesondere in glattmuskulären Geweben spielt der BK-Kanal eine zentrale Rolle und seine Expression konnte bislang unter anderem in Organen wie Darm, Harnblase, Atemwegen, Gefäßen und dem *Corpus cavernosum* (Savaria et al., 1992; McCobb et al., 1995; Herrera et al., 2000; Werner et al., 2005) nachgewiesen werden. Eine besonders starke BK-Kanalexpression konnte mittels immunhistochemischer Färbungen und *in situ* Hybridisierungs-Experimenten in bestimmten Regionen des Gehirns nachgewiesen werden (Sausbier et al., 2004; Sausbier et al., 2006). Im

Telencephalon konnten insbesondere im cerebralen Cortex, im Olfaktorischen Bulb sowie in den Basalganglien und dem Hippocampus ausgeprägte BK-Kanal Färbungen detektiert werden. Im Zwischenhirn wies die BK-Expression vor allem in Kernregionen des dorsalen und ventralen Thalamus eine hohe Dichte auf und auch der *Locus Coeruleus* und der Vestibularapparat wiesen in entsprechenden Untersuchungen eine starke BK-Immunreaktivität auf (Sausbier et al., 2006). Auf zellulärer Ebene scheinen BK-Kanäle sowohl prä- als auch postsynaptische lokalisiert zu sein und insbesondere in Somata, Dendriten, Axonen und synaptischen Endknöpfchen vorzukommen (Sausbier et al., 2004; Sausbier et al., 2006), wo sie auf Grund ansteigender intrazellulärer Calciumkonzentrationen durch Öffnung von Liganden-abhängigen (Isaacson and Murphy, 2001) oder Spannungs-abhängigen Calciumkanälen (Womack et al., 2004), sowie durch die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern über Ryanodin-Rezeptoren (Chavis et al., 1998) aktiviert werden können. Für das Cerebellum konnte gezeigt werden, dass BK-Kanal mRNA vorwiegend in Purkinjezell-Somata exprimiert wird, wohingegen die mRNA-Expressionslevel der Molekularschicht sowie der Körnerzellschicht deutlich schwächer ausgeprägt waren (Sausbier et al., 2006). Auf Proteinebene hingegen, konnte mittels immunhistochemischer Färbung vor allem in der Molekularschicht, im Soma von Purkinjezellen sowie in der Körnerzellschicht eine starke BK-Kanal Expression detektiert werden (Sausbier et al., 2006). Dass der BK-Kanal auch in den inneren Haarzellen der Cochlea exprimiert wird und dort eine zentrale Rolle hinsichtlich des altersabhängigen Hörvermögens spielt, belegen verschiedene Studien (Ruttiger et al., 2004; Beurg et al., 2005). Weitere Sinneswahrnehmungen wie beispielsweise Riechvorgänge, werden vermutlich ebenfalls BK-abhängig moduliert, worauf die besonders starke BK-Expression beispielsweise im Olfaktorischen Bulb hindeutet (Sausbier et al., 2006). Erst kürzlich konnten Forscher nachweisen, dass die BK-Kanal-Aktivität in direktem Zusammenhang mit den Geruchssensitivität von *Xenopus laevis* steht (Bao et al., 2015).

### 1.1.1.3 Die physiologischen Funktionen des BK-Kanals

Der BK-Kanal hat eine wichtige Steuerungsfunktion für die Regulation des Membranpotentials und die damit verbundenen physiologischen Abläufe. Durch seine Aktivierung kommt es unter physiologischen Bedingungen zu einem vermehrten Kaliumausstrom aus der Zelle, was wiederum für eine Hyperpolarisation der Membran und damit einhergehend eine verringerte Erregbarkeit der entsprechenden Membranen verantwortlich ist. Da dies zum Schließen spannungsabhängiger Calciumkanäle führt, ist der BK-Kanal unter anderem auch in der Lage, die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter durch die Steuerung der intrazellulären Calciumionenkonzentration zu regulieren.

Für eine detaillierte Aufklärung der Rolle des BK-Kanals in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen war neben *in vitro* Analysen insbesondere die Generierung einer BK-Kanal-defizienten Mauslinie (BK<sup>L1/L1</sup>) ein probates Mittel für weitere Untersuchungen. Die Deletion des Exon 7, welches für die Porenbildende Region sowie einen Abschnitt des S6-Segmentes codiert (Sausbier et al., 2004), ist wie beschrieben mit cerebellärer Ataxie und Störungen der lokomotorischen Aktivität, sowie einer Purkinjezell-Dysfunktion assoziiert (Sausbier et al., 2004). Des Weiteren weisen BK-Kanal-defiziente Tiere eine ausgeprägte Hypertonie auf (Patterson et al., 2002; Kotlikoff and Hall, 2003; Sausbier et al., 2005; Wu and

Marx, 2010), welche mit einem vorliegenden Hyperaldosteronismus sowie einer beeinträchtigten Vasodilatation, insbesondere der kleinen Arterien und Arteriolen, einhergeht (Sausbier et al., 2005; Ledoux et al., 2006; Wu and Marx, 2010). Auch weitere glattmuskuläre Organe, welche den BK-Kanal exprimieren, werden engmaschig von der BK-Funktion kontrolliert und gesteuert. Neben der Kontraktilität der glatten Muskulatur der Blutgefäße konnte auch gezeigt werden, dass die Kontraktionsfähigkeit des Darms durch BK-Kanäle beeinflusst wird. Sowohl die globale, als auch eine glattemuskelspezifische Deletion des Kanals führte in Kontraktionsuntersuchungen an Ileumringen im Organbad zu einer erhöhten Kontraktilität des Ileums, sowie zu einer verminderten cGMP-vermittelten Relaxation der ilealen Ringmuskulatur (unveröffentlichte Diplomarbeit, Julia Illison, Universität Tübingen, 2010). Neben der Kontraktilität des Darmes wird auch die Kalium-Sekretion im Kolon direkt durch die BK-Kanal-Aktivität beeinflusst (Sorensen et al., 2008; Sorensen et al., 2010). Des Weiteren führt eine Dysfunktion des glattemuskulären BK-Kanals zu Reizblasensymptomatik und Inkontinenz (Meredith et al., 2004; Sprossmann et al., 2009; Hristov et al., 2013) und ist darüber hinaus mit Erkrankungen wie erektiler Dysfunktion (Werner et al., 2005; Werner et al., 2008; Zhang et al., 2010b) assoziiert. Auch auf die bronchiale Kontraktilität scheint der BK-Kanal Einfluss zu nehmen, da BK-Kanal-defiziente Mutanten sowohl eine reduzierte cholinerge Bronchokonstriktion aufweisen, als auch eine verstärkte Isoprenalin-mediierte Bronchodilatation. Dies macht deutlich, dass der BK-Kanal eine dominante Rolle in der Regulation des Tonus der Atemwegsmuskulatur spielt und seine Deletion mit einer verminderten bronchialen Kontraktilität assoziiert ist. Neben glattemuskulären Effekten ist der BK-Kanal auch an der vesikulären Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt. In diesem Zusammenhang wurden auch Effekte des BK-Kanals auf die Insulinfreisetzung aus pankreatischen  $\beta$ -Zellen untersucht. So konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass die Deletion des BK Kanals *in vitro* zu einer verringerten Insulinfreisetzung infolge eines Glucose-Stimulus führt. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die beobachtete verschlechterte Glucosetoleranz der BK<sup>L1/L1</sup> *in vivo* dar (Dufer et al., 2011).

Neben der Deletion des BK-Kanals scheint auch die verstärkte Aktivität des Kanals mit einer Reihe von Krankheiten assoziiert. Du et al. konnten in einer Studie mit humanen Probanden zeigen, dass eine erblich bedingte Mutation des KCNMA1-Gens, welche durch Steigerung der Calcium-Sensitivität des Kanals zu einer Zunahme der BK-Aktivität führt, direkt mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung primär generalisierter epileptischer Anfälle einhergeht (Du et al., 2005). In einer genomweiten Assoziationsstudie konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen schwerer Adipositas und einem SNP im KCNMA1-Gen in Menschen festgestellt werden. Dieser Befund wird in Kapitel 1.6 näher erörtert.

## 1.2 Übergewicht und Adipositas: Ätiologie, Pathologie und Folgeerkrankungen einer Volkskrankheit

Das Auftreten von Übergewicht und Adipositas hat in den letzten Jahren immer mehr zugenommen und mittlerweile weltweit pandemische Ausmaße angenommen. Allein in den Jahren von 1980 bis 2014 hat sich die Zahl der übergewichtigen und adipösen Erwachsenen mehr als verdoppelt. Darüber hinaus nimmt diese Volkskrankheit vor allem auch im Kindes- und Jugendalter alarmierende Ausmaße an. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) gibt an, dass im Jahr 2014 weltweit mehr als 1,9 Milliarden Menschen über 18 Jahren an Übergewicht litten. Mehr als 600 Millionen davon, wurden sogar als adipös klassifiziert. Dies entspricht 39% bzw. 13% der Bevölkerung. Besonders alarmierend sind Erkenntnisse, dass darüber hinaus im Jahr 2013 bereits mehr als 42 Millionen Kinder unter 5 Jahren an Übergewicht oder Adipositas litten (WHO, Fact sheet N°311, 2015). Obwohl die WHO, in Zusammenarbeit mit vielen Staaten, weitreichende Maßnahmen und Kampagnen zum Kampf gegen Übergewicht und Adipositas gestartet hat nimmt deren Prävalenz in mehr als der Hälfte aller Länder weiterhin massiv zu. So konnte in einer großangelegten Untersuchung der WHO in Europa zwischen 2001 und 2005 lediglich in 4 Ländern (Deutschland, Österreich, Frankreich, Vereinigtes Königreich (England)) ein leichter Rückgang an kindlichem und jugendlichem Übergewicht verzeichnet werden. Männer und Jungen scheinen grundsätzlich häufiger von Übergewicht und Adipositas betroffen zu sein, als Frauen und Mädchen. (WHO, Fact sheet 2.3, 2009).

In den meisten Fällen kommt Übergewicht durch ein Ungleichgewicht zwischen zugeführter und verbrauchter Energie zustande. In der heutigen Gesellschaft werden körperliche Tätigkeiten immer mehr durch Aufgaben ersetzt, welche ohne größere körperliche Anstrengung im Sitzen oder Stehen absolviert werden können. Durch das steigende Angebot an öffentlichen und privaten Verkehrsmitteln reduziert sich außerdem auch die täglich zu Fuß zurückgelegte Strecke stark, was in den meisten entwickelten Ländern sowie in Entwicklungsländern in einem allgemeinen Bewegungsmangel resultiert. Zur gleichen Zeit nimmt die täglich pro Kopf zugeführte Energie massiv zu. Während die tägliche Kalorienzufuhr pro Person im Jahr 1963 bei durchschnittlich 2300 kcal lag, waren es 1971 bereits 2440 kcal, 1992 sogar 2720 kcal und für das Jahr 2010 lag der prognostizierte durchschnittliche Energiekonsum bei 2900 kcal pro Tag (WHO, 2000) (Seidell, 2000). Dies ist zum einen auf ein massiv erhöhtes Nahrungsangebot in den letzten Jahrzehnten zurück zu führen, aber auch die Zusammensetzung und Art unserer Ernährung hat sich in den letzten Jahren stark verändert. Die Energiedichte der Nahrung und insbesondere auch der zugeführten Getränke, ist durch den hohen Anteil an Fett und Zucker in diesen Lebensmitteln immer mehr gestiegen. Gleichzeitig werden immer weniger Ballaststoffe, Mineralien und natürliche Vitamine konsumiert, was zu einer kalorischen Überernährung bei oftmals gleichzeitig auftretenden Mangelerscheinungen führt.

Auffallend bei dieser Entwicklung ist außerdem, dass auch in immer mehr Entwicklungsländern Übergewicht zu einem pandemischen Problem wird. Diese Länder und auch Länder mit einem mittleren Einkommen, haben hierbei immer häufiger mit einer doppelten Last zu kämpfen: Während in weiten Landstrichen Unterernährung noch immer ein

großes Problem darstellt, nimmt Adipositas in diesen Ländern aus sozioökonomischen Gründen zur gleichen Zeit ebenfalls immer mehr zu, da Zucker- und Fett-reiche Nahrung mit einer hohen Kaloriendichte oftmals deutlich günstiger und auch leichter zu erwerben sind, als eine ausgewogene, Ballaststoff und Gemüse- bzw. Obst-reiche Ernährung. (WHO, Fact sheet N°311, 2015).

Die durch verschiedene Faktoren bedingte Entwicklung von Übergewicht geht in der Regel nicht nur mit einer stark gesteigerten Fetteinlagerung in den eigentlichen Fettdepots einher, sondern auch mit massiver Fettakkumulation in Organen wie Leber und Muskulatur, was in der Folge zu Muskelschwäche und einer Nicht-Alkohol-induzierten Fettleber (NAFLD), sowie daraus resultierend zu einer Lebersteatose und bis hin zum Lebercarzinom führen kann (Lavallard and Gual, 2014; Saponaro et al., 2015). Darüber hinaus sind auch pankreatische Inselzellen von einer vermehrten Fettanreicherung betroffen, was direkten Einfluss auf die  $\beta$ -Zellfunktion haben kann. Da Fettgewebe neben seiner Funktion als Fettspeicher und mechanischem Schutz auch sezernierende Effekte hat, wird durch einen Anstieg der Körperfettmasse auch die Menge der sezernierten Adipokine wie Adiponektin, Leptin und Resistin erhöht. Auch Entzündungsmediatoren wie TNF $\alpha$  oder Interleukine werden im Fettgewebe gebildet und aus diesem abgegeben, was wiederum zur chemotaktischen Anlockung von Makrophagen und deren Aktivierung führen kann. Diese aktivierten Makrophagen sind wiederum in der Lage weitere Cytokine freizusetzen, was zu einer massiven Aktivierung von Makrophagen und Monozyten führt (Roth et al., 2004) und mit einer Abnahme der Insulinsensitivität einhergeht (Xu et al., 2003b; Nishimura et al., 2009a). Wie Untersuchungen im Tiermodell zeigen konnten, scheinen insbesondere CD8-positive T-Zellen bei der Entzündungs-assoziierten Insulinresistenz eine zentrale Rolle zu spielen (Nishimura et al., 2009a; Nishimura et al., 2009b). Adipositas kann außerdem zu schweren Stoffwechselstörungen, insbesondere zur Manifestation von Diabetes mellitus Typ 2 führen (Colditz et al., 1990; Harris et al., 1998). Interessanterweise ist auch die Häufigkeit des Auftretens von Diabetes mellitus Typ 1 in Gegenwart von Fettleibigkeit erhöht (Hypponen et al., 2000; Kibirige et al., 2003). Darüber hinaus ist auch bekannt, dass die Koexistenz von Adipositas und chronischer Hyperglykämie vermehrt zu vaskulären Schädigungen führt (Combe et al., 2004; Kanaya et al., 2004). Da diese wiederum einen Risikofaktor für die Entstehung einer (vaskulären) Demenz darstellen ist es nicht weiter verwunderlich, dass Hyperglykämie und Fettleibigkeit auch das Demenzrisiko massiv steigern (Gustafson et al., 2003; Kanaya et al., 2004; Arnoldussen et al., 2014). Weitere Folgeerkrankungen und Endorganschädigungen wie Hypertonie und andere kardiovaskuläre Erkrankungen (Mahajan et al., 2015), Hypoventilation und obstruktive Atemwegsbeschwerden (Verbraecken and McNicholas, 2013; Jones et al., 2015), Gelenkschmerzen, Arthrose und rheumatoide Arthritis (Daien and Sellam, 2015) (Pedersen et al., 2006; Crowson et al., 2013; Wesley et al., 2013) können ebenso eine Folge von Überernährung und Adipositas sein, wie Pankreaskarzinome und andere Krebserkrankungen (Berger, 2014). Aber auch psychologische Folgen von Übergewicht und Adipositas, wie soziale Ausgrenzung, massive Einschränkungen des Selbstbewusstseins bis hin zu klinischen Depressionen, teils im Zusammenhang mit erhöhter Suizidgefahr, stellen bedeutende Folgeerkrankungen von Adipositas dar.

Übergewicht ist eine weit verbreitete und komplexe, multifaktorielle Erkrankung die jedoch eine starke familiäre Häufung aufweist. Dieses vermehrte Auftreten innerhalb einer Familie, ist nicht nur auf sozioökonomische Ursachen wie das Essverhalten und den Lebensstil zurückzuführen, sondern beruht oftmals auf genetischen Faktoren und deren hoher Erbllichkeit, welche die Entstehung von Adipositas begünstigen oder ihre Ausprägung verstärken (Bouchard, 1991; Farooqi et al., 2003; Roth et al., 2004; Farooqi, 2008; Lee, 2009; Ahmad et al., 2013). Dies konnte anhand von Zwillingsstudien und Studien mit adoptierten Kindern festgemacht werden, welche zeigten, dass die Häufung von Adipositas unter eineiigen Zwillingen deutlich stärker ausgeprägt ist, als unter zweieiigen Zwillingen oder anderen Geschwistern (Stunkard et al., 1986a; Allison et al., 1996; Maes et al., 1997). Das Körpergewicht und der BMI adoptierter Kinder hingegen glich oftmals eher dem der biologischen Eltern, als dem der Adoptiveltern in deren Umfeld die Kinder aufwuchsen (Stunkard et al., 1986b; Bouchard et al., 1988; Tambs et al., 1992; Vogler et al., 1995). Diese Befunde lassen auf eine genetische Prädisposition mancher Personengruppen gegenüber der Entwicklung von Übergewicht und Adipositas schließen (Friedman, 2003). Entwicklungsgeschichtlich stellten diese einen Vorteil hinsichtlich einem Schutz gegenüber Hunger und Unterernährung dar, in der heutigen, adipogenen Umgebung aus übersteigertem Nahrungsangebot, einhergehend mit oft massivem Bewegungsmangel, unterstützen sie jedoch die Ausprägung und Ausbreitung von Adipositas. In den letzten Jahren wurden unter anderem eine Vielzahl an Genom-weiten Untersuchungen und Assoziations-Studien durchgeführt, um die genauen zu Grunde liegenden genetischen Variationen zu erfassen. Da der adipöse Phänotyp jedoch, sogar innerhalb einer Familie auf Grund einer Vielzahl an weiteren Einflüssen wie Umfeld, Verhalten, Einkommen etc., eine sehr heterogene Ausprägung hat, waren diese nur von geringem Erfolg gezeichnet (Lee, 2009). Lediglich für wenige, schwere Formen der Adipositas, wie dem Bardet-Biedl- oder dem Prader-Willi-Syndrom, war es bislang möglich, die verursachenden Gene zu identifizieren, wobei ihre der Pathogenese zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch immer weitgehend unklar sind (Boutin and Froguel, 2001). Wie Übergewicht scheint auch Schlankheit erblich zu sein (Forbes et al., 1995), weshalb auch die Erforschung von „Schlank-Genen“ einen neuen Ansatz für potentielle Therapieansätze zur Bekämpfung von Adipositas darstellt.

Die WHO definiert Übergewicht und Adipositas hierbei anhand des BMI (*Body-Mass-Index*), dem Verhältnis des Körpergewichtes [kg] zum Quadrat der Körpergröße [cm<sup>2</sup>].

<b>Klassifizierung</b>	<b>BMI</b>
Untergewicht	< 18,5
Normalgewicht	18,5-24,9
Übergewicht	25,0-29,9
Adipositas Grad I	30,0-34,9
Adipositas Grad II	35,0-39,9
Adipositas Grad III	≥40,0

**Tab. 1.1: Klassifizierung von Adipositas anhand des Body-Mass-Index (BMI)**

Diese Diagnosemethode betrachtet jedoch lediglich das Gesamtkörpergewicht, nicht jedoch den Muskel- und Fettanteil der Patienten, so dass auch Personen mit einer sehr hohen Muskelmasse und nur geringem Fettanteil einen erhöhten BMI aufweisen und somit fälschlich

als adipös klassifiziert werden. Darüber hinaus ist bekannt, dass nicht nur der allgemeine Fettanteil, sondern insbesondere die Verteilung des Körperfettes hinsichtlich der Entstehung von Folgeerkrankungen eine zentrale Rolle spielt. Die vorwiegend bei Frauen beobachtete gynoide Form der Fettleibigkeit beschreibt eine vermehrte Einlagerung von Fett im gluteofemorale Bereich des Körpers (Pouliot et al., 1990; Terry et al., 1991; Pouliot et al., 1994) und stellt nur ein geringfügig erhöhtes Risiko für die kardiovaskuläre Gesundheit dar. Beim sogenannten Androiden Typ, welcher sich durch eine vermehrte Fetteinlagerung im oberen Körperbereich auszeichnet und vor allem bei Männern vorkommt, kommt es hingegen zu einer massiven Anreicherung von viszeralem Bauchfett (Kissebah et al., 1989). Insbesondere diese Einlagerung von viszeralem Fett ist mit schwerwiegenden metabolischen und kardiovaskulären Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 (Pyorala et al., 1987; Kissebah et al., 1989) und daraus resultierende Retinopathien, Neuropathien oder auch Nephropathien, sowie makrovaskulären Erkrankungen (Pyorala et al., 1987), Glucoseintoleranz, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz assoziiert (Bergstrom et al., 1990; Pouliot et al., 1992; Despres et al., 2001). Aus diesem Grund ist eine Beurteilung von Übergewicht oder Adipositas allein anhand des BMI wenig aussagekräftig. Auch das gerne verwendete Taillen-Hüft-Verhältnis weist Schwächen auf, da eine allgemeine Zunahme des Körpergewichtes sowohl zu einer Zunahme des Hüft- als auch des Taillenumfanges führen kann und somit nicht notwendigerweise auch mit einer Veränderung des Taillen-Hüft-Verhältnisses einhergehen muss (Pouliot et al., 1994; Lemieux et al., 1996). Aus diesem Grund ist eine einfache Messung des Taillenumfanges (Pouliot et al., 1994; Lemieux et al., 1996) oder eine Körperstrukturanalyse mittels bildgebender Verfahren oder bioelektrischer Impedanzmessung wesentlich besser geeignet, das Ausmaß einer Adipositas, sowie die damit assoziierten Risiken für kardiovaskuläre oder metabolische Folgeerkrankungen abschätzen zu können. Wie Forscher erst jüngst nachweisen konnten, spielt neben genetischer Prädisposition und dem Umfeld, sowie dem persönlichen Verhalten, auch das Darmmikrobiom eine essentielle Rolle bei der Regulation des Körpergewichtes. Erste Untersuchungen zum Zusammenhang des Darmmikrobioms und Körpergewichtsveränderungen im Mausmodell zeigten auf, dass Wildtyp-Tiere 42% mehr Körperfett aufwiesen als keimfreie Tiere, obwohl diese wiederum 29% mehr Futter zu sich nahmen (Backhed et al., 2004). Die Verabreichung von zökalen Proben aus Wildtyp-Tieren führte in keimfreien Mäusen sogar zu einer Zunahme des Körperfettanteils um 57% und einem Anstieg von 61% hinsichtlich des eWAT (Backhed et al., 2004), was durch die Gabe von Fäkalproben aus ob/ob Tieren noch gesteigert werden konnte (Weaver et al., 1986). Außerdem konnte die Gabe von therapeutisch modifizierten Bakterien im Mausmodell das Körpergewicht von Tieren auf Hochfett-Diät deutlich und signifikant reduzieren (Chen et al., 2014) und auch in Menschen konnten erste, erfolgreiche Stuhltransplantationen zur Reduktion des Körpergewichtes durchgeführt werden (Ley et al., 2005). So ist es nicht weiter verwunderlich, dass die Gabe von Antibiotika im Zuge der Behandlung bakterieller Infektionen durch ihren Eingriff in die Zusammensetzung des Darmmikrobioms auch die Nährstoffverwertung nachhaltig beeinflussen kann (Ley et al., 2005; Ley et al., 2006). Diese Veränderungen in der Nahrungsverwertung können die Entstehung von Adipositas fördern, weshalb Antibiotika oftmals auch in der Tierzucht Anwendung finden (Gustafson and Bowen, 1997). Es scheint dementsprechend, als hätten die schätzungsweise 10<sup>14</sup> verschiedenen

Mikroben unseres Gastrointestinaltraktes weitreichende Einflüsse auf Metabolismus und Energiehomöostase (Savage, 1977; Backhed et al., 2005). Insbesondere drei verschiedene Enterotypen können hierbei differenziert werden: Enterotyp 1 weist einen besonders hohen Anteil, an *Bacteroides* auf, während sich Enterotyp 2 durch eine Anreicherung von *Prevotella* im Colon auszeichnet. Im Enterotyp 3 hingegen stehen vor allem *Ruminococcus* im Vordergrund (Arumugam et al., 2011). Insbesondere der Enterotyp 1, mit seiner Anreicherung an *Bacteroides*, scheint mit einer Vielzahl an Krankheiten wie Morbus Crohn, Diabetes mellitus Typ 2 und auch Adipositas assoziiert (Turnbaugh et al., 2009; Arumugam et al., 2011). Aber auch das Verhältnis von *Firmicutes* und *Bacteroides* scheinen sowohl in Maus als auch Mensch eine wichtige Rolle hinsichtlich Adipositas zu spielen (Schwartz et al., 2010; Zhang et al., 2010a). Obwohl die Datenlage teilweise widersprüchlich ist, verdichten sich die Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen erniedrigten *Bacteroides* Leveln und der Entstehung von Adipositas (Ley et al., 2005; Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006). So konnten in übergewichtigen Menschen, gegenüber Schlanken, reduzierte Level an *Bacteroides* nachgewiesen werden. Vor allem ein Gewichtsverlust dieser Subjekte konnte den Anteil an *Bacteroides* über die Zeit wieder steigern, während die Zusammensetzung und der Kaloriengehalt der Nahrung wenig Einfluss auf das Darm-Mikrobiom hatten (Ley et al., 2006). Veränderungen der Darm-Mikrobiom-Populationen scheinen dementsprechend in direktem Zusammenhang mit Veränderungen der Körpergewichtes zu stehen (Ley et al., 2006; Barlow et al., 2015).

## 1.3 Die Energiehomöostase

Ein äußerst komplexes System aus verschiedenen afferenten Signalwegen und efferenten Effektoren moduliert und steuert die Energiehomöostase, welche das Gleichgewicht zwischen Energiezufuhr und Energieverbrauch beschreibt (Cooke and Bloom, 2006). Sowohl neuronale Schaltkreise als auch periphere hormonelle Einflüsse greifen hierbei ineinander. Kommt es zu einem chronischen Energieüberschuss in diesem fein justierten System, sind exzessive Fetteinlagerungen und Adipositas die Folge. Bereits geringfügige Verschiebungen der Energiehomöostase in den positiven Bereich um weniger als 0,5 %, können auf Dauer zu einer signifikanten Gewichtszunahme führen (Hagan and Niswender, 2012).

### 1.3.1 Zentrale Energiehomöostase

Die Nahrungsaufnahme und der Energieverbrauch werden im Körper maßgeblich durch ein komplexes neuronales Netzwerk im Vorderhirn und im Hirnstamm reguliert und gesteuert. Hierbei spielen afferente vagale Einflüsse durch zirkulierende Hormone (Insulin, Leptin, PYY, Ghrelin, etc.), Signale aus dem Gastrointestinaltrakt und Nährstoffe aus der zugeführten Nahrung (Fettsäuren, Glucose, Proteine) eine ebenso wichtige Rolle, wie höhere kortikale Faktoren und Informationen aus dem Stammhirn, wie beispielsweise körpereigene Belohnungssysteme und Emotionen (Elias et al., 1999; Saper et al., 2002; Simpson et al., 2009). Besonders der Hypothalamus hat eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung des energetischen Gleichgewichtes im menschlichen Körper, da er auf die beschriebenen afferenten Informationen durch efferente Signaltransduktion und die Freisetzung von

orektischen (NPY, AgRP) oder anorektischen (CART, POMC) Neuropeptiden reagiert (Williams et al., 2000; Simpson et al., 2009; Suzuki et al., 2010).

Der Hypothalamus kann in verschiedene, komplex verbundene Kernregionen unterteilt werden. Hierbei unterscheidet man den *Nucleus arcuatus* (ARC), den *Nucleus paraventricularis* (PVN), den ventromedialen Nucleus (VMN) sowie den dorsomedialen Nucleus (DMN) und laterale hypothalamische Bereiche (LHA).

### **Nucleus arcuatus**

Der Funktionen des *Nucleus arcuatus* beruhen auf zwei eigenständigen neuronalen Populationen: Während Neuronen, welche Neuropeptid Y (NPY) und *Agouti-related Protein* (AgRP) co-exprimieren die Nahrungsaufnahme steigern, können Neuronen, welche Pro-Opiomelanocortin (POMC) und Kokain- und Amphetamin-reguliertes Transkript (CART) bilden, das Hungergefühl unterdrücken und somit die Nahrungsaufnahme reduzieren. Diese neuronalen Populationen sind in der Lage mit anderen Bereichen des Hypothalamus, wie dem PVN, dem DMN oder den LHA zu kommunizieren und regulieren auf diese Weise maßgeblich die Nahrungszufuhr (Simpson et al., 2009; Suzuki et al., 2010; Suzuki et al., 2012). Die Lokalisation des ARC an der *Eminentia mediana* ist hierbei äußerst vorteilhaft, da die Blut-Hirn-Schranke in diesem Bereich durchlässig ist und den ARC somit für zirkulierende Hormone gut zugänglich macht (Broadwell and Brightman, 1976).

### **Nucleus paraventricularis**

Der *Nucleus paraventricularis* wird hauptsächlich durch Projektionen über NPY/AgRP oder POMC/CART aus dem *Nucleus arcuatus* angesteuert (Suzuki et al., 2012) und beinhaltet Neuronen, welche die anorektischen Faktoren Thyreotropin-freisetzendes Hormon (TRH) und Corticotropin-freisetzendes Hormon (CRH) exprimieren. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Injektion verschiedener Orexigene und Anorexigene in den PVN Auswirkungen auf Nahrungsaufnahme und Körpergewicht hat (Stanley et al., 2005). Eine Beschädigung des PVN steht darüber hinaus mit Hyperphagie und Adipositas im Zusammenhang (Leibowitz et al., 1981). Zusammengenommen führen diese Befunde zu dem Schluss, dass der Nucleus paraventricularis eine inhibierende Rolle hinsichtlich Nahrungsaufnahme und Körpergewichtszunahme innehat.

### **Lateraler Hypothalamus**

Neben dem PVN projiziert der Nucleus arcuatus auch in Bereiche des lateralen Hypothalamus und beinhaltet selbst in erster Linie die orektischen Neuropeptide Melanin-konzentrierendes Hormon (MCH) und Orexin, auch Hypokretin genannt (Suzuki et al., 2012). Während eine MHC-Überexpression in direktem Zusammenhang mit Übergewicht und Insulinresistenz zu stehen scheint, zeigen MHC-defiziente Tiere sowie Mäuse mit einem MHC-Rezeptor-Defekt einen schlanken Phänotyp (Ludwig et al., 2001; Marsh et al., 2002). Hypokretin exprimierende Neuronen projizieren vorwiegend in den Olfaktorischen Bulb, den Kortex sowie in verschiedene Regionen des Hypothalamus und des Stammhirns und weisen hierbei hauptsächlich orektische Effekte auf (Peyron et al., 1998; Suzuki et al., 2010; Suzuki et al., 2012). Aber auch Blutdruck, Körpertemperatur und insbesondere der Schlaf-Wach-Rhythmus werden über Orexin A und Orexin B moduliert (Peyron et al., 1998; Hagan et al., 1999; Hagan and Niswender, 2012).

### **Dorsomedialer und ventromedialer Nucleus**

Der dorsomediale Nucleus wird von NPY/AgRP-Neuronen aus dem Nucleus arcuatus angesteuert (Stanley et al., 2005; Wynne et al., 2005) und projiziert zum PVN (Jacobowitz and O'Donohue, 1978). Läsionen des DMN sind mit Adipositas und Hyperphagie assoziiert, was auf eine Appetit-zügelnde Funktion des dorsomedialen Nucleus schließen lässt (Bernardis and Bellinger, 1987; Suzuki et al., 2012). In ventromedialen Kernregionen konnten besonders starke Expressionen des BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) nachgewiesen werden. BDNF-reiche VMN-Neuronen unterdrücken die Nahrungsaufnahme über den Melanocortin 4-Rezeptor (Xu et al., 2003a). Die Deletion BDNF-reicher Neuronen in VMN oder DMN resultierte im Tiermodell in Hyperphagie und Adipositas (Unger et al., 2007).

Über direkt orektische oder anorektische Effekte hinaus scheint der Hypothalamus, insbesondere LHA, ARC und VMN, auch Glucose-Sensoren zu beinhalten, welche eine direkte Reaktion auf intrazelluläre Glucose-Level aufweisen (Gonzalez et al., 2009).

### **1.3.2 Periphere Energiehomöostase**

Neben der zentral neuronalen Steuerung von Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch im Hypothalamus oder dem Stammhirn, spielen auch periphere, meist hormonell gesteuerte Prozesse, eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel. Sezerniert werden diese Hormone aus drei verschiedenen Quellen: Neben klassischen endokrinen Organen sind auch Fettgewebe sowie der Gastrointestinaltrakt in der Lage, bestimmte Substanzen zur Steuerung der Energiehomöostase freizusetzen. Auf Grund der im Bereich des Nucleus arcuatus sowie des Stammhirns durchlässigen Blut-Hirn-Schranke, sind auch diese peripher freigesetzten Signalmoleküle in der Lage, direkt mit dem Hypothalamus zu interagieren und das Sättigungsgefühl zu modulieren (Chaudhri et al., 2008a).

Bei der Nährstoffbedingten Freisetzung von Hormonen, können olfaktorische, akustische oder visuelle Reize bereits in der kephalen Phase, vor der Aufnahme von Nahrung, neuronale Signalkaskaden auslösen und hierbei die Nahrungsaufnahme, sowie das Sättigungsgefühl beeinflussen (Valassi et al., 2008).

#### **1.3.2.1 Intestinale und pankreatische Hormone**

Der Darm-Pankreas Komplex spielt auf Grund der Vielzahl an hier sezernierten Peptiden eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Energiehomöostase (Murphy and Bloom, 2006; Chaudhri et al., 2008b; Chaudhri et al., 2008c). Neben den pankreatischen Polypeptiden sind hinsichtlich der Darm-Hirn-Achse auch Folgeprodukte des Proglucagon, sowie Ghrelin, Obestatin, Cholecystokinin und Amylin von großer Bedeutung.

#### **Insulin**

Insulin ist das möglicherweise am besten untersuchte Hormon in der Regulation von Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase. Es stellt hierbei einen der wichtigsten Faktoren zur Aufrechterhaltung einer physiologischen Blutglucose-Konzentration dar. Insulin wird als Folge ansteigender BG-Werte und dem damit einhergehenden, vermehrten GLUT2-assoziierten Transport von Glucose in pankreatische Zellen von den  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas sezerniert (Hedeskov, 1980). Ein Anstieg der zirkulierenden Insulinspiegel sorgt wiederum für eine verstärkte Glucoseaufnahme in

Zielorgane wie Muskel und Leber und senkt hierdurch die BG-Konzentration. Die breite Verteilung von Insulinrezeptoren in vielen Organen wie Leber, Skelettmuskel, Fettgewebe aber auch weiten Regionen des zentralen Nervensystems zeigen bereits deutlich seine essentielle Rolle hinsichtlich der peripheren und zentralen Energiehomöostase (Havrankova et al., 1987). Auf Grund der besonders hohen Dichte an Insulin-Rezeptoren in NPY/AgRP- und POMC/CART-reichen Neuronen werden diese als Schwerpunkt für die zentrale Insulin-Wirkung angesehen (Plum et al., 2005; Porte et al., 2005). Insulin wird jedoch nicht nur akut, als schnelle Reaktion auf ansteigende BG-Werte sezerniert, sondern auch in Abhängigkeit der Fettmasse (Polonsky et al., 1988). So ist Insulin beispielsweise in der Lage, die im Endothel lokalisierte Lipoproteinlipase zu aktivieren, was zur Freisetzung von freien Fettsäuren führt, welche wiederum von Zellen zur Fettsynthese herangezogen werden können (Morigny et al., 2015). Außerdem weist Insulin stark anti-lipolytische Effekte auf, da die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor zu Aktivierung des PI3K-Signalweges führt. Der hierbei entstehende Anstieg an PIP3 führt wiederum zu einer verstärkten Aktivierung der Phosphodiesterase 3 (PDE3), welche lipolytisch aktives cAMP zu 5'-AMP degradiert (Morigny et al., 2015). Auf diese Weise kann Insulin dem lipolytischen Effekt von Catecholaminen, nicht jedoch dem der natriuretischen Peptide, entgegenwirken. Darüber hinaus werden weitere anti-lipolytische Effekte von Insulin diskutiert. In einer Studie an Nagetieren konnte gezeigt werden, dass der Insulin-vermittelte Anstieg der Glucose-Aufnahme zur vermehrten Bildung von Laktat führt (Cai et al., 2008; Ahmed et al., 2010), wodurch im Folgenden die Laktat-vermittelte Aktivierung des GPR81-Rezeptors verstärkt wird, welcher wiederum direkt die Catecholamin-aktivierte Lipolyse blockiert (Ahmed et al., 2010).

Störungen in der Insulinfreisetzung oder die Entwicklung einer Insulinresistenz werden durch schwerwiegende chronische Hyperglykämien charakterisiert und sind mit Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1, Diabetes mellitus Typ 2 sowie Adipositas und dem metabolischen Syndrom assoziiert. Aber auch kardiovaskuläre Erkrankungen sowie verschiedene Formen von Krebs stehen mit chronischer Hyperglykämie und der daraus resultierenden Glykosylierung verschiedener Protein im Zusammenhang.

### **Cholecystokin**

Cholecystokin (CCK) war das erste Darm-Hormon, dem eine Rolle bei der Appetit-Regulation zugeordnet werden konnte (Gibbs et al., 1973). CCK wird postprandial durch einen hohen Anteil an Fett und Aminosäuren im Nahrungsbrei aus den enteroendokrinen I-Zellen des Duodenums sowie des Jejunums sezerniert (Liddle et al., 1985). Die Plasma CCK-Spiegel steigen daraufhin innerhalb 15 min stark an, fallen jedoch auf Grund der geringen Halbwertszeit auch recht zügig wieder ab (Liddle et al., 1985). Die Infusion von CCK konnte in schlanken Menschen die Nahrungsaufnahme reduzieren (Kissileff et al., 1981), ebenso führte sie in Ratten zu einer Verringerung der Mahlzeitgröße (West et al., 1984). Gleichzeitig wurde im Tiermodell jedoch eine kompensatorische Erhöhung der Frequenz der Nahrungsaufnahme beobachtet (West et al., 1984). Neben seiner Appetit-zügelnden Wirkung wird dem CCK auch ein stimulierender Einfluss auf die Enzymfreisetzung aus dem Pankreas sowie der Gallenblase zugesprochen. In Studien konnte außerdem eine potentielle Interaktion von CCK mit Leptin (s. Kapitel 1.3.2.2) sowohl hinsichtlich einer kurzzeitigen Inhibierung der Nahrungsaufnahme als auch bezüglich einer Langzeit-Gewichtsreduktion beobachtet werden (Owyang and

Heldsinger, 2011). So konnte in Leptin-defizienten Mäusen durch CCK-Administration kein Effekt auf die Nahrungsaufnahme erzielt werden (Barrachina et al., 1997; Owyang and Heldsinger, 2011).

### **Pankreatischen Polypeptide**

Die Familie der pankreatischen Polypeptide setzt sich aus dem Neuropeptid Y (NPY), dem Peptid YY (PYY) sowie dem pankreatischen Polypeptid (PP) zusammen. Die aus jeweils 36 Aminosäuren bestehenden Peptide zeichnen sich hinsichtlich ihrer Tertiärstruktur durch ihre U-Form auf, wobei das Haarnadel-Motiv essentiell für die Rezeptorbindung und die G-Protein vermittelte Signaltransduktion zu sein scheint (Michel et al., 1998; Lin et al., 2004). Während PYY und PP vom Darm sezerniert werden, ist NPY insbesondere in zentral neuronalen Regionen zu finden (Tatemoto and Mutt, 1980).

**Peptid YY** (Peptid Tyrosin Tyrosin), welches sich durch seine N- und C-terminale Tyrosin-Reste auszeichnet, zählt zu den Sättigungshormonen (Tatemoto and Mutt, 1980). Während die Konzentration an zirkulierendem PYY im nüchternen Zustand sehr gering ist, nimmt diese in Folge von Nahrungszufuhr, proportional zur aufgenommenen Kalorienmenge rapide zu, wobei das PYY-Maximum nach 1-2 Stunden erreicht wird. Die PYY-Konzentrationen bleiben jedoch über einen Zeitraum von mehreren Stunden erhöht (Adrian et al., 1985). Auch hinsichtlich der ilealen Bremse, einem negativen Feedback-Mechanismus, bei welchem die Detektion von Nährstoffen im Colon zu einer Motilitätshemmung im oberen Gastrointestinal-Trakt führt (Spiller et al., 1984), scheint neben Fett als Nährstoff auch PYY beteiligt zu sein (Wen et al., 1995). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass PYY über bislang nicht vollständig geklärte Mechanismen sowohl den Energieverbrauch regulieren, als auch die Magenentleerung verlangsamen und Kontraktion der Gallenblase wie auch die exokrine Sekretion des Pankreas inhibieren kann (Ashby and Bloom, 2007; Sloth et al., 2007).

Das **Pankreatische Polypeptid** wird, wie sein Name bereits nahelegt, von pankreatischen Zellen der Langerhans-Inseln als Reaktion auf Nahrungszufuhr sezerniert. Über Interaktion mit dem Y4-Rezeptor in Hirnstamm und Hypothalamus hat PP direkte anorektische Effekte (Asakawa et al., 2003). Die PP-Plasmaspiegel unterliegen einem zirkadianen Rhythmus: Während die Konzentration an PP in den frühen Morgenstunden sehr gering ist, nimmt sie im Laufe des Tages immer mehr zu und erreicht ihr Maximum in den späten Abendstunden (Adrian et al., 1976). Die postprandiale PP-Freisetzung scheint hierbei direkt proportional zur zugeführten Kalorienmenge und ist auch sechs Stunden nach Nahrungsaufnahme noch erhöht (Adrian et al., 1976). In Leptin-defizienten ob/ob-Mäusen konnte durch wiederholte intraperitoneale Applikation von PP sowohl das Körpergewicht reduziert, als auch eine bestehende Insulinresistenz verbessert werden (Asakawa et al., 2003).

### **Proglucagon-Familie**

Zu den Folgeprodukten der Proglucagon-Familie zählen neben den Glucagon-like Peptiden 1 und 2 (GLP-1, GLP-2) auch Oxyntomodulin (OXM) sowie Glucagon. Die Proglucagon-Gene werden insbesondere in Pankreas sowie in den L-Zellen des Dünndarms und im Stammhirn exprimiert (Tang-Christensen et al., 2001; Holst, 2004). Während Glucagon in erster Linie im Pankreas vorkommt sind OXM sowie GLP-1 und GLP-2 die Hauptprodukte in Hirn und Dünndarm (Tucker et al., 1996).

**GLP-1** wird als Reaktion auf die Verwertung von Nährstoffen zusammen mit PYY von den L-Zellen des Darms sezerniert. Es entfaltet seine Wirkung über die Aktivierung des GLP-1-Rezeptors und stimuliert hierbei die Aktivität der Adenylyl-Cyclase, was wiederum zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration führt (Holst, 2007). Neuere Untersuchungen an Ratten legen nahe, dass GLP-1 nicht nur nach Nahrungszufuhr, sondern bereits in der kephalen Phase, in Vorfreude auf eine Mahlzeit, ausgeschüttet werden kann (Vahl et al., 2010). Neben der Reduktion der Nahrungsaufnahme unterdrückt GLP-1 auch die Glucagon-Freisetzung und verzögert die Entleerung des Magens (Cummings and Overduin, 2007). Über die anorektischen Effekte hinaus weist es außerdem eine potente inkretorische Wirkung auf, indem es die Glucose-anhängige Insulin-Freisetzung stimuliert. GLP-1 wird über enzymatische Degradation durch Dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) abgebaut und renal eliminiert (Mentlein et al., 1993; Deacon, 2004), was in einer enorm kurzen Plasma-Halbwertszeit des Proteins von lediglich 1-2 Minuten (Vilsboll et al., 2003) resultiert. Eine GLP-1 basierte Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 oder Adipositas ist aus diesem Grund bislang nicht möglich. Dennoch scheint eine ausreichend modifizierte GLP-1 basierte Anwendung des Peptides vielversprechend.

**Oxyntomodulin** weist wie auch GLP-1 sowohl anorektische Effekte als auch Inkretin-Aktivität auf. Es wird zusammen mit PYY und GLP-1 durch L-Zellen des distalen Gastrointestinal-Traktes co-sezerniert. Die Menge an zirkulierendem OXM ist hierbei direkt proportional zur zugeführten Menge an Energie (Ghatei et al., 1983). Die Applikation von OXM ist sowohl in Nagetieren wie auch im Menschen mit einer Verringerung der Nahrungsaufnahme, sowie einem Anstieg des Energieverbrauches assoziiert (Dakin et al., 2001; Cohen et al., 2003; Wynne et al., 2006).

Die Rolle von **Glucagon** im Glucose-Stoffwechsel ist gut untersucht und nahezu vollständig verstanden. Es wird von pankreatischen  $\alpha$ -Zellen als Reaktion auf eine bestehende Hypoglykämie gebildet und sezerniert und gilt dementsprechend als Gegenspieler des von  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln sezernierten Insulin (s. Kapitel 1.3.2.1, Abschnitt Insulin). Durch Aktivierung des  $G_s$ -gekoppelten Glucagon-Rezeptors kommt es zu einer Aktivierung der Adenylyl-Cyclase und in Folge dessen zu einer cAMP-anhängigen Aktivierung des Glucose- und Fettstoffwechsels. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die Applikation von Glucagon die Nahrungsaufnahme reduziert, was möglicherweise durch Modulation des Vagustonus sowie der Magenentleerung mediiert wird (Martin and Novin, 1977; Geary et al., 1992). Dass neben der Reduktion der Nahrungsaufnahme auch das Körpergewicht verringert werden kann, konnte bereits 1957 gezeigt werden. Allerdings gingen diese Effekte mit einer Hyperglykämie einher (Schulman et al., 1957). Dennoch konnte sowohl der Zustand von Ernährungs-assoziiertem Übergewicht als auch die damit verbundene Glucose-Intoleranz durch parallele Aktivierung des GLP-1-Rezeptors und des Glucagon-Wirkmechanismus klar verbessert werden (Day et al., 2009; Pocai et al., 2009).

**Ghrelin** (*Growth hormone release inducer*) wird zum Großteil von den Belegzellen des Magenfundus-Epithels gebildet (Date et al., 2000). Zu einem weitaus geringeren Anteil sind auch  $\epsilon$ -Zellen des Pankreas, der Darm sowie der Hypothalamus und der Dickdarm in der Lage, das Peptid zu sezernieren (Hosoda et al., 2006). Auf Grund seiner orexigenen Wirkung über die Stimulation von NPY und AgRP co-exprimierenden Neuronen im Hypothalamus, sind die

Level an zirkulierendem Ghrelin vor Nahrungsaufnahme erhöht, sinken postprandial jedoch schnell ab (Cummings et al., 2001). Auch während des Fastens sind erhöhte Ghrelin-Level zu detektieren (Tschöp et al., 2000), ebenso wie in Folge von Schlafmangel (Yildiz et al., 2004), wodurch die Entstehung von Adipositas begünstigt werden kann.

**Obestatin** wird aus Präproghrelin gebildet, welches vom Magenepithel sezerniert wird (Zhao et al., 2008), weist jedoch im Gegensatz zu Ghrelin Appetit-zügelnde Effekte auf und reduziert die Nahrungsaufnahme und die Entleerungsgeschwindigkeit des Magens, was in Nagern zu einem Gewichtsverlust führt (Lacquaniti et al., 2011).

**Amylin** wird in Folge von Nahrungszufuhr und ansteigenden Blutglucose-Spiegeln gemeinsam mit Insulin aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas sezerniert und fungiert vermutlich als Appetit-zügelndes Hormon. Die genauen zu Grunde liegenden Mechanismen sind bislang nicht geklärt, sowohl eine Inhibierung der NPY-Freisetzung als auch die Modulation des dopaminergen Systems durch Amylin werden diskutiert (Reda et al., 2002). In Übergewichtigen konnten höhere Level des Hormons nachgewiesen werden, als in schlanken Subjekten (Reda et al., 2002; Reinehr et al., 2007) und die Gabe von Amylin scheint mit einer Reduktion von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht assoziiert zu sein (Rushing et al., 2000). Neben dieser Vielzahl an hormonellen Einflüssen aus Pankreas und Darm spielt im Gastrointestinaltrakt auch das **Darmmikrobiom** eine zentrale Rolle bei der Regulation der Nährstoffverwertung und des Körpergewichtes (Musso et al., 2010b, a), was unter Kapitel 1.2 näher ausgeführt wurde.

### 1.3.2.2 Adipokine als periphere Regulatoren des Energiestoffwechsels

Fettgewebe ist neben seiner Funktion als passiver Energiespeicher auch in der Lage, sekretorisch auto- und parakrine Funktionen auszuüben. Diese Eigenschaft ist besonders in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt (Proenca et al., 2014) (Ahima and Lazar, 2008; Ahima and Osei, 2008), so dass das Fettgewebe mittlerweile als das größte endokrine Organ des Körpers gilt (Smitka and Maresova, 2015). Die vom Fettgewebe sezernierten sogenannten Adipokine umfassen neben Leptin, Adiponektin, Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin 6 (IL-6) und Resistin auch weniger bekannte Vertreter wie Adipolin, Visfatin, Omentin, *Pigment-Epithel derived Factor* (PEDF) sowie Progranulin (PGRN). Sie alle spielen eine mehr oder weniger wichtige Rolle hinsichtlich der Regulation von Nahrungsaufnahme, Glucose- und Fettstoffwechsel, beeinflussen teilweise signifikant die Insulinsensitivität oder sogar die Insulinresistenz von Skelettmuskel, Leber und Fettgewebe und sind in der Lage Entzündungsgeschehen sowie die Adipogenese und die Gefäßfunktion zu beeinflussen (Smitka and Maresova, 2015) (Romacho et al., 2013). Insbesondere eine Zunahme an pro-inflammatorischen Hormonen oder ein Absinken anti-entzündlicher Substanzen wie Adiponektin oder Omentin des Fettgewebes wurden hierbei als wichtige Faktoren bei der Entstehung von Insulinresistenz, Übergewicht sowie kardiovaskulären Erkrankungen identifiziert (de Souza Batista et al., 2007; Romacho et al., 2013; Knights et al., 2014; Proenca et al., 2014). Doch auch erst kürzlich entdeckten Adipokinen wie PEDF und PGRN konnten bereits Effekte hinsichtlich der Insulinsensitivität nachgewiesen werden (Famulla et al., 2011; Li et al., 2014).

Diese Vielzahl an Adipokinen und ihre verschiedenen Funktionen sind unter anderem auf den heterogenen Zellverband von Fettgeweben zurück zu führen, welcher nicht nur aus reifen Fettzellen, sondern darüber hinaus auch aus einer Stroma-vaskulären Fraktion besteht. Diese setzt sich wiederum aus einer Vielzahl von Zelltypen wie Endothelzellen, Neuronen, immunkompetenten Zellen, Fibroblasten, Myozyten, undifferenzierten Präadipozyten und vielen weiteren zusammen setzt.

Die Funktionen von Leptin, Adiponektin und Interleukin 6 werden im Folgenden näher beschrieben.

### **Leptin**

Leptin wird in erster Linie von Fettzellen, in geringem Maße auch von der Plazenta, der Leber, dem Magengrund oder der Hypophyse (Zhang et al., 1994; Masuzaki et al., 1997; Bado et al., 1998; Morash et al., 1999; Baratta, 2002) sezerniert und wirkt über einen dualen Mechanismus anorektisch und spielt außerdem eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel und dem Energieverbrauch. Leptin defiziente ob/ob Mäuse weisen dementsprechend eine massive Hyperphagie und krankhafte Fettsucht auf (Igel et al., 1997; Howard et al., 1999; Igel et al., 2002). Die Supplementierung von Leptin in diesen Tieren konnte diese Effekte weitgehend aufheben, in dem sowohl eine Reduktion des Appetites als auch des Körpergewichtes der Tiere erzielt werden konnte (Campfield et al., 1995). Auch in Menschen ist der kongenitale Mangel an Leptin direkt mit einer schweren Form der Adipositas, sowie Insulinresistenz und Glucoseintoleranz assoziiert, welche wiederum durch die Gabe von rekombinantem Leptin aufgehoben werden konnten (Farooqi et al., 1999). In Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Leptin-Spiegel in übergewichtigen Personen positiv mit der Körperfettmasse korrelieren, wohingegen sie in schlanken Menschen deutlich reduziert sind (Mendoza-Nunez et al., 2002). Auf Grund seines negativen Feedback-Mechanismus ist Leptin in der Lage das hypothalamische Sättigungszentrum direkt über die Menge an vorhandenem Fettgewebe im Körper zu informieren, da die zirkulierenden Leptin-Level proportional den Grad an Fetteinlagerung widerspiegeln (Friedman, 2014). Auf diese Weise kann Leptin einem übermäßigen Anstieg an Fettmasse durch Steigerung des Sättigungsgefühls auf der einen Seite und Erhöhung des Energieverbrauches auf der anderen Seite entgegen wirken. Außerdem konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass Leptin in der Lage ist über seine Rezeptoren (ob-R) Insulin-ähnliche Effekte auf den Glucosemetabolismus auszuüben, was es zu einem potentiellen Therapieansatz für Diabetes mellitus Typ 1 macht (Petersen et al., 2002; Wang et al., 2005). Darüber hinaus ist Leptin in der Lage, die Insulinsensitivität verschiedener Organe zu verbessern, da es über die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) zu einer vermehrten Oxidation freier Fettsäuren führt, was wiederum deren Anreicherung in Geweben wie Skelettmuskel oder Leber vermindert (Minokoshi et al., 2002). Unglücklicherweise führt eine dauerhafte Erhöhung der Leptin-Spiegel im Körper zur Entstehung einer Leptin-Resistenz (Igel et al., 1997; Balland and Cowley, 2015). Nichtsdestotrotz muss die genaue Rolle von Leptin hinsichtlich Diabetes mellitus und Adipositas weiter untersucht werden um sinnvolle therapeutische Ansätze bieten zu können (Knights et al., 2014).

### **Adiponektin**

Adiponektin wird nicht, wie lange angenommen, lediglich durch Adipozyten gebildet (Scherer et al., 1995), sondern kann im Menschen auch von der Skelettmuskulatur und Kardiomyozyten sezerniert werden (Brochu-Gaudreau et al., 2010). Es kann seine Wirkung über zwei verschiedene Rezeptoren, AdipoR1 und AdipoR2, entfalten (Yamauchi et al., 2003). Während AdipoR1 vor allem im Skelettmuskel lokalisiert ist und über AMPK-Phosphorylierung aktiviert wird, wird der AdipoR2 in erster Linie in der Leber exprimiert und ist dort in die Aktivierung von PPAR $\alpha$  involviert (Yamauchi et al., 2003; Lee et al., 2008). Grundlegend sind Adiponektin-Plasmaspiegel in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 oder Adipositas negativ mit dem BMI sowie der Fettmasse korreliert (Weyer et al., 2001). Im Gegensatz zu Leptin ist Adiponektin in schlanken Menschen erhöht, wohingegen erniedrigte Plasmalevel in Tieren und Menschen mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 detektiert werden konnten (Hotta et al., 2001; Yang et al., 2001). Auch in Patienten mit *Anorexia nervosa* konnten erhöhte Adiponektin-Spiegel verzeichnet werden, was teilweise für die erhöhte Insulinsensitivität dieser Patienten verantwortlich sein könnte (Dostalova et al., 2006). Tatsächlich konnte ein Zusammenhang zwischen Insulin und Adiponektin auch in 3T3-L1-Kulturen *in vitro* festgestellt werden (Fasshauer et al., 2002). Dies steht im Einklang mit Befunden welche zeigen, dass erniedrigte Adiponektin-Spiegel in adipösen Patienten für eine reduzierte Insulinsensitivität verantwortlich sind und daraus resultierend für die Entstehung einer Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 (Nedvidkova et al., 2005; Skop et al., 2010). Auch die Insulin-sensitivierende Wirkung der PPAR $\gamma$  agonisierenden Thiazolidindione könnte teilweise durch deren steigernden Effekt auf die Adiponektin-Freisetzung erklärt werden (Yamauchi and Kadowaki, 2008). Die Gabe von rekombinantem Adiponektin konnte darüber hinaus im Tiermodell Übergewicht und Adipositas-assoziierte pathologische Veränderungen revidieren (Li et al., 2012a). Dennoch gibt es bislang keinen Hinweis auf eine klinische Evidenz, welche positive Effekte am Menschen nachweisen kann (Li et al., 2012a). So konnte im Gegenteil sogar ein Zusammenhang zwischen erhöhten Adiponektin-Leveln und Herzversagen sowie der Mortalität in Patienten mit stabilen koronaren Herzerkrankungen hergestellt werden (Beatty et al., 2012). Dementsprechend könnte Adiponektin mit dem sogenannten Paradoxon der Adipositas (Flegal et al., 2013) im Zusammenhang stehen, welches beschreibt, dass übergewichtige Patienten, verglichen mit Normal-gewichtigen ein geringeres Risiko für kardiovaskuläre Mortalität ausweisen (Hainer and Aldhoon-Hainerova, 2013).

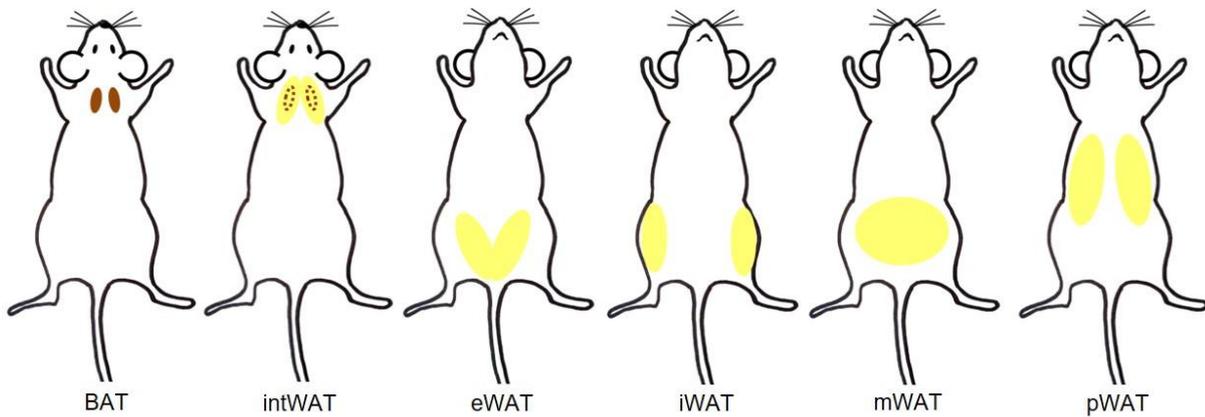
### **Interleukin 6**

Etwa ein Drittel des zirkulierenden Interleukin 6 (IL-6) wird in Fettgeweben gebildet und aus diesem sezerniert (Mohamed-Ali et al., 1997). Besonders viszerales Fettgewebe setzt hierbei etwa 2-3 Mal so viel IL-6 frei wie subkutane Fettdepots (Fontana et al., 2007). Gebildet wird das Adipokin hierbei nicht von den Fettzellen selbst sondern größtenteils von der stromavaskulären Fraktion der Fettgewebe (Fain et al., 2004). In übergewichtigen Personen konnte mehrfach eine Erhöhung der pro-inflammatorischen IL-6 Plasmaspiegel nachgewiesen werden, welche in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von Insulinresistenz und der Entwicklung von Diabetes mellitus Typ 2 steht (Pradhan et al., 2001; Klover et al., 2005). IL-6 spielt zudem eine zentrale Rolle in der Regulation der Energiehomöostase, sowie der Entwicklung der Körperstruktur und dem peripheren Lipidmetabolismus (Wallenius et al., 2002;

Trujillo et al., 2004; Wernstedt et al., 2006). Dennoch sind die Effekte von IL-6 auf Nährstoffverwertung und Gewichtsentwicklung sehr kontrovers und zu einem großen Teil unverstanden. Prinzipiell gilt IL-6 als Adipositas-assoziiertes Entzündungsfaktor und als zentraler Mediator für die Entstehung einer Insulinresistenz, da erhöhte zirkulierende IL-6 Level im Menschen ganz klar mit Adipositas und Insulinresistenz korreliert sind (Pickup et al., 1997; Pradhan et al., 2001; Vozarova et al., 2001). Dennoch gibt es mittlerweile erhebliche Hinweise darauf, dass IL-6 in diesem Zusammenhang auch positive Effekte aufweist. Studien konnten zeigen, dass körperliche Ertüchtigung und Training die Produktion in IL-6 im Skelettmuskel massiv steigert, was zu einem Anstieg der Blutkonzentration um den Faktor 100 führt (Ostrowski et al., 2000; Helge et al., 2003). Darüber hinaus zeichnen sich IL-6 defiziente Mäuse durch die Entwicklung von Adipositas, systemischer Insulinresistenz und massiven Entzündungsreaktionen aus (Wallenius et al., 2002; Matthews et al., 2010a). Dass die Überexpression von IL-6 im Mausmodell weitreichende positive Effekte auf Körpergewicht, Metabolismus und Gesundheit haben kann, konnte erst jüngst gezeigt werden (Ma et al., 2015). Während die Nahrungsaufnahme unverändert blieb, konnte die Erhöhung der zirkulierenden IL-6-Konzentration sowohl das Körpergewicht adipöser Mäuse auf Hochfett-Diät als auch die Adipositas-induzierte Hepatosteatose reduzieren. Auch die Expression thermogener Faktoren wie PGC1 $\alpha$  und Ucp1 konnte, ebenso wie die mRNA-Expression lipolytischer Gene, gesteigert werden (Ma et al., 2015). Auf gleiche Weise wird IL-6 neben seiner pro-inflammatorischen Rolle zunehmend auch mit anti-inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht, da es unter anderem in der Lage ist, die Produktion von IL-10 sowie TNF $\alpha$ -Rezeptor zu modulieren (Tilg et al., 1994; Starkie et al., 2003). Um diese kontroversen Befunde weiter aufzuklären und den potentiellen Einsatz von IL-6 zur Therapie von Adipositas und Insulinresistenz abschätzen zu können bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

## **1.4 Charakterisierung von Funktion und Morphologie der unterschiedlichen Fettdepots**

Lange wurden in Säugetieren grundsätzlich zwei verschiedene Subpopulationen an Fettgeweben unterschieden: Zum einen weißes Fettgewebe, auf der anderen Seite braunes Fettgewebe. Sie unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Morphologie und Lokalisation, sondern insbesondere auch im Hinblick auf ihre physiologischen Funktionen. Dass metabolisch aktives braunes Fettgewebe auch in ausgewachsenen Nagern und vor allem auch in erwachsenen Menschen vorliegt (Nedergaard et al., 2007) konnte ebenso wie die Existenz eines dritten, „beigen“ Intermediärtypes (Sharp et al., 2012; Wu et al., 2012) erst in den letzten Jahren nachgewiesen werden und steht seither im Fokus vieler wissenschaftlicher Untersuchungen.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung verschiedener Fettdepots in der Maus**

Lokalisation von braunem Fettgewebe (BAT), weißem interscapularem Fettgewebe (intWAT), epididymalem weißem Fettgewebe (eWAT), interscapularem WAT (iWAT), sowie mesenterischen WAT (mWAT) und perirenalem Fettgewebe (pWAT) in Mäusen.

### 1.4.1 Weißes Fettgewebe als Sezernierungs- und Speicherorgan

Weißes Fettgewebe (WAT) ist in erster Linie für die Speicherung und Freisetzung von Energie in Form von Fetten zuständig. Diese weißen Fettdepots dienen als Energiespeicher und ermöglichen es dem Körper, längere Fastenintervalle zu überstehen.

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene weiße (und braune) Fettdepots in Mäusen substantiell, sowie morphologisch und immunhistochemisch untersucht (s. Abb. 3.1). Neben dem zwischen den Schulterblättern lokalisierten braunen Fettgewebe (BAT) wurde auch das distal hiervon gelegene weiße interscapuläre Fett (intWAT), sowie um den Darm lokalisiertes mesenterisches Fett und das ebenfalls in der Bauchhöhle befindliche perirenales, die Nieren umgebende, WAT untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag zum einen auf dem intraabdominalen epididymalen weißen Fett (eWAT) wie auch auf dem subkutanen Leistenfettdepot (iWAT).

Entsprechend ihrer Lokalisation weisen die verschiedenen weißen Fettdepots unterschiedliche Funktionen auf. Neben seiner Aufgabe als Energiespeicher dient insbesondere subkutanes Fettgewebe auch der Wärmeisolation, sowie dem mechanischen Schutz innerer Organe. Ernährungsphysiologisch und hinsichtlich der Entstehung von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 spielen diese Unterhaut-Fettgewebe eine eher untergeordnete Rolle. Intraabdominale, viszerale Fettdepots, sind im Gegensatz zu subkutanem Fettgewebe direkt um die inneren Organe herum angeordnet und stellen hierbei, wie beispielsweise perirenales Fettgewebe, sowohl eine Stütz- als auch eine Schutzfunktion dar. Viszerales Fettgewebe ist jedoch, wie das mesenterische Fett, größtenteils direkt um die Organe des Verdauungstraktes lokalisiert (Powell, 2007) und steht in seinem Ausmaß in direktem proportionalem Zusammenhang mit einer vorliegenden Überernährung. Da besonders die abdominelle Adipositas, welche durch eine vermehrte Einlagerung von viszeralem Fettgewebe charakterisiert ist, mit schwerwiegenden metabolischen und inflammatorischen Folgeerkrankungen assoziiert ist (Pouliot et al., 1992; Pouliot et al., 1994; Fontana et al., 2007; Cohen et al., 2014), wird heutzutage neben dem BMI oder dem Hüft-Taillen-Verhältnis oft auch der diesbezüglich deutlich aussagekräftigere Bauchumfang (s.

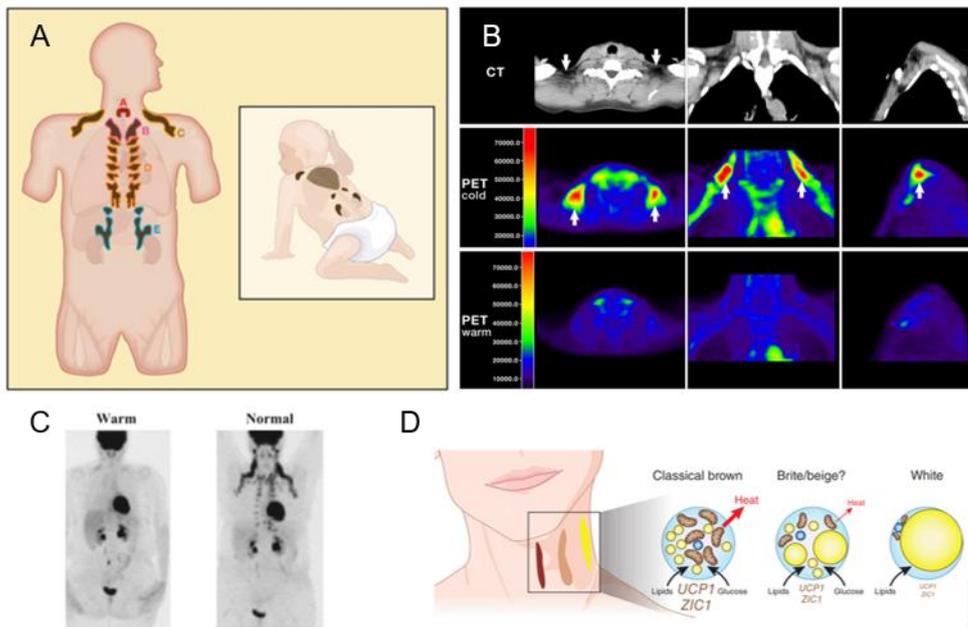
Kapitel 1.2) zur Beschreibung und Diagnose von Übergewicht und Adipositas sowie der Abschätzung von Folgeerkrankungen herangezogen (Pouliot et al., 1994).

Neben all diesen Funktionen, stellt das weiße Fettgewebe auch ein wichtiges sekretorisches Organ dar, da es wie in Kapitel 1.3.2.2 dargestellt in der Lage ist, Hormone und andere Adipozytokine zu bilden und freizusetzen, welche direkt oder indirekt metabolische und inflammatorische Prozesse beeinflussen und steuern können.

Morphologisch zeichnen sich weiße Fettzellen durch ihre univacuoläre Gestalt aus. Während die Zellorganellen sowie das Zytoplasma hauptsächlich als schlauchförmiges Band am Rand der weitgehend kugelförmigen Fettzellen vorliegen, werden mehr als 90% des Fettzellvolumens von einem großen, Triglycerid-haltigen Fetttropfen eingenommen. Außerdem weisen weiße Fettzellen nur wenige Mitochondrien auf, sind nur moderat vaskularisiert und sind auch nur durch eine geringe sympathische Innervierung charakterisiert. Hinsichtlich ihrer Entstehung gehen weiße Fettzellen größtenteils aus Pax7- und Myf5-negativen AMSC-Vorläuferzellen hervor (Schulz et al., 2013; Whittle et al., 2013; Pfeifer and Hoffmann, 2014).

#### **1.4.2 Braunes Fettgewebe und seine Rolle im Energiestoffwechsel**

Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass metabolisch aktives braunes Fettgewebe (BAT) lediglich im interscapularen Bereich von Nagetieren und menschlichen Säuglingen aufgefunden werden kann (Heaton, 1972; Enerback, 2010), wo es insbesondere in den ersten Lebensstagen und -wochen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung einer physiologischen Körpertemperatur spielt. Erst 2007 gelang es der Gruppe um Jan Nedergaard, erstmals auch in adulten Menschen stoffwechselaktives braunes Fettgewebe mittels FDG-PET-Verfahren nachzuweisen (Nedergaard et al., 2007). Diese Befunde konnten in den folgenden Jahren unabhängig auch von weiteren Gruppen in Europa, den USA und Japan bestätigt werden (Cypess et al., 2009; Saito et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Humanes BAT ist im Gegensatz zu dem in Nagern nicht interscapular lokalisiert, sondern stattdessen sowohl thyreoidal, als auch supraclaviculär, mediastinal, parathorikal und perirenal lokalisiert (Nedergaard et al., 2007; Enerback, 2010). Darüber hinaus konnten Nedergaard et al. zeigen, dass auch das humane braune Fettgewebe durch Kälteeinwirkung aktiviert werden kann (Nedergaard et al., 2007).



**Abb. 1.4: Lokalisation brauner Fettdepots in Erwachsenen und Säuglingen**

(A) Schematische Darstellung der Lokalisation von humanem braunem Fettgewebe (BAT) in Erwachsenen und Säuglingen. (B) Bildgebende Darstellung der FDG-Aufnahme in stoffwechselaktives BAT nach Kälteexposition (*cold*) bzw. bei Aufenthalt bei Raumtemperatur (*warm*) mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Computer-Tomographie (CT). (C) PET-basierte Ganzkörperaufnahme der FDG-Inkorporation nach Aufenthalt bei normierten Temperaturen (Normal) oder in besonders warmen Räumen (Warm). (D) Auftreten von braunem, beige und weißem Fettgewebe in Abhängigkeit der Tiefe seiner Lokalisation im Gewebe. (A+B) Enerback, 2010; (C) modifiziert nach Nedergaard 2007; (D) Nedergaard 2013

Eine Ursache für diesen langjährigen Trugschluss könnte in der Tatsache begründet liegen, dass sich bisherige Untersuchungen zur Identifikation von BAT in Erwachsenen hauptsächlich auf die interscapularen Bereiche bezogen haben, da ausgehend von Befunden in Säuglingen und Nagern dies als Haupt-Lokalisation von metabolisch aktivem BAT angesehen wurde. Erst durch die Verwendung eines PET-basierten bildgebenden Verfahrens, zur Visualisierung der Glucose-Aufnahme in Folge einer Kälte-Exposition, konnte metabolisch aktives BAT unter anderem in verschiedenen Region des Nacken und Thorax-Bereiches von Erwachsenen nachgewiesen werden, wohingegen kaum Aktivität im interscapularen Bereich detektiert werden konnte (Nedergaard et al., 2007; Virtanen et al., 2009). Dies steht im Einklang mit weiteren Erkenntnissen zu einer Alters-assozierten Verschiebung des Auftretens von braunem Fettgewebe. Während BAT in den ersten zehn Lebensjahren über weite Teile des Körpers verteilt auftritt (Heaton, 1972), kommt es mit zunehmendem Alter zu einem Rückgang an braunem Fettgewebe (Heaton, 1972; Cannon and Nedergaard, 2004). Insbesondere das zwischen den Schulterblättern liegende Depot scheint hiervon früh betroffen zu sein, was zu dem weit verbreiteten Trugschluss führte, dass in Erwachsenen kein BAT mehr vorhanden ist. Stattdessen scheint es jedoch lediglich zu einer Umverteilung von braunem Fettgewebe in tiefere Schichten wie perirenale oder supraklavikuläre Regionen zu kommen (Nedergaard et al., 2007; Cypess et al., 2009; Saito et al., 2009; Enerback, 2010), wohingegen die Menge an BAT in oberflächlicheren Regionen mit dem Alter stark reduziert ist.

Die Menge an aktivem BAT scheint jedoch nicht nur mit dem Alter, sondern auch weiteren Faktoren zu korrelieren. So konnte auch ein Zusammenhang mit dem Geschlecht festgestellt werden: Frauen scheinen dementsprechend eine größere Prävalenz und eine mehr als doppelt so große Masse an BAT aufzuweisen als Männer. Darüber hinaus weisen sie auch eine gesteigerte FDG-Aufnahme in diesen Depots auf, was neben der gesteigerten Masse auch ein Hinweis auf eine erhöhte metabolische Aktivität des Gewebes darstellt (Enerback, 2010). Auch mit dem BMI und insbesondere der Menge an weißem Fett scheint die Prävalenz von BAT, wenn auch leider negativ, korreliert zu sein (van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Enerback, 2010), wie eine FDG-PET basierte Studie an schlanken (BMI < 25) und übergewichtigen (BMI ≥ 25) Subjekten zeigen konnte (van Marken Lichtenbelt et al., 2009).

Diese Befunde stellen möglicherweise einen großen Durchbruch in der Therapie und Prävention von Adipositas dar, da braunes Fettgewebe im Gegensatz zu WAT kein Speicherorgan darstellt, sondern in erster Linie der Generierung von Wärme (ohne Muskelbeteiligung) zum Schutz vor Unterkühlung dient. Die Entdeckung der Präsenz von BAT in adulten Menschen eröffnet somit potentielle neue Therapiestrategien zur Bekämpfung von Übergewicht und Adipositas. Auch hinsichtlich der Diät-induzierten, postprandialen Thermogenese (DIT) spielt funktionales BAT möglicherweise eine wichtige Rolle (Rothwell and Stock, 1979). Die bisherigen Befunde in diesem Bereich sind jedoch hochkontrovers (Enerback, 2010; Kozak, 2010) und das Ausmaß der Diät-induzierten Thermogenese in BAT deutlich schwächer ausgeprägt, als die Kälte-induzierte Wärmeproduktion.

Im Gegensatz zu WAT sind braune Fettzellen deutlich kleiner und besitzen eine multivakuoläre Morphologie, bestehend aus mehreren kleinen Fettvakuolen. Sie weisen außerdem eine extrem hohe Mitochondriendichte auf, was neben ihrer starken Vaskularisierung von bis zu 5 Kapillaren pro brauner Fettzelle (Robidoux et al., 2004) die Hauptursache der typischen rotbraunen Färbung von BAT ausmacht. Die besonders stark ausgeprägte Vaskularisierung der braunen Fettzellen mit einer Vielzahl an kleinen Blutgefäßen erlaubt zum einen den schnellen und effizienten Abtransport der im BAT generierten Wärme und stellt darüber hinaus dessen ausreichende Versorgung mit Nährstoffen wie Lipiden und Glucose sicher. Während Mitochondrien allgemein für die Generierung von ATP verantwortlich sind und somit den Ablauf einer Vielzahl von (ATP-abhängigen) Prozessen im Körper ermöglichen, zeichnen sich Mitochondrien in braunen Fettzellen durch eine weitere Besonderheit aus. Die BAT-spezifische Expression von Ucp1 (*Uncoupling Protein 1*) ermöglicht eine Entkopplung der Atmungskette in Mitochondrien. Die Atmungskette wird somit von der ATP-Produktion abgekoppelt und der entstandene Protonengradient stattdessen zur Generierung von Wärme genutzt (Argiles et al., 2002; Klingenspor et al., 2008), ohne dass hierfür ATP benötigt wird (Fedorenko et al., 2012). Ucp1, auch Thermogenin genannt, ermöglicht es somit braunem Fettgewebe zitterfreie Thermogenese zu betreiben (*non-shivering-thermogenesis*), was hinsichtlich der Energiebalance und somit ganz besonders in Bezug auf die Entwicklung von Adipositas eine wichtige Rolle spielen könnte. Induziert werden kann die Aktivität von BAT über verschiedene Regelkreise, wobei vor allem die Induktion über Kältereize im Vordergrund steht (Watanabe et al., 2008; Fedorenko et al., 2012; Shore et al., 2013; Gnad et al., 2014). Als Reaktion des Körpers auf Kältestimuli kommt es vermehrt zur Lipolyse in BAT, woraufhin die hierbei entstehenden freien Fettsäuren wiederum in der Lage sind, die Expression von

Ucp1 einzuleiten, was im Folgenden wiederum zur Steigerung der Thermogenese in BAT führt. Auf diese Weise stellt die Lipolyse nicht nur in Folge der Kälteeinwirkung dringend benötigte Energie für die Mitochondrien des BAT zur Verfügung, sondern ist auch in der Lage diese direkt über die Stimulation der Ucp1-Expression zu aktivieren (Fedorenko et al., 2012; Shore et al., 2013). Wie eine Vielzahl von Untersuchungen in den letzten Jahren zeigen konnte, kann die Aktivität von BAT durch unterschiedliche Botenstoffe und Liganden sowie neuronale Stimuli reguliert werden (Bordicchia et al., 2012; Fedorenko et al., 2012; Colombo et al., 2013). So ist beispielsweise auch Adenosin in der Lage über die Aktivierung von G<sub>s</sub>-Proteingekoppelten A<sub>2A</sub>-Rezeptoren BAT und die hier stattfindende zitterfreie Thermogenese zu aktivieren (Gnad et al., 2014). Diese regulatorischen, aktivierenden und hemmenden Mechanismen werden unter 1.4.4 näher beschrieben.

Wie weitreichend und hocheffizient die Effekte von BAT und dessen Aktivierung auf Energieverbrauch und Metabolismus sein können, wurde durch verschiedene Studien an Nagern und Menschen deutlich. So konnte in Mäusen das Körpergewicht und vor allem die Körperfettmasse auf Hochfett-diät signifikant und hocheffektiv reduziert werden, wenn diese für 7 Tage einem Kältereiz von 5 °C ausgesetzt wurden. Die hierbei erzeugte BAT-Aktivierung ermöglicht eine Abnahme des Körperfettanteils um 55%, obwohl in Folge der Kälteeinwirkung gleichzeitig die Nahrungsaufnahme um 50% erhöht war (Nikonova et al., 2008). Auch im Menschen konnten Hinweise auf eine Kälte-bedingte Aktivierung braunen Fettgewebes gezeigt werden. So konnte eine finnische Gruppe um P. Huttunen und V. Kinnula, zeigen dass nordfinnische Männer, welche einer Arbeit im Freien nachgingen, multivakuoläre Fettzellen im Bereich der Arterien des Nackens aufwiesen und darüber hinaus auch deren Enzymaktivität auf Veränderungen des Metabolismus hinwiesen. Verglichen wurden die Probanden mit Personen gleichen Alters, welche hauptsächlich in beheizten Räumen tätig waren (Huttunen et al., 1981). Die Bedeutung der BAT-Aktivierung durch einen Kältereiz wird darüber hinaus deutlich, wenn man dessen Auswirkungen auf den Stoffwechsel betrachtet. Im aktivierten Zustand ist BAT offensichtlich in der Lage in hohem Maße Triglyceride und Glucose aus dem Blut aufzunehmen (Bartelt et al., 2011). Mit einer Aufnahme der zirkulierenden Nährstoffe um mehr als 50% übersteigt das hoch stoffwechselaktive BAT somit sogar die Kapazität von Muskel, Leber und weißem Fettgewebe (Bartelt et al., 2011). Verglichen mit Kindern, bei welchen die BAT-Masse bis zu 2-5 % des Körpergewichtes ausmachen kann, ist der BAT-Anteil bei Erwachsenen mit einem Anteil von nur noch 0,05-01 % zwar deutlich reduziert (Enerback, 2010), humane Studien lassen dennoch den Schluss zu, dass die vollständige Aktivierung von BAT in adulten Menschen jährlich eine Energiemenge umsetzen kann, welche ca. 4,1 kg weißem Fettgewebe entspricht (Virtanen et al., 2009). Dies unterstreicht erneut die möglicherweise pivotale Rolle von BAT und dessen Aktivierung bei der Bekämpfung von Adipositas im Menschen.

Ein weiterer Unterschied zwischen WAT und BAT ergibt sich neben morphologischer und funktionaler Differenzen aus ihren Vorläuferzellen. Während die Progenitoren weißer Fettzellen Myf5- wie auch Pax7-negativ sind, gehen braune Fettzellen aus dem zentralen Dermomyotom hervor, aus welchem auch Gewebe wie Dermis und Muskeln entstehen (Atit et al., 2006). Dementsprechend weisen braune Fettzellen während ihrer Differenzierung und Reifung eine myogene Signatur auf (Timmons et al., 2007), was sich in Mäusen beispielsweise

durch die Expression des Transkriptionsfaktors Myf5 auszeichnet. Eine US-amerikanische Forschergruppe um B. Spiegelman konnte darüber hinaus zeigen, dass Myf5-positiv Zellen in Abhängigkeit des Transkriptions-regulierenden Faktors Prdm16 sowohl zu Muskelzellen, als auch braunen Fettzellen differenzieren können, nicht jedoch zu weißen Fettzellen (Seale et al., 2008). Dennoch sind es genau diese Differenzierungsfaktoren, welche in neueren Studien Fragen aufwerfen. Es konnten weiße Fettzellen identifiziert werden, welche eindeutig aus Myf5-positiven Vorläufern entstanden sind (Sanchez-Gurmaches et al., 2012). Darüber hinaus konnten Zellen isoliert werden, welche sich basal als AMSC und somit weiße Fettvorläuferzellen präsentieren, nach geeigneter Stimulation jedoch klassisch braune Fettzeleigenschaften, wie eine erhöhte Ucp1-Expression aufweisen (Pfeifer and Hoffmann, 2014). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass noch eine weitere Subpopulation an Fettzellen existiert, die sowohl Eigenschaften brauner als auch weißer Fettzellen in sich vereint.

### **1.4.3 Beiges Fettgewebe als wichtiger Intermediärtyp der verschiedenen Fettzelltypen**

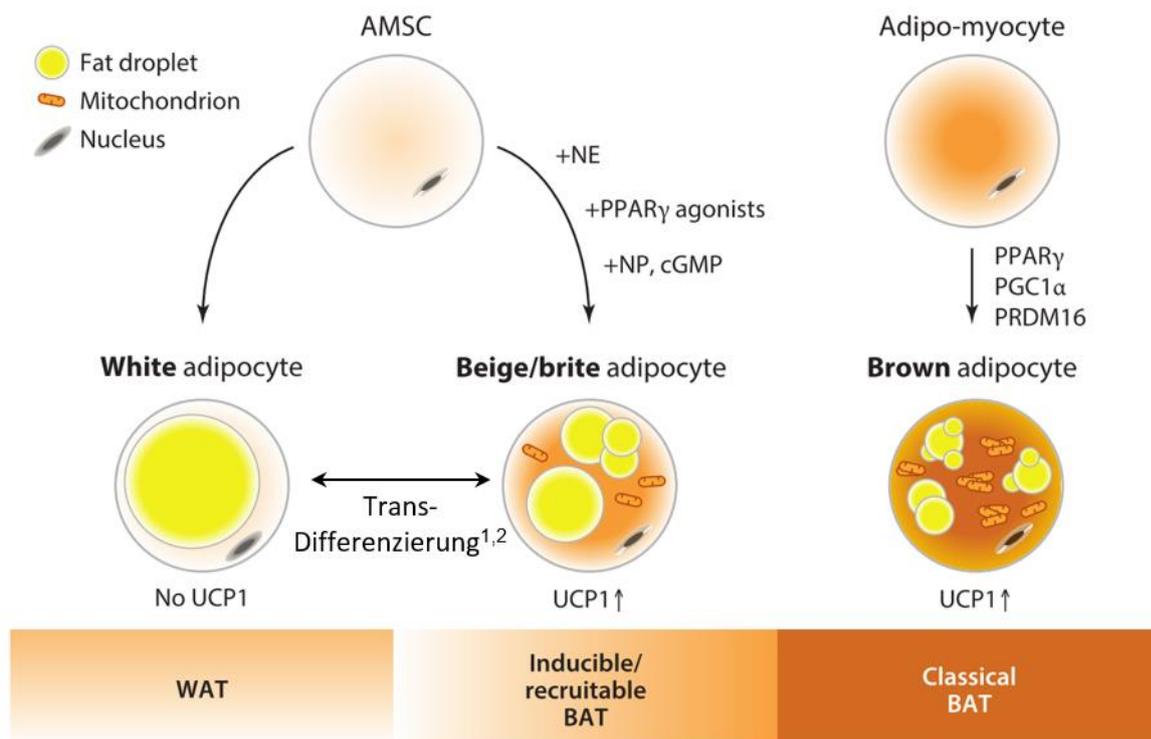
Auf Grund der Vereinigung von Eigenschaften brauner und weißer Fettzellen, lässt sich eine intermediäre Fettzelle identifizieren, welche als beiger Fettzelltyp definiert wurde.

Beige Fettzellen weisen sowohl die multivakuolären Morphologie der braunen Fettzellen auf, als auch deren hohe Mitochondriendichte sowie die Expression BAT-spezifischer Marker-Gene wie Ucp1 (Frontini and Cinti, 2010; Lo and Sun, 2013; Rosen and Spiegelman, 2014). Im Gegensatz zu braunen Fettzellen ist die Ucp1-Expression in beigen Fettzellen unter basalen Bedingungen jedoch meist erniedrigt (ähnlich jener, der weißen Fettzellen) und wird erst nach Aktivierung durch geeignete Stimuli im Zuge des sogenannten *Brownings* stark erhöht (Pfeifer and Hoffmann, 2014; Cohen and Spiegelman, 2015).

Lokalisiert sind diese beigen Fettzellen in der Regel in eigentlich weißen Fettdepots, was auch die oftmals mit diesen identischen Vorläuferzellen erklären kann. Beige Fettzellen stellen dementsprechend eine Population eigentlich weißer Fettzellen dar, die durch geeignete hormonelle oder pharmakologische Induktion braune Fettzell-Eigenschaften ausüben können. Insbesondere PPAR $\gamma$ -Agonisten, sowie Agonisten  $\beta$ -adrenerger Signalkaskaden und Substanzen wie beispielsweise natriuretische Peptide (NP) (Bordicchia et al., 2012), Inhibitoren der Phosphodiesterase 5 (PDE5) wie Sildenafil (Zhang et al., 2010b; Mitschke et al., 2013) welche die Level an cGMP erhöhen (Mitschke et al., 2013) und weitere spielen hierbei eine wichtige Rolle und werden unter 1.4.4 näher beschrieben. Dieser mittlerweile vielfach untersuchte Prozess wird als *Browning* (Bräunung) weißer Fettdepots bezeichnet.

Auch hinsichtlich ihrer Entstehung bzw. Differenzierung scheinen sich beige Fettzellen von braunen zu unterscheiden. Allerdings konnten die genauen zu Grunde liegenden Prozesse bislang nicht vollständig aufgeklärt werden, so dass diesbezüglich bis heute zwei verschiedene Hypothesen konkurrieren. Eine Möglichkeit stellt die Entstehung beiger Fettzellen aus AMCS dar, derselben Population, aus welcher auch weiße Fettzellen differenzieren. Diese Hypothese geht davon aus, dass durch die Stimulation von AMSC mittels Noradrenalin, PPAR $\gamma$ -Agonisten oder durch Applikation von NP oder cGMP *Browning*-Prozesse in den mesenchymalen Stammzellen eingeleitet werden können, welche eine Ausreifung zu beigen Fettzellen forciert

(Lee et al., 2012). Die zweite Hypothese beruht auf der Annahme, dass eine Transdifferenzierung maturer weißer Fettzellen möglich ist. So wird davon ausgegangen, dass bestimmte äußere Einflüsse wie beispielsweise Kälte oder die Aktivierung von  $\beta_3$ -Adrenozeptoren dazu führen, dass ausgereifte weiße Fettzellen in beige umgewandelt werden können, indem sie transdifferenzieren (Barbatelli et al., 2010). Tatsächlich gibt es mittlerweile Evidenzen, die auf eine Depot-spezifische Entstehung des beigen Fettgewebes schließen lassen. Der überwiegende Anteil an beigen Fettzellen in subkutanem weißen Leistenfett (iWAT) scheint durch Transdifferenzierung zu entstehen (Barbatelli et al., 2010; Lee et al., 2012). Im Gegensatz hierzu weist eWAT beinahe ausschließlich beige Fettzellen auf, welche direkt aus Vorläuferzellen entstehen, die ein für weiße Präadipozyten typisches Genexpressionsmuster aufweisen (Lee et al., 2012). Dass die beschriebene Transdifferenzierung jedoch in beide Richtungen möglich ist, konnte eine erst jüngst veröffentlichte Arbeit beweisen (Rosenwald et al., 2013). Die Arbeitsgruppe um C. Wolfrum konnte in ihren Untersuchungen im Mausmodell zeigen, dass eine durch Kälte-Stimulation bedingte Entstehung von beigen Adipozyten durch chronische Zufuhr von Wärme innerhalb von 5 Wochen vollständig aufgehoben werden konnte. Wie mittels Untersuchung genetischer Abdrücke sowie transkriptionaler Charakterisierung nachgewiesen werden konnte, wurden die beigen Fettzellen hierbei nicht eliminiert, sondern scheinen stattdessen wieder zu weißen Fettzellen umgewandelt worden zu sein (Rosenwald et al., 2013).



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung verschiedener Hypothesen zur Entstehung der unterschiedlichen Fettzelltypen**

AMSC (*adipose tissue derived mesenchymal stem cells*) stellen die Vorläuferzellen weißer Fettzellen dar, wohingegen braune Fettzellen aus Adipomyozyten hervor gehen. Hinsichtlich der Entstehung von beigen Fettzellen rivalisieren zwei verschiedene Hypothesen: Zum einen die von Pfeifer et al. postulierte Theorie, dass beige Fettzellen durch Einwirkung geeigneter Stimuli wie Noradrenalin (NE), PPAR $\gamma$ -Agonisten, Natriuretische Peptide (NP) oder cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ebenfalls aus

AMSC hervor gehen. Dem gegenüber steht die These anderer Arbeitsgruppen, welche eine Transdifferenzierung beiger Fettzellen aus reifen weißen Adipozyten propagiert. Modifiziert nach Pfeifer 2014 und <sup>1</sup>Barbatelli 2010, <sup>2</sup>Rosenwald 2013

Doch nicht nur die Entstehung beiger Fettzellen, sondern auch deren *Browning*-Kapazität, scheint ganz klar vom Fettdepot abhängig zu sein. So konnte in Leistenfettdepots und subkutanen Fettgeweben ebenso wie in perirenal Fettdepots eine deutlich höhere Neigung zum *Browning* verzeichnet werden als in epididymalem oder gonadalem Fettgewebe (Seale et al., 2008; Seale et al., 2011). Diese Depot-abhängige *Browning*-Kapazität ist offensichtlich nicht nur im Mausmodell vorhanden, sondern konnte auch an isolierten Präadipozyten aus humanen Quellen verifiziert werden. Auch hier zeigten Vorläuferzellen aus iWAT eine deutlich stärker ausgeprägte Neigung zum *Browning* als Präadipozyten, welche aus mesenterischem oder omentalem Fettgewebe gewonnen wurden (Schulz et al., 2011). Ob dies wiederum im Zusammenhang mit der ebenfalls Depot-abhängigen Fettzellentstehung steht ist jedoch unklar.

Unumstritten ist mittlerweile jedoch der durchweg vorteilhafte Effekt von *Browning* und BAT-Aktivierung auf den gesamten Metabolismus. Bislang konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Rekrutierung beiger Fettzellen im Mausmodell in der Lage ist, vor Diät-induzierter Adipositas zu schützen (Cederberg et al., 2001; Leonardsson et al., 2004; Vegiopoulos et al., 2010; Seale et al., 2011; Tan et al., 2011; Stanford et al., 2013; Cohen and Spiegelman, 2015). Der Transkriptionsfaktor FOXC2, welcher beispielsweise bei Fütterung mit HFD vermehrt exprimiert wird, ist außerdem in der Lage, die Sensitivität der  $\beta$ -adrenergen Aktivierung der cAMP Proteinkinase A (PKA) zu steigern und sowohl eine Hypertrophie des BAT als auch eine Induktion des *Brownings* in intraabdominalen WAT-Depots auszulösen. Dies führte in Tieren, welche FOXC2 überexprimieren zu einer Verbesserung von Insulinresistenz und Hypertriglyceridämie sowie zu einer Gewichtsabnahme (Cederberg et al., 2001). Auch die Deletion des Co-Repressor-Proteins 140 (RIP140), welche zu einem Anstieg der Genexpression von Ucp1 und weiteren für den Energiestoffwechsel funktionalen Genen führt, resultierte in einem schlanken Phänotyp der Tiere und einer Resistenz gegenüber HFD-induzierter Adipositas und Lebersteatose (Leonardsson et al., 2004). Auch die Überexpression von Prdm16 resultierte in einem deutlichen Anstieg des *Brownings* in subkutanen Fettdepots, nicht jedoch in eWAT und führte in Folge dessen in den Tieren zu einem Anstieg des Energieverbrauches sowie deutlich verbesserter Glucosetoleranz während und nach HFD-Fütterung (Seale et al., 2011). Nicht nur klassische, bereits bekannte *Browning*-Marker, sondern auch die Cyclooxygenase 2 (COX2) ist als Downstream-Effektor des  $\beta$ -adrenergen Signalweges in weißem Fettgewebe in der Lage, die Aktivierung beiger Fettzellen zu beeinflussen. Vegiopoulos et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass eine Überexpression der COX2 in WAT mit der Rekrutierung von beigen Fettzellen innerhalb dieser Depots und darüber hinaus mit einem Anstieg des systemischen Energieverbrauches sowie einem klaren Schutz gegenüber HFD-induzierter Adipositas assoziiert ist (Vegiopoulos et al., 2010). Doch nicht nur Veränderungen der Genexpression hinsichtlich eines vermehrten *Brownings* sondern auch die direkte intraabdominelle Transplantation von braunem Fettgewebe führte in den Empfängertieren bereits 8-12 Wochen nach Transplantation zu einer klaren Verbesserung der Glucosetoleranz, einer gesteigerten Insulinsensitivität, einer Verringerung des

Körpergewichtes und insbesondere der Fettmasse, sowie einer kompletten Umkehr von HFD-induzierter Insulinresistenz (Stanford et al., 2013). Das Ausmaß dieser außerdem auch IL-6-abhängigen positiven Effekte korrelierte hierbei direkt mit der Menge an transplantiertem BAT (Stanford et al., 2013).

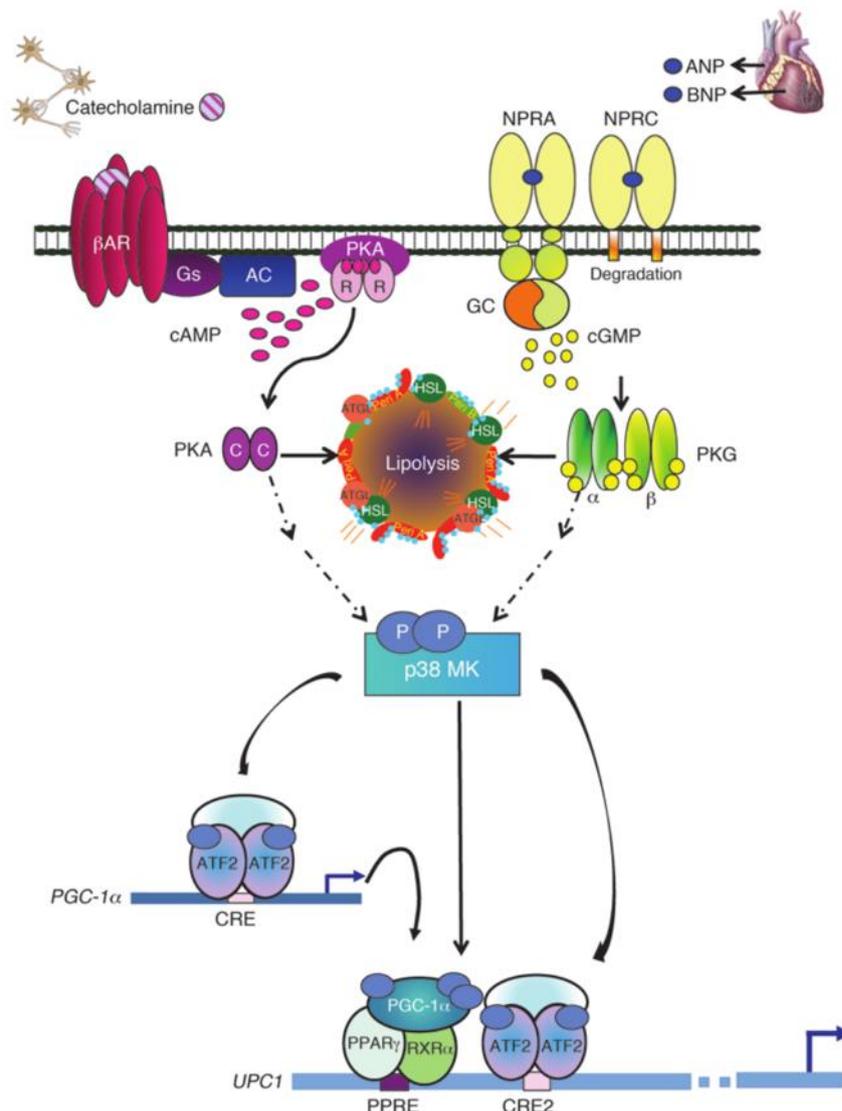
Im Einklang mit diesen Befunden konnte außerdem gezeigt werden, dass die selektive Inhibierung des *Brownings*, ohne Beeinflussung der BAT-Aktivierung, durch Deletion von *Prdm16* in Tieren auf HFD in einer schweren Adipositas, einhergehend mit einer Lebersteatose und Insulinresistenz resultiert (Cohen et al., 2014). Auch die Deletion von *Ucp1* führte im Mausmodell zu einer massiven Zunahme an Körpergewicht und insbesondere der Körperfettmasse und verhinderte darüber hinaus den Ablauf Diät-induzierter, sowie Kälte-induzierter Thermogenese (Feldmann et al., 2009).

Während eine Unterscheidung von weißem und braunem Fettgewebe sowohl morphologisch als auch basierend auf histochemischen oder genetischen Aspekten recht einfach ist, gestaltet sich die Differenzierung zwischen beigen und braunen Fettzellen auf Grund der großen Homologie eher schwierig. Anhand der Identifizierung hochspezifischer Marker gelang Walden et al. eine genetische Unterscheidung von BAT und beigen Fettzellen. Da *Ucp1* sowohl in BAT als auch beigen Depots exprimiert wird, konnte dieses nicht zu einer sinnvollen Unterscheidung herangezogen werden. Beige Fettdepots zeichnen sich jedoch durch eine hohe Expression des Transkriptionsfaktors *Homeobox c9* (*Hoxc9*) aus, wohingegen klassisches BAT erhöhte Level des Zinkfingerproteins C1 (*ZIC1*) exprimiert (Walden et al., 2012). Die daraus resultierenden Untersuchungen ergaben in supraklavikulären Fettdepots erwachsener Menschen vor allem signifikant erhöhte Expressionslevel beiger Adipozytenmarker (Sharp et al., 2012; Wu et al., 2012; Jespersen et al., 2013), was die Vermutung nahe legt, dass es sich bei den in Erwachsenen detektierten BAT Depots nicht um klassische braune Fettzellen sondern vielmehr um induzierbares BAT, also beige Fettzellen handeln könnte (Wu et al., 2012; Wu et al., 2013). Aktuelle Studien legen außerdem den Schluss nahe, dass wie auch beim altersbedingten Verlust braunen Fettgewebes, die genaue Lokalisation des Depots eine wichtige Rolle spielt (Heaton, 1972), da oberflächlich lokalisiertes Fett im Nackenbereich einige WAT-spezifischen Eigenschaften aufweist, wohingegen tiefergelegene Depots klassische Charakteristiken brauner Fettzellen zeigen (Cypess et al., 2013).

Zusammenfassend konnte klar gezeigt werden, dass auch in Erwachsenen metabolisch aktives braunes Fettgewebe oder zumindest aktivierbares beiges Fettgewebe vorhanden ist. Diese beigen Fettzellen spielen, zumindest im Tiermodell, nachgewiesenermaßen eine wichtige Rolle hinsichtlich Energieverbrauch und Metabolismus und stellen somit eine wichtige neue Therapieoption im Kampf gegen Adipositas dar. Auch wenn im Menschen hierfür noch weitere Untersuchungen notwendig sind und auch die genaue Identität der beigen und/oder braunen Fettdepots bislang nicht eindeutig geklärt werden konnte, so konnten die bisherigen Untersuchungen und Forschungsergebnisse dennoch deutlich machen, dass der therapeutische Einsatz von BAT-Aktivatoren oder Substanzen, welche das *Browning* fördern auch in Menschen ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von Adipositas darstellen könnte.

### 1.4.4 Bedeutung der cyclischen Nucleotide für Adipozytenreifung, Thermogenese und Adipositas

Die cyclischen Nucleotide cAMP und cGMP spielen als sekundäre Botenstoffe eine zentrale Rolle bei der Transmission hormoneller Signale in Adipozyten. Sie entfalten ihre Wirkung hierbei über eine Vielzahl an Signalwegen, was deren vollständige Aufklärung erschwert (Pfeifer and Hoffmann, 2014).



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung zum Einfluss cyclischer Nucleotide auf das thermogenetische Programm brauner Fettzellen**

Catecholamine sind in der Lage über  $\beta$ -Adrenozeptoren ( $\beta$ AR) die G-Protein-gekoppelte Adenylcyclase (AC) zu aktivieren, wodurch es zu einem intrazellulären cAMP-Anstieg kommt. Aktivierung der PKA über cAMP führt zur Translokation der katalytischen Domäne der PKA und ermöglicht dieser, die Hormonsensitive Lipase (HSL) und weitere Targets zu phosphorylieren, was die Lipolyse der gespeicherten Triglyceride fördert. Die Lipolyse kann auch über Natriuretische Peptide (NP) wie atriales NP (ANP) oder *brain-derived* NP (BNP) aktiviert werden. Aktivierung der NP-Rezeptoren A und B (NPRA, NPRB) führt zur Bildung von cGMP, welches wiederum über Stimulation der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) die Lipolyse aktivieren kann. Des Weiteren können die

cyclischen Nukleotide die p38 MAP-Kinase (p38MK) aktivieren, was den Ablauf des thermogenetischen Programms über Stimulation der Expression von *Uncoupling Protein 1* (Ucp1) in Mitochondrien fördert.

Die Produktion von cAMP durch die Adenylylcyclasen (AC) wird durch die Aktivierung G<sub>s</sub>-gekoppelter  $\beta_3$ -Adrenozeptoren mediiert, welche durch Catecholamine aktiviert werden können. Als Aktivator der cAMP abhängigen Proteinkinase (PKA) ist cAMP ein essentielles Signalmolekül in Adipozyten jeder Farbe und Herkunft (Pfeifer and Hoffmann, 2014) und spielt insbesondere in frühen Stadien der Fettzellreifung eine wichtige Rolle (Petersen et al., 2008). Einige der wichtigsten Targets der PKA stellen die Hormon-sensitive Lipase (HSL) sowie deren funktionaler Gegenspieler Perilipin A dar (Robidoux et al., 2004). Durch Phosphorylierung der HSL wird deren katalytische Aktivität verstärkt und es kommt darüber hinaus zu ihrer Translokation an die Oberfläche der Lipidtröpfchen (Djouder et al., 2010), wodurch Lipolyse stattfinden kann und Fettsäuren liberiert werden können. Neben der cAMP/PKA-Signaltransduktion können  $\beta_3$ -Adrenozeptoren auch über Src- und ERK-abhängige Signalkaskaden eine Lipolyse in Fettzellen bedingen. Besonders unter hoher Agonistenkonzentration kann diese Src/ERK-basierte Lipolyse teilweise auch cAMP unabhängig vermittelt werden (Robidoux et al., 2006). Im Zuge des lipolytischen Prozesses liberierten freie Fettsäuren können nun wiederum in Mitochondrien aufgenommen werden, wo sie die Expression von Ucp1 und somit die zitterfreie Thermogenese auslösen. Zusätzlich ist die PKA auch in der Lage über die p38 MAP-Kinase (p38MK) und unter nachfolgender Beteiligung des ATF2/PGC-1 $\alpha$ -Signalweges und/oder direkte Phosphorylierung des PGC-1 $\alpha$ /PPAR $\gamma$ -Komplexes die Expression von Ucp1 zu steigern (Cao et al., 2004; Bordicchia et al., 2012). Neben Lipolyse und *Browning* wird jedoch auch die Differenzierung von Präadipozyten direkt durch die cAMP-vermittelte PKA-Aktivierung beeinflusst. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass cAMP die Differenzierung von 3T3-L1-Präadipozyten Dosis-abhängig blockieren kann (Li et al., 2008a). Insbesondere das *cAMP regulatory element-binding Protein* (CREB) ist hierbei für das Fortschreiten der Zelldifferenzierung unabdingbar (Zhang et al., 2004; Farmer, 2006). Während lange Zeit in erster Linie cAMP-Signalwege in Adipozyten im Fokus der Forschung standen, sind hier mittlerweile vor allem cGMP-abhängige Mechanismen in den Vordergrund gerückt. Nicht zuletzt auf Grund richtungsweisender Befunde, die erstmals einen klaren Zusammenhang der cGMP-Signalkaskade und der Kontrolle der Energiehomöostase hergestellt haben (Nisoli et al., 2004; Bordicchia et al., 2012; Moro and Lafontan, 2013) (Pfeifer et al., 2013). Der sekundäre Botenstoff cGMP kann sowohl durch lösliche (sGC) als auch durch partikuläre Guanylylcyclasen (pGC) nach deren Aktivierung durch Stickstoffmonoxid (NO) beziehungsweise natriuretische Peptide (NPs) gebildet werden (Lucas et al., 2000). Die sGC setzt sich als Heterodimer aus einer  $\alpha$ - sowie einer  $\beta$ -Untereinheit zusammen und kommt in zwei Isoformen,  $\alpha_1\beta_1$  sowie  $\alpha_2\beta_1$ , vor (Friebe and Koesling, 2009), wobei in Fettgewebe vor allem die  $\alpha_2\beta_1$ -Isoform exprimiert wird (Budworth et al., 1999; Jennissen et al., 2012). Natriuretische Peptide wie ANP (*atrial NP*) und BNP (*brain NP*), welche physiologisch beispielsweise als Reaktion auf myokardiale Über-/Dehnung ausgeschüttet werden, entfalten ihre Wirkung durch Bindung an den NP-Rezeptor A (NPR-A) und die anschließende Produktion von cGMP (Jeandel et al., 1989). Erst in den letzten Jahren ist es gelungen, die Auswirkung der NPs auf die Regulation des Körpergewichtes und die Energiehomöostase aufzuklären.

Bislang sind drei Rezeptor-Gruppen als Targets für GMP bekannt: Phosphodiesterasen (PDEs), *cyclic nucleotide gated channels* (CNGs) sowie cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs) (Pfeifer et al., 1999; Hofmann et al., 2000; Francis et al., 2010), wobei vor allem PDEs und cGKs in den meisten Geweben bedeutend sind.

Über seine verschiedenen nachgeschalteten Effektoren kann cGMP in einem breiten Spektrum an Zellen agieren und ist hier vor allem in die Regulation der mitochondrialen Biogenese involviert (Nisoli et al., 1998; Nisoli et al., 2003; Nisoli et al., 2004). Die genauen dem cGMP-Signalling in braunem Fettgewebe zu Grunde liegenden Mechanismen konnten jedoch erst in den letzten Jahren aufgedeckt werden. Mit der Entdeckung der Expression von cGKI und PDE3B Rezeptoren in braunen Fettzellen (Haas et al., 2009) wurde deutlich, dass cGMP offensichtlich über verschiedene Mechanismen in der Lage ist, die Bildung von Mitochondrien und die Aktivität von braunem Fettgewebe zu beeinflussen. Während die cGMP vermittelte Blockade der cAMP-degradierenden PDE3B zu einem Anstieg an cAMP und somit einer indirekten Aktivierung der verschiedenen, bereits beschriebenen cAMP/PKA-Signalwege führt (Cao et al., 2004), kann der sekundäre Botenstoff auch direkt die cGKI aktivieren (Haas et al., 2009). Die hieraus resultierende Phosphorylierung von RhoA an Serin 188 führt zu dessen Inaktivierung. Dies kann wiederum den negativen Einfluss von RhoA auf die Insulinwirkung verhindern. Darüber hinaus ergaben Untersuchungen an PKG-defizienten Tieren stark ausgeprägte Differenzierungsdefekte des BAT, einhergehend mit einer reduzierten BAT-Funktion, was den Schluss nahelegt, dass der cGMP/cGKI-Signalweg essentiell für eine physiologische BAT-Entwicklung und Funktion ist (Haas et al., 2009; Miyashita et al., 2009).

Dass cGMP auch in weißem Fettgewebe eine wichtige physiologische Rolle einnimmt lässt bereits die Expression nahezu aller in die Produktion und Degradierung des Botenstoffes involvierten Enzyme und Targets in WAT erahnen (Mitschke et al., 2013). In Kulturen von 3T3-L1 und primären weißen Adipozyten konnte außerdem gezeigt werden, dass cGMP in der Lage ist, die Adipogenese von Präadipozyten zu verbessern (Zhang et al., 2010b; Shen et al., 2011; Bordicchia et al., 2012). Die Behandlung von Zellen mit cGMP-erhöhenden Substanzen wie Sildenafil oder cGMP selbst war sowohl in der Lage, die Lipideinlagerung der Zellen zu erhöhen, als auch die Expression adipogener Marker zu steigern (Zhang et al., 2010b; Mitschke et al., 2013). Neben diesen positiven Effekten auf die Adipogenese konnte cGMP auch ein regulierender Effekt auf die Adipozytengröße sowie Einfluss auf die Sekretion von Adipokinen und Adipozytokinen nachgewiesen werden (Miyashita et al., 2009; Chen et al., 2011; Tateya et al., 2011; Mitschke et al., 2013). Diese positiven Einflüsse auf Fettzellgröße und Zytokin-Freisetzung helfen entzündliche Prozesse in weißem Fettgewebe, sowie daraus resultierende Erkrankungen zu vermeiden und unterstützen somit die Entstehung von gesunden weißen Fettzellen (Mitschke et al., 2013; Pfeifer et al., 2013).

Im Hinblick auf die Therapie von Übergewicht und Adipositas werden klinisch relevante Möglichkeiten zur Steigerung des Energieumsatzes dringend benötigt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass cGMP außerdem in der Lage ist, *Browning* von weißen Fettdepots zu induzieren und somit die Entstehung von beiger Fettzellen zu fördern (Bordicchia et al., 2012; Jennissen et al., 2012; Mitschke et al., 2013). Weshalb das für die Thermogenese essentielle Ucp1 lediglich in braunen, nicht jedoch in weißen Fettzellen exprimiert wird, konnte bislang

noch nicht vollständig geklärt werden, könnte aber in großem Maße zum Verständnis von *Browning* und BAT-Aktivierung beitragen. Sowohl die Gewebe-abhängige Expression von Transkriptionsfaktoren als auch die Methylierung des Ucp1-Promotors könnten hierbei von Bedeutung sein (Leonardsson et al., 2004; Kiskinis et al., 2007). Während der Ucp1-Promotor in weißem Fettgewebe eine stärkere Methylierung und daraus resultierend eine verminderte Expression aufweist (Kiskinis et al., 2007; Shore et al., 2010), kann die Demethylierung in 3T3-L1 Kulturen die Ucp1-Expression erwartungsgemäß steigern (Mitschke et al., 2013). In 3T3-L1 Zellen scheint diese Demethylierung essentiell für die Expression von Ucp1 zu sein, kann im Gegensatz dazu in murinen Primärzellen jedoch auch durch die Zugabe von cGMP erreicht werden (Mitschke et al., 2013). Und auch in humanen weißen Adipozyten kann ein *Browning* durch die Behandlung der Zellen mit ANP erreicht werden (Bordicchia et al., 2012), ohne zuvor zwingend eine Demethylierung des Ucp1-Promotors durchzuführen. Sowohl im Mausmodell (Mitschke et al., 2013), als auch in humanen Zellen (Bordicchia et al., 2012) konnte gezeigt werden, dass die Applikation eines cGMP-Analogons bzw. die Supplementierung mit ANP zu einem cGKI-vermittelten *Browning* der jeweiligen Zellen führte.

Neben seinen vielfältigen Einflüssen auf verschiedene Fettgewebe ist cGMP auch in der Lage über Gewebe wie Muskulatur (Nisoli et al., 2003; Moro et al., 2007; Miyashita et al., 2009), Leber (Kierner et al., 2002; Tateya et al., 2011; Moro and Lafontan, 2013) oder Pankreas (Kaneko et al., 2003; You and Laychock, 2011) metabolische Prozesse zu regulieren und hat somit weitreichende Einflüsse auf die Energiehomöostase im Körper (Moro and Lafontan, 2013; Pfeifer et al., 2013).

Obwohl die Funktionen der cyclischen Nukleotide und deren Signalkaskaden mittlerweile gut analysiert sind, werden weitere Untersuchungen und Studien benötigt, um die vielfältigen, eine große Anzahl an Geweben betreffenden, Mechanismen und Auswirkungen dieser sekundären Botenstoffe hinsichtlich mitochondrialer Funktion, Stoffwechsel und auch resultierender Begleiterscheinungen vollständig aufklären und verstehen zu können. Dies, wie auch ein besseres Verständnis der, der Thermogenese zu Grunde liegenden Prozesse und Regulationsmechanismen werden dringen benötigt, um in diesem Feld neue Therapieansätze im Kampf gegen Adipositas und den daraus resultierenden Folgeerkrankungen schaffen zu können.

## **1.5 Ionenkanäle im Zusammenhang mit Übergewicht und Adipositas**

Ionenkanäle sind in eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert, welche in Zusammenhang mit Übergewicht und Adipositas stehen. So sind beispielsweise in Epithelzellen des Darms lokalisierte Kalium-Kanäle essentiell für die Generierung des Membranpotentials, wie auch die Wiederverwertung von  $K^+$ -Ionen, zwei wichtigen Voraussetzungen für die Funktionalität epithelialer Transporter (Li et al., 2008b). Sie erzeugen die treibende Kraft für die  $Na^+$ -abhängige Aufnahme von Glucose in intestinale Epithelzellen (Chen et al., 2016). In kultivierten Zellen wie auch im Tiermodell konnte die selektive Blockade des spannungsabhängigen KCNQ1-Kanals die Glucose-Toleranz verbessern sowie die Glucose-stimulierte Insulinfreisetzung und GLP1-Plasmakonzentration erhöhen (Liu et al., 2014). In weiteren Arbeiten konnten KCNQ1-Kanäle mit Diabetes mellitus

Typ 2 in Zusammenhang gebracht werden (Unoki et al., 2008; Saif-Ali et al., 2011). Manche Befunde implizieren, dass der KCNQ1-Kanal auch eine wichtige Position in der Regulation der intestinalen Nährstoffaufnahme innehat (Vallon et al., 2005). Auch ATP-abhängige Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ ) modulieren durch Freisetzung inhibitorischer gastrischer Peptide den Glucose-Metabolismus (Parker et al., 2009). Die Deletion des  $K_V1.3$  Kanals ist in Tieren mit signifikant reduzierter Gewichtszunahme auf HFD und einer gegenüber WT-Tieren verminderten Hyperglykämie assoziiert (Xu et al., 2003c). Ob die  $K^+$ -Kanäle die Regulation Blutglucose hierbei vor allem über periphere oder zentrale Mechanismen modulieren ist umstritten (Mussig et al., 2009; Tucker et al., 2012; Upadhyay et al., 2013). Hinsichtlich der  $K_V1.3$  Kanäle werden neben peripheren Effekten auf Insulinsensitivität in Maus und Mensch (Straub et al., 2011; Ngala et al., 2014) besonders Effekte auf die Elektrophysiologie der intestinalen Epithelzellen diskutiert (Vallon et al., 2001). Aber auch neuronal spielt der  $K_V1.3$  eine wichtige Rolle bei der Modulation des Körpergewichtes. Tucker et al. (Tucker et al., 2008, 2012) konnten zeigen, dass die Mechanismen, welche in  $K_V1.3$ -defizienten Tieren zu einer Erhöhung des Energieverbrauches führen, auf der Funktion des *Bulbus olfactorius* beruhen (Tucker et al., 2012). Während die Deletion des  $K_V1.3$  Kanals in Mäusen zu einer Resistenz gegenüber Diät-induzierter Adipositas, einem gesteigertem Metabolismus während der hellen Phase sowie einer Steigerung des gesamten Energieverbrauches führte (Tucker et al., 2008), konnten diese Effekte durch eine olfaktorische Bulbektomie vollständig aufgehoben werden (Tucker et al., 2012). Der Einsatz eines  $K_V1.3$  Kanal-Blockers, ShK186, konnte in Mäusen sowohl Hochfett- als auch Hochkohlenhydrat-induzierte Körpergewichtszunahmen verhindern oder, wenn zu einem späteren Zeitpunkt eingesetzt, auch therapieren und damit rückgängig machen (Upadhyay et al., 2013). Somit stellt der  $K_V1.3$  Kanal und insbesondere seine selektive Blockade ein sehr interessantes Target für potentielle neue Therapieansätze im Kampf gegen Adipositas und Insulinresistenz dar.

Neben Kaliumkanälen spielen auch eine Reihe von Calciumkanälen eine wichtige Rolle bei der Regulation der intestinalen Glucose-Aufnahme und Verwertung (Chen et al., 2016). Obwohl die genauen zu Grunde liegenden Prozesse noch immer unklar sind, konnte gezeigt werden, dass die Gabe verschiedener Calciumkanalblocker zu einer vermehrten Glucose-Aufnahme über SGLT1 führten (Hyson et al., 1996). Erst kürzlich wurde ein neues Modell hinsichtlich der Calcium-regulierten Glucose-Aufnahme im Intestinum vorgestellt, welches zwei verschiedene Mechanismen beschreibt. Bei niedrigen luminalen Glucosekonzentrationen wird weiterhin von einer SGLT1-vermittelten Glucose-Absorption ausgegangen. Bei einem Anstieg der luminalen Zuckerkonzentration, welche die Kapazitäten der SGLT1 übersteigt, werden jedoch zusätzlich GLUT2-Transporter in die apikale Membran eingebaut (Tharabenjasin et al., 2014; Kuhre et al., 2015). Da dieser Vorgang von der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  abhängig ist spielen Calciumkanäle, insbesondere  $Ca_V1.3$  Kanäle, eine wichtige Rolle bei der Glucose-Aufnahme in intestinale Epithelzellen (Nakkrasae et al., 2010).

Ionenkanäle sind jedoch nicht nur in die intestinale Glucoseabsorption und Verwertung involviert, sondern scheinen auch hinsichtlich der Entstehung von Adipositas und einem metabolischen Syndrom von Bedeutung. Der G-Protein gekoppelte Einwärts-Gleichrichter  $K^+$ -Kanal 4 (GIRK4), auch unter KCNJ5 bekannt, ist einer von vier Kaliumkanälen dieser GPCR-

Familie und ist in Tieren nachweislich an der hypothalamischen Kontrolle der Energiehomöostase beteiligt. Seine homozygote Deletion führte in Mäusen zu einer Prädisposition für schwere Adipositas (Perry et al., 2008). Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen konnte die Lokalisation des GIRK4 in ventromedialen und ventrolateralen Regionen des *Nucleus arcuatus* nachgewiesen werden (Kloukina et al., 2012). Die co-Lokalisation von GIRK4 und AgRP sowie NPY weist auf eine Funktion des Kanals hinsichtlich der Erregbarkeit der Membranen von Neuronen hin, welche das Körpergewicht regulieren (Kloukina et al., 2012). Erst kürzlich konnte eine Humanstudie an Probanden aus der chinesischen Provinz Xinjiang, welche mit einem vermehrten Auftreten des metabolischen Syndroms zu kämpfen hat, auch verschiedene SNPs im GIRK4-Gen mit der Entstehung von Adipositas und einem metabolischen Syndrom in Zusammenhang bringen. Dabei scheinen vor allem jüngere Probanden im Alter von 30-49 Jahren betroffen, wohingegen in Patienten im Alter von 50-70 Jahren keine direkte Assoziation nachgewiesen werden konnte (Li et al., 2012b).

Ein weiterer Kaliumkanal, welcher in engem Zusammenhang mit Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 steht ist der  $K_{ATP}$ -Kanal (Seino et al., 2000), welcher vor allem in pankreatischen  $\beta$ -Zellen, aber auch in Muskeln, im Gehirn, den Nieren und kardialen Myozyten exprimiert wird (Noma, 1983; Ashcroft, 1988). Er dient als ATP-Sensor und ist somit in der Lage, beim Glucose-Metabolismus entstehendes ATP zu detektieren und über seine Aktivität die Insulinfreisetzung aus  $\beta$ -Zellen zu regulieren (Meglasson and Matschinsky, 1986; Cook et al., 1988; Mislér et al., 1992). Auf diese Weise können  $K_{ATP}$ -Kanäle den Metabolismus direkt mit der elektrischen Erregbarkeit von Membranen und der Freisetzung von Insulin koppeln (Ashcroft, 1988), was sie bereits zu einem willkommenen Target für die Therapie von Diabetes mellitus macht. Sulfonylharnstoffe, wie Glibenclamid oder Glimepirid führen nach Bindung an die SUR-1-Untereinheit von  $K_{ATP}$ -Kanälen zu deren Inaktivierung, wodurch es auf Grund der gesunkenen Kaliumleitfähigkeit zu einer Depolarisation des Membranpotentials kommt, was wiederum die Offenwahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Calciumkanäle erhöht und durch steigende  $[Ca^{2+}]_i$  die Freisetzung von Insulin begünstigt (Seino et al., 2000).

Die postulierten Funktionen der  $K_{ATP}$ -Kanäle hinsichtlich der Zellfunktion konnten jedoch erst durch die Generierung von Kir6.2-defizienten Mäusen bewiesen werden (Miki et al., 1997; Miki et al., 1998). Die globale Deletion des KCNJ11 Genes, welches für Kir6.2 Untereinheit codiert, führte in  $\beta$ -Zellen von Mäusen zu basal erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$ , wohingegen die intrazelluläre Calciumkonzentration weder durch Glucose noch Tolbutamid, einem potenten  $K_{ATP}$ -Kanal-Blocker, gesteigert werden konnte (Miki et al., 1998; Seino et al., 2000). Außerdem konnte in  $K_{ATP}$ -Kanal-defizienten Tieren weder durch Tolbutamid noch durch Glucose-Stimulation eine signifikante Insulinfreisetzung ausgelöst werden (Miki et al., 1998). Die  $\beta$ -Zell-spezifische Deletion des  $K_{ATP}$ -Kanals führte zu massiver Hyperglykämie der adulten Tiere wie auch zu einer merkbar reduzierten Insulinfreisetzung (Miki et al., 1997). Darüber hinaus wiesen die transgenen Mäuse eine reduzierte Zahl an  $\beta$ -Zellen und eine vermehrte Anzahl apoptotischer Inselzellen auf (Miki et al., 1997). Doch nicht nur die Insulinfreisetzung und die Entstehung von Diabetes mellitus kann durch  $K_{ATP}$ -Kanäle beeinflusst werden. Besonders ein SNP des  $K_{ATP}$ -Kanals, E23K, wurde immer wieder mit Diabetes mellitus aber auch Erkrankungen wie Adipositas in Zusammenhang gebracht (Bonfanti et al., 2015). Darüber hinaus scheinen  $K_{ATP}$ -

Kanäle auch einen direkten Einfluss auf die Regulation catecholaminerger Neurone zu haben, welche die Sympathikus-Aktivität in BAT sowie die Energiehomöostase kontrollieren (Tovar et al., 2013). Die Inhibierung dieser  $K_{ATP}$ -Kanal-abhängigen neuronalen Aktivität verstärkte eine Diät-induzierte Adipositas (DIO) in Mäusen (Tovar et al., 2013). Diese vermehrte DIO beruht zum einen auf einem reduzierten Energieumsatz, aber auch auf einer reduzierten Sympathikus-Aktivität in BAT im *Steady-State* Zustand. Auch die zentrale Applikation von Glucose konnte diese nur geringfügig steigern, was zusammengenommen die Thermogenetische Kapazität und Funktionalität des BAT massiv unterdrückt (Tovar et al., 2013).

Die Deletion von CNTNAP2 und TAG1, zwei im juxtapanodalen Bereich der Janvier'schen Schnürringe exprimierte Proteine, welche eng mit der Regulation von  $K^+$ -Kanälen assoziiert sind, führte im Tiermodell zu einer Senkung der Nahrungsaufnahme und konnte auf diese Weise einer Diät-assoziierten Adipositas komplett entgegenwirken (Buchner et al., 2012). Die genauen mechanistischen Grundlagen sind zwar bislang noch nicht geklärt, weisen aber erneut auf eine Beteiligung von Kaliumkanälen an der Regulation von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht hin.

Aber auch bereits bei der Differenzierung und Proliferation von Präadipozyten und reifen Fettzellen spielen verschiedene Ionenkanäle eine zentrale Rolle. In 3T3-L1 Zellen scheinen hierbei vor allem membranständige IK-Kanäle, Kaliumkanäle mit mittlerer Leitfähigkeit (s. Kapitel 1.1.1), von großer Bedeutung, da deren Blockade durch Zugabe von TRAM-34, einem potenten IK-Blocker, die Zellproliferation der Fettvorläuferzellen konzentrationsabhängig unterdrücken konnte (Zhang et al., 2012). Auch die Blockade der ebenfalls exprimierten Kir2.1- sowie Clcn3-Kanäle konnte die Proliferation der 3T3-L1-Zellen inhibieren (Zhang et al., 2012). In diesem humanen Präadipozytenmodell konnte die Expression verschiedener Ionenkanäle, unter anderem des BK-Kanals, nachgewiesen werden (Hu et al., 2009). Der in beinahe 93% der untersuchten Präadipozyten vorkommende Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit scheint hier neben den in etwa 30% der Vorläuferzellen vorkommenden  $K_v4.2$ -Kanälen eine zentrale Rolle bei der Proliferation der Präadipozyten zu spielen (Hu et al., 2009). Untersuchungen hinsichtlich der Zellzyklus-Progression ergaben, dass der BK-Kanal insbesondere am G0/G1-Übergang, sowie am G1/S-Transit der Zellen beteiligt ist (Hu et al., 2009). Weitere bislang bekannte Einflüsse des BK-Kanals auf Fettzellreifung und Adipositas werden in Kapitel 1.6 näher beschrieben.

Eine kürzlich erschienene Studie konnte außerdem die Existenz von TRP-Kanälen in 3T3-L1-Präadipozyten sowie in viszeralen Fettdepots von Maus und Mensch nachweisen (Zhang et al., 2007). Insbesondere der TRP-Vanilloid Typ 1-Kanal (TRPV1) scheint bei der Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Fettzellen eine zentrale hemmende Funktion inne zu haben. Die Aktivierung der Kanäle verhinderte in 3T3-L1-Zellen *in vitro* die Adipogenese und konnte darüber hinaus in Mäusen auch *in vivo* Fettleibigkeit reduzieren (Zhang et al., 2007). Auch in Menschen gibt es Hinweise auf ein TRPV1-vermitteltes, vermindertes Auftreten von Adipositas (Ohnuki et al., 2001). Auch wenn die genauen, molekularen Mechanismen noch immer nicht aufgeklärt werden konnten scheint es dennoch sicher, dass TRPV1 auch in die Thermogenese und die Regulation der Expression von thermogenetisch aktiven Proteinen wie Ucp1 involviert zu sein scheint und somit auch auf diesem Wege in den Energiehaushalt

und die Körpergewichtsentwicklung eingreifen kann (Hwang et al., 2005; Fernandes et al., 2012).

## **1.6 Potentielle physiologische Funktion des BK-Kanals in Adipozyten**

Neben der Vielzahl an Ionenkanälen, insbesondere Kaliumkanälen, welche die Energiehomöostase, den Metabolismus, die Glucose-Aufnahme, die Insulinfreisetzung und viele weitere Prozesse im Zusammenhang mit Adipositas beeinflussen, verdichten sich auch die Hinweise auf eine massive Beteiligung eines weiteren wichtigen Kaliumkanals hinsichtlich der Entstehung von Adipositas immer mehr.

Wie bereits beschrieben (s. Kapitel 1.5) konnten unter anderem auch BK-spezifische Kaliumströme in murinen 3T3-L1 Zellen nachgewiesen werden (Zhang et al., 2012). Funktionale Untersuchungen deuteten außerdem auf eine Beteiligung des BK-Kanals an der Proliferation der Präadipozyten-Linie hin (Zhang et al., 2012). Auch in humanen Fettvorläuferzellen konnte vor kurzem die Existenz von BK-Kanälen und insbesondere deren zentrale Rolle bei der Zellzyklus-Progression nachgewiesen werden (Hu et al., 2009).

Erst im Jahr 2011 gelang der Gruppe um Hong Jiao ein entscheidender Durchbruch bei der Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen dem BK-Kanal und Adipositas. In einer Genom-weiten Assoziationsstudie (GWAS) konnte das KCNMA1-Gen, welches für die  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals codiert, erstmals als neuer Suszeptibilitäts-Locus für Adipositas identifiziert werden (Jiao et al., 2011). In 5 der 6 untersuchten europäischen Kohorten konnte ein SNP in KCNMA1 (rs2116830) hochsignifikant mit schwerer Adipositas der Probanden in Zusammenhang gebracht werden. Untersuchungen der mRNA-Level subkutaner abdomineller Fettdepots der schlanken und adipösen Testpersonen ergab außerdem eine etwa 4-fach erhöhte Expression des BK-Kanals in abdominalem Unterhautfettgewebe der dicken Studienteilnehmer. Ebenso war die BK-Expression in isolierten Fettzellen der Probanden mit Adipositas auf mRNA-Ebene signifikant höher als in schlanken Kontrollen (Jiao et al., 2011). Auch eine Metaanalyse von 5 weiteren Folge-Kohorten konnte die Assoziation von KCNMA1 mit Adipositas bestätigen (Wellcome Trust Case Control, 2007). Nicht geklärt werden konnte in diesem Zusammenhang jedoch die Frage, ob die vermehrte BK-Expression Folge des adipösen Zustandes der Probanden war, oder ob tatsächlich der SNP im KCNMA1-Gen die Ursache für das schwere Übergewicht der untersuchten Subjekte darstellt. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem KCNMA1 SNP rs2116830 und dem BMI konnte in der Studie nicht hergestellt werden, was die Autoren zu der Spekulation veranlasste, dass KCNMA1 möglicherweise bei einer moderaten Zunahme der Fettmasse keine Rolle spielt, hingegen aber bei exzessiver Fetteinlagerung im Zusammenhang mit schwerer Adipositas eine wichtige Funktion inne hat (Jiao et al., 2011). Da Fettgewebe eine sehr hohe Erneuerungsrate von etwa 10% der Zellen pro Jahr aufweisen und insbesondere die Anzahl an Fettzellen einen hohen Impact auf die Fettmasse in Erwachsenen aufweist (Spalding et al., 2008) könnte der BK-Kanals möglicherweise über die Erhöhung der Fettzellzahl an der Entstehung von Adipositas beteiligt sein.

Untersuchungen an global BK-defizienten Tieren konnten zeigen, dass die ubiquitäre Deletion des BK-Kanals massiv vor exzessiver Gewichtszunahme unter HFD-Fütterung schützen kann,

wobei sich dieser Effekt nur zum Teil auf neuronale BK-Kanäle zurückführen lässt, wie Untersuchungen an Nestin-Cre-vermittelten BK-defizienten Tieren zeigen konnten (Dissertation von B. Mohammad, 2014, Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen).

Eine verminderte Nahrungsaufnahme konnte in BK-defizienten-Tieren ebenso wenig detektiert werden, wie eine erhöhte körperliche Aktivität, was eine Erklärung für den schlankeren Phänotyp der BK-defizienten Tiere hätte darstellen können. Stattdessen zeigen BK-KO Tiere sogar eine tendenziell eher reduzierte lokomotorische Aktivität (unpublizierte Daten von A. Schürmann, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke). Dementsprechend scheint die neuronale BK-Deletion in erster Linie über Hochregulation hypothalamischer Neuropeptide wie PACAP (*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) und Urocortin, welche für einen Anstieg des Energieumsatzes wichtig sind, einen Einfluss auf die Körpergewichtsentwicklung auszubilden. Dennoch können diese Effekte die Auswirkungen der globalen BK-Deletion nur partiell erklären, was den Einfluss peripherer BK-Kanäle auf die Körpergewichtsentwicklung nahelegt.

Auch die Glucose-Homöostase sowie die  $\beta$ -Zell Viabilität scheinen durch BK-Kanäle beeinflusst zu werden (Dufer et al., 2011). *In vitro* konnten unter basalen Bedingungen keine Unterschiede in der Insulinfreisetzung aus Wildtyp- oder BK-defizienten Inselzellen detektiert werden, die Stimulation mit höheren Glucose-Konzentrationen offenbarte jedoch Defizite in der Glucose-induzierten Insulinfreisetzung der BK-KO Zellen gegenüber Kontrollen. Dies lässt einen direkten Einfluss des BK-Kanals auf die Stimulus-Sekretionskopplung der Insulinfreisetzung vermuten (Dufer et al., 2011). Ein intraperitonealer Glucose-Toleranz-Test zeigte außerdem auch *in vivo* eine deutlich verschlechterte Glucose-Toleranz der BK-defizienten Tiere (Dufer et al., 2011), so dass dem BK Kanal eindeutig auch Effekte auf die den Glucose-Stoffwechsel zuzuschreiben sind.

Alle diese Befunden legen die Vermutung nahe, dass neben zentralen BK-Kanälen, welche Hunger und Sättigungsgefühl, sowie die zentrale Energiehomöostase regulieren auch Effekte durch periphere BK-Kanäle an der Entstehung des schlanken Phänotyps BK-defizienter Tiere beteiligt zu sein scheinen, was im Zuge dieser Arbeit näher untersucht werden soll.

## 1.7 Zielsetzung

Übergewicht und Adipositas nehmen in Deutschland aber auch weltweit mittlerweile pandemische Ausmaße an und zählen inkl. ihrer Folgeerkrankungen zu den 10 häufigsten Todesursachen in Deutschland. Trotz der enorm hohen Prävalenz, Mortalität und auch Kostenbelastung dieser Erkrankungen ist es bislang nicht gelungen, erfolgreiche Präventions- und Therapiemaßnahmen zu entwickeln. Neben pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten, welche derzeit vor allem im Einsatz von Substanzen zur Regulation des Hunger- und Sättigungssystems bestehen oder die Aufnahme von Nährstoffen aus der Nahrung reduzieren, ist in den letzten Jahren außerdem das Darmmikrobiom in den Fokus der Adipositas-Therapie getreten (Ley et al., 2006; Barlow et al., 2015). Dass auch Ionenkanäle eine wichtige Rolle bei der Regulation des Körpergewichtes spielen, wurde unter anderem bei pharmakologischer Blockade des  $K_v1.3$ -Kanals deutlich. Im Mausmodell konnte diese Behandlung hocheffektiv die Manifestation einer Diät-induzierten Adipositas (DIO) verhindern und therapieren, was darüber hinaus auch positive Effekte hinsichtlich Blutglucose-Konzentration, Insulinsensitivität und Blutfettwerten zur Folge hatte (Upadhyay et al., 2013). Interessanterweise ist ein weiterer Kaliumionenkanal, der BK-Kanal, mit der Entstehung und Manifestation von Adipositas assoziiert. Wie eine genomweite Assoziationsstudie erst vor wenigen Jahren zeigen konnte, steht ein SNP im *KCNMA1* Gen hochsignifikant mit schwerer Adipositas im Menschen in Zusammenhang (Jiao et al., 2011). In diesen Patienten konnte außerdem eine massive Überexpression des BK-Kanals sowohl in Fettgewebe als auch isolierten Adipozyten festgestellt werden (Jiao et al., 2011). Dies steht in Einklang mit Befunden aus unserer eigenen Arbeitsgruppe, welche zeigen, dass die globale Deletion des BK-Kanals einen effektiven Schutz vor DIO darstellt (B. Mohammad, unveröffentlichte Dissertation 2014, Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen). Unglücklicherweise ist diese globale Deletion des BK-Kanals auch mit einer Reihe unerwünschter phänotypischer Ausprägungen, wie cerebellärer Ataxie (Sausbier et al., 2004), Hypertonie (Sausbier et al., 2005), Reizblasensymptomatik und Inkontinenz (Sprossmann et al., 2009) sowie erektiler Dysfunktion (Werner et al., 2005) assoziiert. Da die im globalen BK-Mausmodell beobachteten Auswirkungen außerdem nicht vollständig über neuronale Effekte erklärt werden konnten (B. Mohammad, unveröffentlichte Dissertation, Pharmazeutisches Institut Universität Tübingen, 2014) liegt die Schlussfolgerung nahe, dass auch BK-Kanäle in der Peripherie Körpergewicht und andere metabolische Parameter modulieren. Die Befunde der humanen Assoziationsstudie deuten darauf hin, dass insbesondere adipozytäre BK-Kanäle mit einer erhöhten Suszeptibilität für Adipositas assoziiert sind, die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen sind bislang jedoch völlig unklar. Es ist daher Ziel dieser Arbeit, mittels *in vitro* Untersuchungen sowie relevanter Mausmodelle und verschiedener diätetischer Fütterungsprotokolle die Rolle des adipozytären BK-Kanals bei krankhafter Fettleibigkeit zu untersuchen. Hierbei sollen insbesondere neue Einblicke in die Funktion des adipozytären BK-Kanals für Fettzellreifung und die Expansion der Fettgewebe ermöglicht und potentielle Einflüsse auf thermogenetische und metabolische Prozesse untersucht werden. Ein besseres Verständnis hinsichtlich der Rolle des adipozytären BK-Kanals könnte in diesem Zusammenhang Aufschluss darüber geben, inwiefern die genetische Deletion oder

pharmakologische Blockade des BK-Kanals in Fettzellen als zukünftiger Präventions- oder Therapieansatz Einsatz finden kann.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung, Hersteller
Absaugvorrichtung	Mini-Membran-Vakuumpumpe, Laboport
Analysenwaage	GR-202, A&D Instruments
Analysenwaage	VWR-124 Sartorius
Apotom	Techno 5. Ebene
Autoklav	VX-55, Systec
Autoklav	VX-120, Systec
Brutschrank	CB53, Binder
Brutschrank	CB150, Binder
Detektionssystem (Western Blot-Analyse)	EttanDige Imager, GE-Healthcare
Dispergieraggregat zur Gewebehomogenisierung	Polytron PT1200E, Kinematica
Eismaschine	ZBE 30-110, Ziegra
Elektrodenplatten für Western Blot	V20 SDB, Scie-Plas
Elektrophoresekammer für Genotypisierung	Sub-cell, BioRad
Elektrophoresekammer für Western Blot	Mini Protean Tetrasystem, BioRad
ELISA Scanner	AKP
Fluoreszenzmikroskop	Axiomager Z1, Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	BX51, Olympus
Gefrierschrank -20 °C	GN 263, Liebherr
Gefrierschrank -20 °C	GN 413, Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	Forma 900 series, Model 906, Thermo Scientific
Gefriertruhe -20 °C	GT 611, Liebherr
Geldokumentationsanlage	Dunkelhaube BioDocAnalyse, Biometra
Gewebehomogenisator	Dispergieraggregat 1130, Kinematica
Heizblock	Thriller Thermo Incubator, Peqlab
Heizplatte mit Steuerungseinheit (OP)	TCAT-2LV Controller, Physitemp
Isofluran-Narkoseeinheit	0258- Narkoseeinheit, Völker
Kryotom	Microm HM 560, Thermo Scientific
Kühlschrank	ST-TP1414, Comfort NoFrost, Liebherr
Kühlzentrifugen	Mikro 220R, Hettich
Kühlzentrifugen	X1R Multifuge, Heraeus
Lichtmikroskop für Zellkultur	DMIL LED, Leica
Lichtmikroskop für Zellkultur+Histologie	Axiovert 200M, Zeiss
Luftbefeuchter für Luftstromschrank	BH-860E, Honeywell
Luftstromschrank	Uniprotect, THF 3378-V02, Bioscape
Magnetrührer	Ikamag RCT, IKA
Magnetrührer mit Heizfunktion	MR82, Heidolph
Mehrfachdispenser	HandyStep S, Brand
Messschieber zur Tibiae-Vermessung	Digitale Schieblehre, Mitutoyo
Mikrotiterplatten-Photometer	Modell Sunrise, Tecan
Mikrowelle	MW9675, Severin
PCR-Maschinen	Mastercycler, Eppendorf
PCR-Maschinen	MastercyclerGradient, Eppendorf
pH-Meter	pH 540 GLP, WTW
pH-Meter	pH-Meter 761 Calimatic, Knick
Photometer	P330 Nanophotometer, Implen
Pipetten (10, 20, 200, 1000 µl)	Pipetman, Gilson
Pipetten (8-Kanal; 200, 1000 µl)	ResearchPro, Eppendorf
Pipettierhilfe	Accu jet pro, Brand
Präparierscheren, Pinzetten	FST
qRT-PCR Maschine	Opticon FD-3200, MJ Research
Reagenzglas-Rotator	Typ 3025, GFL

Gerät	Gerätebezeichnung, Hersteller
Reinstwasseraufbereitungsanlage	Purelab flex, Elga
Reinstwasseraufbereitungsanlage	Milli-Q Biocell, Millipore
Schüttler	S20 CAT, Neolab
Sicherheitsschrank	Typ 90, Düperthal
Sicherheitsschrank	für Säuren und Laugen, Düperthal
Sicherheitsschrank	Typ G90, Düperthal
Spannungs-/Stromgeber	EV 231, Consort
Spannungs-/Stromgeber	Standard Power Pack P25, BioRad
Spülmaschine	FX-70N, Hobart
Stereolupe für Transmitter-OP	M80, Leica
Stereolupe zur Organpräparation (für BAT-Kultur)	EZ5, Leica
Sterilwerkbank	Safe 2020, Thermo Scientific
Stickstoffbehälter	RS series, tec-lab
Stickstoff-Vorratstank	XL-100, Taylor-Wharton
Taschenwaage	LS2000H, G&G
Telemetriesystem	DataScience Int.
Temperatur-Rektalsonde	MLT 1404, AD Instruments
Transmitter Aktivität+Temp	DSI
Trockenschrank	IP20 WTB, Binder
Trockenschrank	Binder FD, Binder
Vortexer	Vortex-Genie 2 G560E, Scientific Ind.
Waage	BP2100S, Sartorius
Waage	PLJ600-1GM, Kern
Wärmelampe	Infrarotlampe, Beurer
Wasserbad	TW20, Julabo
Zentrifugen	Micro 220, Hettich

Tab. 2.1: verwendete Geräte

## 2.2 Software

Software	Verwendung	Hersteller
Axio Vision Rel 4.8	Histologie (Auswertung, Visualisierung)	Zeiss
Dataquest A.R.T.3.1	Auswertung Telemetrie-Messungen	DataScience Int.
EttanDige Imager 1.0	Western Blot (Scan-Software)	GE-Healthcare
FIJI	Bestimmung der Zellkerndichte	Open Source
GSA Image Analyser	Histologie (Auswertung, Visualisierung)	GSA
ImageQuant TL 7.0	Quantifizierung Western Blot	GE-Healthcare
Magellan 7	Auswertung Enzym-Immunoassay	Tecan
Microsoft Office	Routine-Arbeiten (Statistik etc.)	Microsoft
MIRAXViewer	Histologie (Auswertung, Visualisierung)	Zeiss
OpticonAnalysis 1.4	Quantifizierung qRT-PCR	MJ Research
Perseus	Auswertung Proteomik	MaxQuant
Primer 3 (Freeware)	Primer-Design (qRT-PCR)	Centerline Software
VevoStrain	Auswertung Echokardiographie	VisualSonics

Tab. 2.2: verwendete Software

## 2.3 Verbrauchsmaterialien und Kit-Systeme

Alle gängigen Standardchemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen und entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad für molekularbiologische Analysen. Sämtliche Lösungen und Puffer wurden mit autoklaviertem und deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) hergestellt. Übliche Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Stripetten sowie sämtliche Gefäße für die Zellkultur wurden von Multimed (Kirchheim), Corning-Fisher (Kaiserslautern), Sarstedt (Nümbrecht)

oder Greiner Bio-One (Frickenhausen) erworben. Sämtliche Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG (Ebersberg) bezogen.

## 2.3.1 Verbrauchsmaterialien

### Glasware und Plastikmaterial

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Deckgläser L24 x 60 mm	L.H26.1	Carl Roth GmbH
Eppendorf-Reaktionsgefäße 2,0 ml (safe lock)	0030 120.094	Eppendorf
Filter Tip Universal Pipettenspitzen 100 µl	772288	Greiner Bio-One
Filter Tip Univers. Pipettenspitzen 1000 µl	740288	Greiner Bio-One
Filter Tip Universal Pipettenspitzen 20 µl	774288	Greiner Bio-One
Filter Tip Universal Pipettenspitzen 200 µl	739288	Greiner Bio-One
Filterpapier Rotilabo®	CL67.1	Carl Roth GmbH
Filterpur Bottle Top Filter 0,2 µm: 250 ml	83.1822.101	Sarstedt
Glasplatten groß für Gelelektrophorese	43197	Bio-Rad
Glasplatten klein für Gelelektrophorese	48296	Bio-Rad
Konische Zentrifugenröhrchen 15 ml	430766	
Konisches Zentrifugenröhrchen 50 ml	430291	Corning
Küvetten	67.742	Sarstedt
Membran Immobilon® Millipore, PVDF	T831.1	Carl Roth GmbH
Objektträger	J2800AMNZ	Gerhard Menzel GmbH
PCR Tubes 0,5 ml	0030124.537	Eppendorf
Petrischalen	430167	Corning
Pipettenspitzen 10 µl	765288	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen 1000 µl	70.762	Sarstedt
Pipettenspitzen 20-200 µl	70.760.002	Sarstedt
Präzisionswischtücher Kimtech Science	AA64.1	Carl Roth GmbH
Rotilabo-Reaktionsgefäße 1,5 ml	4182.1	Carl Roth GmbH
Spritze 10 ml Luer-Lok	300912	Becton Dickinson B&D
Spritzenfilter Rotilabo®, PVDF (0,22 µm)	P666.1	Carl Roth GmbH
Stripetten 10 ml	4488	Corning
Stripetten 2 ml	4486	Corning
Stripetten 25 ml	4489	Corning
Stripetten 5 ml	4487	Corning
Stripetten 50 ml	4490	Corning
Wägeschalen	1878.2	Carl Roth GmbH
Zellkultur 12-Lochplatten	3513	Costar
Zellkultur 6-Lochplatten	3516	Costar

Tab. 2.3: Glaswaren und Plastikmaterialien

### Präparierbesteck

Artikel	Bestellnummer	Bezugsquelle
Abdeckglas-Pinzette, abgewinkelt	11073-10	FST
Irisschere, gerade, spitz	14058-11	FST
Irisschere, gerade, stumpf+spitz	14028-10	FST
Nadelhalter	12565-14	FST
Pinzette, fein, gebogen	91117-10	FST
Pinzette, fein, gerade	91113-10	FST
Pinzette, gezahnt, gerade	11002-16	FST

Tab. 2.4: Präparierbesteck

## 2.3.2 Kit-Systeme

Kit-System	Bestellnummer	Bezugsquelle
High pure PCR Template Preparation Kit	11 796 828 001	Roche Diagnostics GmbH
iQ™ SYBR® Green	170-8882	BioRad
iScript™ cDNA Synthesis Kit	170-8891	BioRad
KAPA mouse Genotyping Hot Start Kit	07-KK 7352-02	Peqlab
Mouse Adiponectin ELISA Kit	EZMADP-60K	EMD Millipore Corporation, USA
Mouse IL-6 ELISA Kit	EZMIL6	EMD Millipore Corporation, USA
Mouse Leptin ELISA Kit	EZML-82K	EMD Millipore Corporation, USA
Mouse TNF alpha ELISA Kit	EZMTNFA	Millipore S.A.S.
Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA	10-1249-01	Mercodia, Schweden

Tab. 2.5: verwendete Kitsysteme

## 2.4 Methoden-spezifische Materialien und Puffer

Sofern für Versuche neben den aufgeführten Materialien und Geräten weitere, versuchsspezifische Arbeitsutensilien verwendet wurden, sind diese nachfolgend aufgeführt.

### 2.4.1 Genotypisierungen

#### DNA-Isolation und Vervielfältigung

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
10x Taq-Puffer	11435094001	Roche
dNTPs (Nukleotide)	K039.1	Carl Roth
Ethanol (100%)	32205	Sigma-Aldrich
High Pure PCR Preparation Kit	11796828001	Roche
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Taq DNA-Polymerase	11435094001	Roche

Tab. 2.6: DNA-Isolation und Polymerase Kettenreaktion

#### Oligonukleotide

Target		Primersequenz von 5' → 3'	Fragmentgrößen
Adiponectin	F	TGGTGATCTGAAGACACTACA	600 bp
	R	TGCTGTTGGATGGTCTTCACAG	
ROSA Tomato	F	CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT	250 bp + 330 bp
	R1	CGAGGCGGATCACAAGCAATA	
	R2	TCAATGGGCGGGGGTCGTT	
obese	F	TGTCCAAGATGGACCAGACTC	155 bp + 100 bp
	R	ACTGGTCTGAGGCAGGGAGCA	
BK	F1	CCAGCCACAGTGTGTTGTTGG	132 bp + 466 bp + 577 bp
	F2	AAGGGCCATTTTGAAGACGTC	
	R	CCAGCCACAGTGTGTTGTTGG	

Tab. 2.7: Oligonukleotide für Genotypisierung

Sämtliche Oligonukleotide wurden entsprechend den Angaben des Herstellers in autoklaviertem MilliQ-Wasser gelöst und auf eine Stammlösungs-Konzentration von 100 µM eingestellt. Die verwendete Arbeitskonzentration der Oligonukleotide betrug 20 µM.

## Agarose-Gele und Elektrophorese

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Agarose	840004	Biozym Scientific
Borsäure	6943.3	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
DNA-Marker (2-Log DNA-Ladder)	32000-S	New England Biolabs
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	8043.2	Carl Roth
Ethidiumbromid	E1510	Sigma-Aldrich
Ficoll 400	CN90.3	Carl Roth
Tris	5429.3	Carl Roth
Xylencyanol	X4126	Sigma-Aldrich

### 0,5 M EDTA pH 8,0

EDTA x 2H <sub>2</sub> O	108 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 8,0 einstellen	

### 10x TBE-Puffer

Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	40 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
1x TBE: 1:10 verdünnen	

Agarosegel	2%	3,5%
Agarose	2 g	3,5 g
1x TBE-Puffer	100 ml	100 ml

### 6x Gel-Ladepuffer (6x Dye)

Ficoll	9 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	12 ml
10x TBE-Puffer	30 ml
Bromphenolblau (55 mg/ml)	1,35 ml
Xylencyanol (50 mg/ml)	1,5 ml

### DNA-Längenstandard

6x Dye	20 µl
2-Log DNA-Ladder	10 µl
dH <sub>2</sub> O	90 µl

Tab. 2.8: Agarose-Gele und Gelelektrophorese

## 2.4.2 Radiotelemetrische Messungen

### Versuchsspezifische Reagenzien und Materialien

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
1 ml Insulin Spritze BD Plastipak	300013	BD
Bepanthen-Augensalbe	PZN 01578681	Roche
Druckkatheter zur Blutdruckmessung	TA11ETA-F10	DataScience Int.
Einweg-Skalpelle	12072800	FeatherSafety Razor
Isofluran	220/96	Aventis
Isoprenalin	I.768	Sigma-Aldrich
Isotonische Kochsalzlösung, NaCl 0,9 %	B101153	Fresenius Kabi
Leukosilk 1,25 cm x 5 m	00626219	BSN Medical

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Octenisept	PZN 7463832	Schülke
Perma-Hand Seide 5.0	K880H	Ethicon
Pinzetten	diverse	FST
Präzisionswischtücher	AA64.1	Kimberly-Clark
Rotlichtlampe	616.00	Beurer
Scheren	diverse	FST
Telemetrie-Transmitter	ETA-F10	DataScience Int.
Wattestäbchen	diverse	diverse

Tab. 2.9: Material, Substanzen und Lösungen zur radiotelemetrische Messung

## 2.4.3 Intraperitonealer Glucose-Toleranz-Test

### Versuchsspezifische Reagenzien und Materialien

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
1ml Insulin Spritze BD Plastipak	300013	BD
Aprotinin	A1153	Sigma Aldrich
Blutzuckermessgerät, GlucoCheck	814773	TESTAmed
Blutzuckermessstreifen, GlucoCheck	9670073	TESTAmed
Bovines Serum-Albumin (BSA)	A7906	Sigma Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	C1016	Sigma Aldrich
Glucosteril 20%		Fresenius Kabi
HEPES	H4034	Sigma Aldrich
Isotonische Kochsalzlösung, NaCl 0,9 %	B101135	Fresenius
Kanüle 26G BD Microlance 0,45x10 mm	300300	BD
KCl	P5405	Sigma Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3904.2	Carl Roth
MgSO <sub>4</sub>	M7506	Sigma Aldrich
Microvette CB 300 LH	16.443	Sarstedt
NaCl	S7653	Sigma Aldrich
NaHCO <sub>3</sub>		Carl Roth
50ml Falcon Tube (an der Spitze aufgeschnitten, mit Alufolie umwickelt)		

#### Aprotinin-Lösung 15 µM

Aprotinin	1,1 mg
NaCl-Lösung 0,9%	11,26 ml

#### KREBS-Puffer (Glucosefrei)

		Endkonz.
BSA	500,0 mg	0,5 mg/ml
CaCl <sub>2</sub>	277,5 mg	2,5 mM
KCl	350,4 mg	4,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1 mg	1,0 mM
MgSO <sub>4</sub>	144,4 mg	1,2 mM
NaCl	7,0128 g	120 mM
NaHCO <sub>3</sub>	1,6802 g	20 mM
HEPES	2,3831 g	10 mM
MilliQ-Wasser	1000 ml	0,5 mg/ml
pH mit 1N NaOH auf 7,4 einstellen.		
Puffer nach der Herstellung steril-filtrieren!		

Tab. 2.10: verschiedene Lösungen, Reagenzien und Materialien für i.p. GTT

## 2.4.4 Soxhlet-Fettextraktion

### Versuchsspezifische Reagenzien und Materialien

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Heizpilz	G2R	Heraeus Wittmann
Soxhlet-Extraktor	NS 45/NS 29-32	Schott-Duran
Rundkolben 250 ml	NS29-32	Schott-Duran
Liebig-Rückflusskühler 40 cm	NS 45-40	Schott-Duran
Extraktionshülsen	MN 645	Macherey-Nagel
Standmixer, Metall	5593	Waring
Chloroform	3313.2	Carl Roth
Methanol	179957	Sigma Aldrich

Methanol-Chloroform-Gemisch	
Methanol	120 ml
Chloroform	60 ml

Tab. 2.11: verschiedene Lösungen, Reagenzien und Materialien für Soxhlet-Fettextraktion

## 2.4.5 Immunhistochemie

### Versuchsspezifische Substanzen und Materialien

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Aceton	9372.4	Carl Roth
Aluminiumfolie	2596.1	Carl Roth
Ammoniak (30-33%)	P093.2	Carl Roth
Deckgläser 20x60 High Precision	LH26.1	Carl Roth
DePeX Eindeckmedium	HX069485	VWR
Einbettmedium NEG50	6502	Thermo Scientific
Eosin G (0,5%)	X883.1	Carl Roth
Eselnormalserum (NDS)	017-000-121	Dianova
Essigsäure (100%)	3738.5	Carl Roth
Ethanol (100%)	32205	Sigma-Aldrich
Fettstift (Hydrophobic Barrier Pen)	H-4000	Vector Laboratories
Hämatoxylin nach Harris	X903.2	Carl Roth
Hoechst	33258	Sigma-Aldrich
Klingen (Kryotom)	MX35	Thermo Scientific
Objektträger Superfrost	J1800AMNZ	Menzel
Paraformaldehyd (PFA)	0335.2	Carl Roth
PBS	14190094	life technologies
PermaFluor	TA-030-FM	Thermo Scientific
Peroxidase Substrate Kit DAB	SK4100	Vector Lab. Inc.
Sucrose	4621.2	Carl Roth
Toluol	7115.1	Carl Roth
Triton X-100	3051.2	Carl Roth
Vectastain Elite Standard Kit	PK 6100	Vector Lab. Inc.
Wasserstoffperoxid 30%	8070.2	Carl Roth
Ziegennormalserum (NGS)	S1000	Vector

Tab. 2.12: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, Immunhistochemie

## Vorbereiten und Fixieren der Gewebeschnitte

<b>Paraformaldehyd-Lösung 4 %</b>			
Paraformaldehyd (PFA)			4 g
PBS			96 ml

<b>Sucrose-Lösungen</b>	<b>5 %</b>	<b>10 %</b>	<b>20 %</b>
Sucrose	5 g	10 g	20 g
PBS	95 ml	90 ml	80 ml

Tab. 2.13: Fixieren von Gewebeschnitten

## Permeabilisierung der Zellen

<b>Triton X-100-Lösung 0,3 %</b>	
Triton X-100	1,5 ml
PBS	500 ml

Tab. 2.14: Permeabilisierung von Zellen

## Inhibierung der endogenen Peroxidase

<b>Quenching-Lösung</b>	<b>Endkonz</b>	
Wasserstoffperoxid 30%	200 µl	3 %
Methanol	400 µl	20 %
PBS	1,4 ml	

Tab. 2.15: Blockade der endogenen Peroxidase

## Blockieren unspezifischer Bindestellen

<b>NDS-Lösungen</b>	<b>1,5 %</b>	<b>10 %</b>
NDS	15 µl	100 µl
PBS	985 µl	900 µl

<b>NGS-Lösungen</b>	<b>1,5 %</b>	<b>5 %</b>
NGS	15 µl	50 µl
PBS	985 µl	950 µl

Tab. 2.16: Blockade unspezifischer Bindestellen

**HE-Färbung**

<b>Ethanol 80 %</b>	
Ethanol 100 %	80 ml
MilliQ-Wasser	20 ml
<b>Ammoniak-Lösung 0,1 %</b>	
Ammoniak-Lösung 32 %	0,16 ml
MilliQ-Wasser	49,84 ml
<b>Saure Eosin-G-Lösung 0,25 %</b>	
Eosin-G-Lösung 0,5 %	25 ml
Essigsäure	2 Tropfen
MilliQ-Wasser	25 ml

Tab. 2.17: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, HE-Färbung

**Immunfluoreszenz-Färbung**

<b>Primär-Antikörper</b>	
	1:1000
1,5% NGS/PBS	999 µl
Anti BK (RoCl)	1 µl
<b>Sekundär-Antikörper</b>	
	1:500
1,5% NGS/PBS	998 µl
RoCl α-BK	2 µl
<b>Permafluor/Hoechst® 0,1 %</b>	
Permafluor®	5 ml
Hoechst® 1 mg/ml	5 µl

Tab. 2.18: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, Immunfluoreszenzfärbung

**DAB-Färbung**

<b>ABC stock solution (BK)</b>		
PBS	5 ml	
Reagenz A	1 Tropfen	1:100
Reagenz B	1 Tropfen	1:100
<b>ABC working solution (BK)</b>		
PBS	4 ml	
ABC stock	1 ml	1:500
<b>ABC working solution (HSL, Ucp1)</b>		
PBS	5 ml	
Reagenz A	1 Tropfen	1:100
Reagenz B	1 Tropfen	1:100
Lösung muss 30 min im Dunkeln vorinkubieren		

DAB-Substrat	
Milli-Q	5 ml
Buffer stock	2 Tropfen
DAB stock	2 Tropfen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> solution	1 Tropfen

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-BK	Kaninchen	1:5000	Eigener Arbeitskreis
anti-HSL	Kaninchen	1:400	Cell Signalling
anti-Ucp1	Ziege	1:400	SantaCruz

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-Kaninchen, biotinyll.	Ziege	1:2000 (BK) 1:5000 (HSL)	Vector Laboratories Inc.
anti-Ziege, biotinyll.	Esel	1:1000	Vector Laboratories Inc.

Tab. 2.19: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, DAB-Färbung

## 2.4.6 mRNA-Analytik mittels qRT-PCR

### Versuchsspezifische Substanzen und Materialien

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
10x Taq-Puffer	11435094001	Roche
96-Lochplatte (Low Multiwell)	ML-9601	BioRad
Chloroform	372978	Sigma-Aldrich
DEPC-H <sub>2</sub> O	T143	Carl Roth
DNAse I	04716728001	Roche
Ethanol (100%)	32205	Sigma-Aldrich
Folie zum Verschließen der Platten (Microseal B)	MSB-1001	Bio-Rad
iScript cDNA Synthesis-Kit	170-8891	BioRad
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Küvetten zur RNA-Konzentrationsbestimmung	613101	Greiner Bio-One
peqGold RNAPure zur Aufreinigung	30-1010	Peqlab
Oligonukleotide	variabel	Eurofins
SYBR Green Supermix	170-8882	BioRad

Tab. 2.20: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, mRNA-Analytik

### Oligonukleotide

		Primer	Fragmentgröße
ADD1	F	GGCACTGAAGCAAAGCTGAA	117 bp
	R	TGCACTTCGTAGGGTCAGGT	
AdiNec	F	GGAGATGCAGGTCTTCTTGG	113 bp
	R	TCTCCAGGCTCTCCTTTCT	
BK	F	GACGCCTCTTCATGGTCTTC	109 bp
	R	TAGGAGCCCCCGTATTTCTT	
cGKI	F	CGTTGCAGGGGGAGGATGTGAGA	109 bp
	R	TCGTCCAGTCCCAATCAAATGCT	
FAS	F	CTGAAGCCGAACACCTCTGT	98 bp
	R	CGACAATATCCACTCCCTGAA	
IL-6	F	CTTCAACCAAGAGGTAAG	83 bp
	R	CCAGCTTATCTGTTAGGAGAG	
Leptin	F	TGACACCAAACCCTCATCAAG	114 bp

## Material

		Primer	Fragmentgröße
PGC1 $\alpha$	R	TGAAGCCCAGGAATGAAGTC	124 bp
	F	CTCTGGAAGTGCAGGCCTA	
PPAR $\gamma$	R	CTTGGTTGGCGGTGGCAC	86 bp
	F	TGTGGGGATAAAGCATCAGGC	
Prdm16	R	CTTCAATCGGATGGTTCTTCG	77 bp
	F	CTTCTCCGAGATCCGAAACTTC	
Pref1	R	GATCTCAGGCCGTTTGTCCAT	111 bp
	F	GAAATAGACGTTTCGGGCTTG	
Ucp1	R	CTTCCAGAGAACCCAGGTG	88 bp
	F	GGCCTCTACGACTCAGTCCA	
$\beta$ -Aktin	R	CATTAAGCCGGCTGAGATCTTG	89 bp
	F	GACGGCCAGGTCATCACTAT	
	R	CCACAGGATTCCATACCCAAG	

**Tab. 2.21: Oligonukleotide für mRNA-Analyse**

Sämtliche Oligonukleotide wurden entsprechend den Angaben des Herstellers in autoklaviertem MilliQ-Wasser gelöst und auf eine Stammlösungs-Konzentration von 100  $\mu$ M eingestellt. Die verwendete Arbeitskonzentration der Oligonukleotide betrug 2  $\mu$ M.

## 2.4.7 Proteinanalytik mittels Western Blot

### Versuchsspezifische Materialien und Substanzen

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Acrylamidlösung (RotiphoreseGel)	3029.2	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.2	Carl Roth
Bromphenolblau	15375	Serva
Complete Mini-Tabs	11836170001	Roche
Coomassie-Brilliant-BlueG250	3862.2	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	6908.1	Carl Roth
Essigsäure (100%)	3738.5	Carl Roth
Filterpapiere (0,35 mm)	CL67.1	Carl Roth
Glycerin	3783.1	Carl Roth
Glycin	3908.3	Carl Roth
Hamilton-Spritze zur Probenapplikation	X035	Carl Roth
Isopropanol	6752.3	Carl Roth
Methanol	4627.5	Carl Roth
Milchpulver	T145.3	Carl Roth
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	K305	Carl roth
Natriumchlorid (NaCl)	3957.2	Carl Roth
Nonidet-P40	74385-1	Sigma-Aldrich
PeqGold®	27-2110	PeqLab
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	6367.2	Carl Roth
Phosphorsäure (85%)	9070	Carl Roth
Proteinmarker IV	27-2110	PeqLab
PVDF-Membran (Blot, Immobilion Millipore)	T831.1	Carl Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	8076.2	Carl Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	5136.2	Carl Roth
Sterilfilter	BT25	Sarstedt
Tetramethylethylenediamid (TEMED)	263.3	Carl Roth
Tris	5429.3	Carl Roth
Tween 20	9127.1	Carl Roth
UV-Küvetten	0030106300	Eppendorf

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
$\beta$ -Mercaptoethanol	4227.1	Carl Roth

Tab. 2.22: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, Proteinanalytik

### Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung

<b>200 mM PMSF</b>	
PMSF	348,4 mg
Ethanol (100%)	10 ml
→ Lagerung bei -20 °C	
<b>1 M Tris-HCl pH 8,3</b>	
Tris	121,14 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 8,3 einstellen	
<b>SDS-10%</b>	
SDS	10 g
MilliQ-Wasser	ad 100 ml
<b>SDS-Lysepuffer</b>	
Tris-HCl (1 M, pH 8,3)	210 $\mu$ l
SDS (10%)	670 $\mu$ l
$\beta$ -Mercaptoethanol	170 $\mu$ l
PMSF (200 mM)	20 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml
<b>4x Laemmli</b>	
SDS	2,25 g
Tris	1,2 g
Glycerin	20 ml
Bromphenolblau	6 mg
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
→ auf pH 6,7 einstellen	
<b>4x Laemmli mit DTT</b>	
4x Laemmli	1,5 ml
DTT (1 M)	75 $\mu$ l
<b>Bradford-Lösung</b>	
Coomassie-BlueG250	100 mg
Phosphorsäure (84,5%)	100 ml
Ethanol (100%)	50 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Tab. 2.23: Proteinanalytik und Konzentrationsbestimmung

### SDS-Gelelektrophorese

<b>0,6 M Tris-HCl pH 6,8</b>	
Tris	72,68 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 6,8 einstellen	

<b>1,8 M Tris-HCl pH 8,8</b>	
Tris	218,05 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 8,8 einstellen	

<b>Sammelgel 5 %</b>	
Acrylamid (Rotiphorese)	0,83 ml
Tris-HCl (0,6 M, pH 6,8)	0,5 ml
dH <sub>2</sub> O	3,6 ml
SDS (10%)	50 µl
TEMED	10 µl
APS (30%)	16,6 µl

<b>10x Elphor</b>	
Tris	3150 g
Glycin	720 g
SDS	50 g
dH <sub>2</sub> O	ad 5000 ml
→ auf pH 8,3 einstellen	

<b>1x Elphor</b>	
10x Elphor	100 ml
dH <sub>2</sub> O	900 ml

Tab. 2.24: SDS-Gelelektrophorese

## Western Blot

<b>Anodenpuffer I</b>	
Tris	36,3 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 10,4 einstellen	

<b>Anodenpuffer II</b>	
Tris	3,6 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 10,4 einstellen	

<b>Kathodenpuffer</b>	
Tris	3,0 g
6-Aminocaprinsäure	5,8 g
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
→ auf pH 7,6 einstellen	

<b>Blockierungslösung</b>	
Milchpulver	5 g
1x TBS-T	ad 100 ml

<b>Antikörper-Verdünnungslösung</b>	
1x TBS-T	95 ml
BSA	5 g
NaN <sub>3</sub> (10%)	500 µl

<b>10x TBS-T</b>	
Tris	24,2 g
NaCl	164,6 g
Tween 20	10 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 2000 ml
→ auf pH 8,0 einstellen	

<b>1x TBS-T</b>	
10x TBS-T	100 ml
dH <sub>2</sub> O	900 ml

Tab. 2.25: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, Western Blot

### Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller / Produktnummer	Verdünnung
anti Ucp1 (Ziege)	Santa Cruz / Sc-6528	1:1000
anti-GAPDH (Kaninchen)	Cell Signaling / #2118	1:1000
anti-Ziege Cy5 (Esel)	Abcam / ab6566	1:2500
anti-Kaninchen Cy5, ECL Plex (Ziege)	GE Healthcare / PA 45011	1:2500

Tab. 2.26: Antikörper für Western Blot

## 2.4.8 Primäre Präadipozytenkulturen

### Versuchsspezifische Substanzen und Materialien

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
8-Br-cGMP	B 004-50E	BioLog
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	C1016	Sigma Aldrich
Collagenase Typ I	C0130	Sigma Aldrich
Dexamethason	D4902	Sigma Aldrich
D-Glucose	G7021	Sigma Aldrich
DMEM-Ham's F12 (DMEM-F12)	FG4815	Biochrom AG
DMSO	D4540	Sigma Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	10270	Gibco
Filterhalter		Merck Millipore
Gewebefilter 20 µm	NY2002500	Merck Millipore
Gewebefilter 180 µm	NY8H02500	Merck Millipore
HEPES	H4034	Sigma Aldrich
Indomethacin	I7378	Sigma Aldrich
Insulin, human	C-52310	PromoCell
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	I5879	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	P5405	Sigma Aldrich
Kaliumhydroxid (KOH)	6751.1	Carl Roth
Natrium-Ascorbat	A4034	Sigma Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	S5886	Sigma Aldrich
Neubauer-Zählkammer, modifiziert; C-Chip	DHC-N01	DigitalBio
Paxillin	BML-KC-155	Enzo
PBS-Lösung	14190	Gibco

Material/Substanz/Lösung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	15140	Gibco
Rosiglitazon	R2408	Sigma Aldrich
Salzsäure 1N	diverse	Diverse
Scheren	diverse	FST
Sp-cAMPS	A003-10S	BioLog
Triiodthyronin (T3)	T6379	Sigma Aldrich

**Tab. 2.27: versuchsspezifische Substanzen und Materialien, Präadipozytenkulturen**

### Isolation von Präadipozyten

HEPES-Lösung 1,25x		Endkonz.
HEPES	29,8 g	0,1 M
NaCl	8,78 g	0,12 M
KCl	4,66 g	50 mM
D-Glucose	1,12 g	5 mM
BSA	18,8 g	1,5 %
CaCl <sub>2</sub>	0,132 g	1 mM
MilliQ Wasser	1 L	
NaOH	bis pH 7,3	
Steril Filtrieren und bei -20 °C lagern		

Collagenase-Stammlösung	
Collagenase Typ I	5000 units/ml
MilliQ Wasser	Nach Bedarf
Aliquots à 1 ml bei -20 °C lagern	

Collagenase-Verdaulösung	
Collagenase Stammlösung	1 ml
HEPES-Lösung 1,25x	4 ml

**Tab. 2.28: Isolation von Präadipozyten**

### Stammlösungen

0,5 N KOH	
KOH	0,56 g
Milli-Q Wasser	20 ml

0,02 M HCl	
HCl 1N	1 ml
Milli-Q Wasser	49 ml

Insulin (1,7 mM)	
Insulin	50 mg
0,02 M HCl	5,13 ml
Bei -20 °C lagern	

<b>Insulin (17 <math>\mu</math>M)</b>	
Insulin 1,7 mM	10 $\mu$ l
0,02 M HCl	990 $\mu$ l
Am Versuchstag frisch herstellen	

<b>Dexamethason (10 mM)</b>	
Dexamethason	3,93 mg
Ethanol p.a. (unvergällt)	1 ml
Bei -20 °C lagern	

<b>Dexamethason (100 <math>\mu</math>M)</b>	
Dexamethason 10 mM	10 $\mu$ l
Ethanol p.a. (unvergällt)	990 $\mu$ l
Am Versuchstag frisch herstellen	

<b>IBMX (25 mM)</b>	
IBMX	5,56 mg
0,5N KOH	1 ml
Am Versuchstag frisch herstellen	

<b>Indomethacin (6 mM)</b>	
Indomethacin	2,15mg
DMSO	1 ml

<b>Rosiglitazon (25 mM)</b>	
Rosiglitazon	8,94 mg
DMSO	1 ml
Lagerung bei -20 °C	

<b>Rosiglitazon (250 <math>\mu</math>M)</b>	
Rosiglitazon 25 mM	10 $\mu$ l
DMEM-F12	990 $\mu$ l
Am Versuchstag frisch herstellen	

<b>T3 (5 mM)</b>	
T3	3,36 mg
NaOH (1 M)	1 ml

<b>T3 (50 <math>\mu</math>M)</b>	
T3-Lösung (5 mM)	10 $\mu$ l
DMEM-F12	990 $\mu$ l
Kann bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert werden	

<b>T3 (500 µM)</b>	
T3-Lösung (50 µM)	100 µl
DMEM-F12	900 µl
am Versuchstag frisch herstellen	

Tab. 2.29: Stammlösungen für Zellkulturmedien

## Zellkultur-Medien

<b>DMEM-F12 Medium</b>	
DMEM-F12	500 ml
PenStrep	5 ml

<b>DMEM-F12 mit FCS</b>	<b>5 %</b>	<b>10 %</b>
FCS	25 ml	50 ml
DMEM-F12	475 ml	450 ml

<b>eWAT-Induktionsmedium</b>		<b>Endkonz.</b>
Insulin 17 µM	1,0 ml	170 nM
Dexamethason 100 µM	0,5 ml	1 µM
IBMX 25 mM	2,0 ml	500 µM
Indomethacin 6 mM	0,5 ml	30 µM
DMEM-F12 5% FBS	96 ml	

<b>iWAT-Induktionsmedium</b>		<b>Endkonz.</b>
Insulin 17 µM	1,0 ml	170 nM
Dexamethason 100 µM	0,5 ml	1 µM
IBMX 25 mM	2,0 ml	500 µM
Indomethacin 6 mM	0,5 ml	30 µM
T3 50 nM	2,0 ml	1 nM
Rosiglitazon 250 µM	1,0 ml	2,5 µM
DMEM-F12 5% FCS	93 ml	

<b>Insulin containing medium</b>		<b>Endkonz.</b>
Insulin 17 µM	1 ml	170 nM
DMEM-F12 mit 10% FCS	99 ml	

<b>BAT-MSC-CM</b>		<b>Endkonz.</b>
Insulin 1,7 µM	235 µl	4 nM
T3 500 nM	800 µl	4 nM
Natrium-Ascorbat	250 µl	25 µg/ml
DMEM-F12 10% FBS	98,72 ml	

<b>BAT-MSC-CM (mit Compunds)</b>		<b>Endkonz.</b>
8Br-cGMP 100 mM	1 µl	100 µM
Sp-cAMPS 100 mM	1 µl	100 µM
Paxilline 4 mM	1 µl	4 µM
BAT-MSC-CM	1 ml	

Tab. 2.30: Zellkulturmedien

## Ölrot-Färbung

### versuchsspezifische Lösungen

<b>Ölrot Stammlösung</b>	
Ölrot	0,25 g
Isopropanol 99%	ad 50ml
<b>Ölrot Arbeitslösung (60%)</b>	
Ölrot Stammlösung	30ml
Milli-Q-Wasser	20ml
Die Arbeitslösung muss täglich frisch hergestellt und über einen Papierfilter filtriert werden	

Tab. 2.31: Ölrot-Lösungen

## 2.4.9 xCELLigence

### Versuchsspezifische Substanzen und Materialien

<b>Material/Substanz/Lösung</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
DMEM-Ham's F12 (DMEM-F12)	FG4815	Biochrom AG
DMSO	D4540	Sigma Aldrich
E-Plate 96 wells	05232376001	ACEA Biosciences Inc.
Fetales Kälberserum (FCS)	10270	Gibco
Paxillin	BML-KC-155	Enzo
RCTA-Analyzer	05228972001	ACEA Biosciences Inc.

Tab. 2.32: Versuchsspezifische Substanzen und Materialien, xCELLigence

## 3 Methoden

### 3.1 Haltung der Tiere

Alle verwendeten Tiere wurden in der Tierhaltung des Pharmazeutischen Instituts, Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie gemäß geltender tierschutzrechtlicher Vorgaben gehalten und gezüchtet.

Die Tiere wurden hierfür in S1-Räumen unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen bei einer Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 5\%$  Luftfeuchtigkeit und  $22 \pm 1,5$  °C gehalten.

Die Mäuse wurden in Gruppen von 2-3 Tieren in Makrolon Typ II Käfigen in einer SPF-Haltung (spezifiziert Pathogen-freie Haltung) mit 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus und unbegrenztem freiem Zugang zu Wasser und standardisiertem Futter untergebracht und hatten grobes Holzstreu und Nistmaterial zur Verfügung.

Tiere, welche sich in einem Versuch befanden wurden in speziellen Luftstromschränken (Uniprotect) unter denselben Bedingungen gehalten.

Mäuse, welche sich in Fütterungsversuchen befanden, wurden für diesen Zeitraum versuchsbedingt einzeln gehalten. Außerdem wurden alle im Versuch befindlichen Tiere mindestens 2x wöchentlich auf Verhaltens- und Gesundheitsveränderungen hin untersucht.

Alle durchgeführten Tierversuche wurden unter Beachtung der nationalen Tierschutzbestimmungen durchgeführt und waren von der zuständigen Tierschutzbehörde, dem Regierungspräsidium Tübingen, genehmigt.

### 3.2 Generierung der konstitutiven und konditionalen BK-KO Mausmodelle, sowie transgener Mauslinien

Die Generierung der Versuchstiere erfolgte als Dauerverpaarung, bestehend aus einem männlichen Tier und 1-2 Weibchen, in Makrolon Typ III Käfigen. Zu Beginn der Verpaarung waren die Männchen mindestens 10 Wochen alt, die weiblichen Tiere mindestens 8 Wochen. Die entstandenen Würfe würden in einem Alter von 3-5 Wochen mit einer Ohrmarkierung versehen und genotypisiert (s. Kapitel 0). Spätestens in einem Alter von 5 Wochen würden die Würfe abgesetzt und geschlechter-spezifisch getrennt.

Bei allen Verpaarungen wurde darauf geachtet, dass sowohl Wildtypkontrollen als auch transgene- bzw. Knockout-Tiere in einem Wurf generiert werden konnten, um für die Versuchskohorten optimale Vergleichbarkeiten zu schaffen.

Die weitere Haltung erfolgte wie bereits in Kapitel 3.13.1 beschrieben.

Sofern nicht explizit angegeben, wurden für alle Versuche männliche Tiere im entsprechenden Alter verwendet. Beginn für die Fütterungsversuche war ein Alter von 10 Wochen. Die ggf. notwendigen Tamoxifen-Injektionen (s. Kapitel 3.2.3) erfolgten im Alter von 8 Wochen.

#### 3.2.1 BK

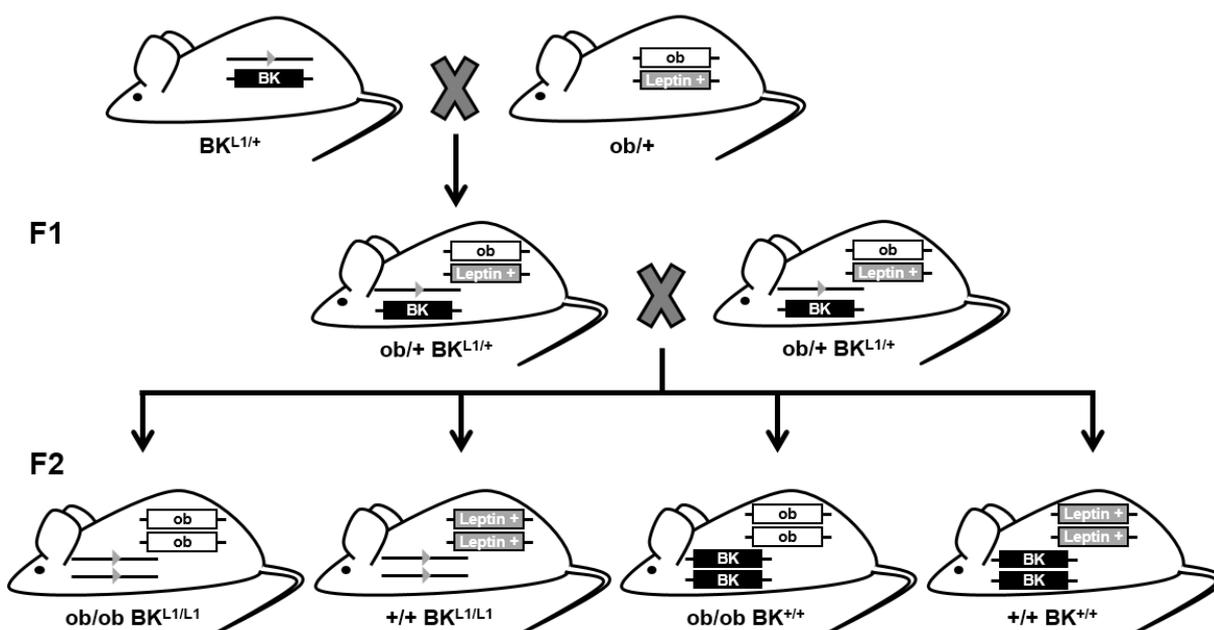
Zur Generierung einer globalen, konstitutiven BK-Kanal-defizienten Mauslinie (Genotyp: BK<sup>L1/L1</sup>) wurde das Exon 7 des KCNMA1-Gens wie zuvor bereits beschrieben (Sausbier et al., 2004) mittels homologer Rekombination deletiert. Dieses Exon codiert für die porenbildende Region der  $\alpha$ -Untereinheit sowie einen Abschnitt des S6-Segmentes des BK-Kanals. Durch

die Deletion der entsprechenden Gensequenz kommt es im Folgenden zu einem vollständigen Verlust der Kanalfunktion.

Zur Generierung der homozygoten BK-Wildtyp (Genotyp: BK<sup>+/+</sup>) und BK-Knockout Tiere wurden heterozygote BK-Tiere (Genotyp: BK<sup>L1/+</sup>) mit C57BL6N Hintergrund untereinander verpaart. In der F1-Generation (*Founder 1*) entstanden aus diesen Verpaarungen sowohl BK<sup>+/+</sup> Tiere (25%) als auch Wurfgeschwister mit globaler Deletion des BK Kanals (25%) sowie ca. 50% heterozygote BK-Tiere. Für sämtliche Fütterungs-Versuche wurden ausschließlich männliche Tiere aus diesen Verpaarungen verwendet.

### 3.2.2 ob/ob X BK-Doppelmutanten

Um zu untersuchen, ob die genetische Deletion des BK Kanals auch etablierte obese-Mausmodelle vor übermäßiger Gewichtszunahme und Fettassoziation schützen kann wurden doppel-mutante Tiere generiert, welche sowohl BK-Kanal-defizient sind als auch eine Mutation im Leptin Gen aufweisen. Zur Generierung dieser ob/ob X BK Tiere waren mehrere Verpaarungsschritte nötig (s. Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Verpaarungsschema ob/ob X BK Doppelmutanten**

BK-Kanal-Wildtyp-Gen (BK, +), ► (loxP-Erkennungssequenz, L1) entspricht dem BK-defizienten Allel, ob (inaktives Leptin-Gen mit Punktmutation), Lep<sup>+</sup> (Leptin-Wildtyp-Gen); Weitere Informationen im Text.

#### ob/ob Mäuse

B6.V-Lep ob/J Mäuse auf C57BL6/J Hintergrund weisen eine autosomal rezessive Punktmutation im Chromosom 6 des Leptin-Gen auf, wodurch die Tiere nicht mehr in der Lage sind, funktionales Leptin-protein zu bilden. Mäuse mit homozygoter Mutation auf beiden Allelen (ob/ob) zeichnen sich durch eine, ab einem Alter von 4 Wochen erkennbare, massiv gesteigerte Gewichtszunahme gegenüber ihren schlankeren heterozygoten (ob/+) oder homozygoten Wurfgeschwistern (Lep<sup>+/+</sup>) aus. Im Fettgewebe geht dies sowohl mit einer Hyperplasie, als auch einer Hypertrophie der Fettzellen einher und auch die Adiponektin-

Spiegel sind hier klar erhöht. Teilweise kann dieser schwer adipöse Phänotyp durch die aus dem Leptinmangel resultierende massive Hyperphagie zurückgeführt werden, da durch den Mangel an Leptin zum einen anorexigene Signalwege über POMC (Proopiomelanocortin) und CART (Cocain- und Amphetamin-reguliertes Transkript) nicht aktiviert werden können und darüber hinaus orexigene Signalkaskaden über AgRP (Agouti-related Protein) und NPY (Neuropeptid Y) auf Grund des Leptinmangels und der daraus resultierend fehlenden negativen Rückkopplung nicht unterdrückt werden. Des Weiteren zeigen diese Tiere Hyperglykämie, Glucose-intoleranz und erhöhte Plasma-Insulinspiegel, was in einem Diabetes-ähnlichen Phänotyp zusammengefasst werden kann. Auch Wundheilung, Fertilität und Körpertemperatur der homozygot mutierten Tiere sind verändert.

Männliche 6 Wochen alte B6.V-Lep ob/J Tiere wurden über Charles River (Italien) bezogen und ab einem Alter von 12 Wochen verpaart. Neben der Verpaarung mit BK<sup>L1/+</sup> Tieren erfolgte auch eine Verpaarung mit weiblichen C57BL6/J Mäusen um die *Founder-Generation* weiter erhalten zu können.

### **ob/+ X BK<sup>L1/+</sup> Mäuse (F1)**

Da homozygote ob/ob Tiere weitgehend infertil sind wurden zur Generierung der gewünschten BK- und Leptin-Doppelmutanten heterozygote ob/+ Tiere mit C57BL6/J verwendet. Diese wurden in einem ersten Schritt mit heterozygoten BK<sup>L1/+</sup> Mäusen auf C57BL6/N Hintergrund verpaart. Dabei entstanden in der F1-Generation unter anderem Tiere auf gemischtem C57BL6/J und C57BL6/N Hintergrund, welche sowohl heterozygot für die BK-Kanal-Deletion als auch hinsichtlich der Leptin-Gen-Mutation waren (ob/+ X BK<sup>L1/+</sup>).

### **ob/ob X BK<sup>L1/L1</sup> Mäuse und Kontrollen (F2)**

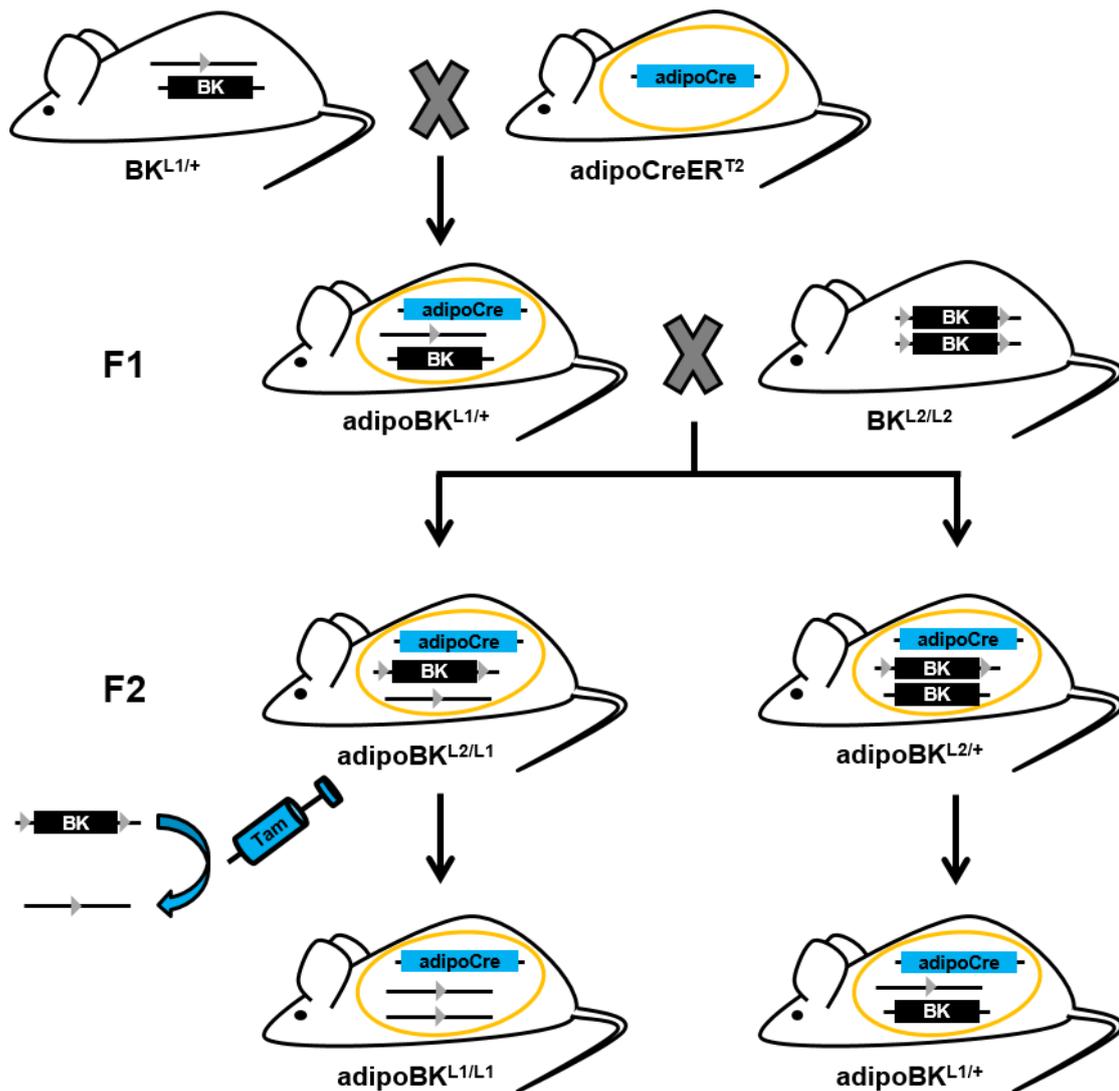
Zur Generierung der eigentlichen Versuchskohorten, welche homozygote Leptin- und BK-Mutanten sowie deren homozygote WT-Kontrollen einschloss, wurden die Tiere der F1-Generation wiederum untereinander verpaart. Aus diesen Vereinigungen entstanden unter anderem BK<sup>+/+</sup> sowie BK<sup>L1/L1</sup> Tiere, welche entweder homozygote Mutationen im Leptin Gen aufwiesen (ob/ob) oder Wildtypen hinsichtlich des Leptin-Gens (Lep<sup>+/+</sup>) waren.

Wie bei allen Kreuzungen wurden auch hier direkte Verpaarungen von Geschwistertieren untereinander vermieden.

## **3.2.3 adipoBK**

Neben dem konstitutiven BK-Knockout-Modell wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere, Fettzell-spezifische BK-Knockout Mauslinie (adipoBK) entwickelt.

Dieses Modell soll eine differenziertere Aussage über die Aufgabe und die Funktionen des BK Kanals in Adipozyten hinsichtlich Körpergewichtsentwicklung und Adipogenese ermöglichen. Es handelt sich bei diesem Mausmodell um einen konditionalen Knockout, der sowohl induzierbar als auch gewebspezifisch für Adipozyten ist. Die Generierung des adipoBK Modells beruht auf der Verpaarung von adipoCreERT2<sup>tg/+</sup> Mäusen mit der BK Mauslinie (s. Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Verpaarungsschema adipoBK-Tiere**

BK-Kanal-Wildtyp-Gen ( $BK\alpha$ , +),  $\blacktriangleright$  (loxP-Erkennungssequenz, L1) entspricht dem BK-defizienten Allel, Expression der Cre-Rekombinase in Fettzellen unter Kontrolle des Adiponektin-Promotors ( $adipoCreERT2^{tg/+}$ , kurz:  $adipoCre$ ; in gelbem Kreis), Genotyp in Fettzellen (gelbes Oval), von loxP-Erkennungssequenzen umgebenes BK-Gen (L2); Weitere Informationen im Text.

Zur Generierung der  $adipoBK$  Versuchstiere wurden zunächst transgene Mäuse mit C57BL6/N-Hintergrund verwendet, die zusätzlich zu ihrer physiologischen Protein- und Enzymausstattung eine Tamoxifen-aktivierbare Cre-Rekombinase ( $CreERT2$ ) unter Kontrolle des Adiponektin-Promotors exprimieren ( $adipoCreERT2^{tg/+}$ ) (Sassmann et al., 2010). Tamoxifen, ein selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator, aktiviert die Rekombinase-Aktivität des hier verwendeten Cre-Fusionsproteins über eine mutierte Liganden-Bindungsdomäne des humanen Östrogen-Rezeptors (ER) (Leone et al., 2003). Die Gewebsspezifität dieses Mausmodells wird über die Expressionskontrolle der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Adiponektin-Promotors realisiert. Adiponektin wird physiologisch fast ausschließlich in Fettgeweben, insbesondere in weißen Fettzellen, exprimiert.

### **adipoBK<sup>L1/+</sup> Mäuse (F1)**

Zur Generierung der Adipozyten-spezifischen BK-KO Tiere erfolgte im ersten Schritt eine Verpaarung der adipoCreERT2<sup>tg/+</sup> Tiere mit BK<sup>L1/+</sup> Mäusen auf C57BL6/N Hintergrund. Aus diesen Verpaarungen gingen in der F1-Generation doppel-mutante Mäuse hervor, welche sowohl die Cre-Rekombinase in Fettzellen exprimieren (adipoCreERT2<sup>tg/+</sup>), als auch heterozygot für den BK Kanal (BK<sup>L1/+</sup>) sind.

### **adipoBK<sup>L1/L2</sup> und adipoBK<sup>+L2</sup> Mäuse (F2)**

Die in der F1-Generation entstandenen Tiere wurden in einem nächsten Schritt wiederum mit geflochten BK<sup>L2/L2</sup> Tieren mit gemischtem Hintergrund (mixed; SV129, C57BL6/N) verpaart. Bei den BK<sup>L2/L2</sup> Mäusen handelt es sich hinsichtlich der BK-Kanal Konstitution um Wildtyp Tiere. Allerdings wurden bei diesen Tieren sowohl vor, als auch hinter dem für Exon 7 codierenden Abschnitt der KCNMA1-Gensequenz über homologe Rekombination loxP-Sequenzen eingebracht, welche als Schnittstellen für die Cre-Rekombinase dienen. Aus dieser F2-Generation der Kreuzung entstanden im Folgenden die Versuchsmäuse mit den gewünschten Genotypen: adipoCreERT2<sup>tg/+</sup> X BK<sup>L1/L2</sup> (adipoBK<sup>L1/L2</sup>) sowie adipoCreERT2<sup>tg/+</sup> X BK<sup>+L2</sup> (adipoBK<sup>+L2</sup>). Zur Erhaltung der adipoCreERT2-Linie wurden diese regelmäßig mit C57BL6/N Tieren verpaart.

In den 8 Wochen alten Tieren der F2-Generation wurde durch intraperitoneale Injektion von 1 mg Tamoxifen pro Tag, gelöst in 50µl Miglyol, der geflochte Genabschnitt eliminiert. Dieses Injektionsprotokoll wurde an 5 aufeinander folgenden Tagen angewendet um eine nahezu vollständige Aktivierung der CreERT2-Rekombinase zu erzielen, was letztlich zur Konversion des loxP-flankierten L2 Allels in ein L1 Allel führte.

### **3.2.4 adipoBK X ROSA Tomato<sup>tom/+</sup>**

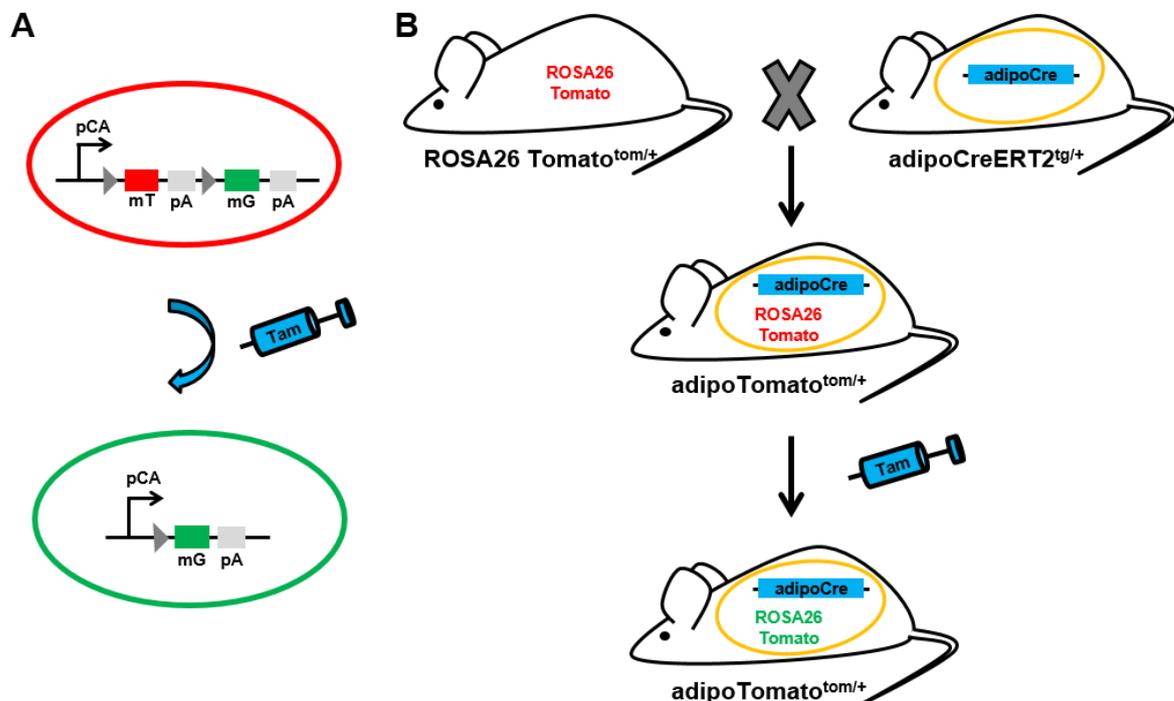
Um die Gewebespezifität sowie die Effizienz der CreERT2-Rekombinase zu überprüfen wurden adipoCre transgene Tiere (Genotyp: adipoCreERT2<sup>tg/+</sup>, kurz: adipoCre) mit ROSA Tomato Reporter-Mäusen (Genotyp: ROSA26 Tomato<sup>tom/+</sup>) verpaart.

ROSA Tomato Reporter-Mäuse tragen ein mittels homologer Rekombination in den ROSA Locus eingebrachtes Konstrukt, welches aus einem pCA-Promotor, sowie einer loxP flankierten Sequenz für membranständige rote Fluoreszenz (tdTomato) und einer Polyadenylierungs-Sequenz (pA) besteht, welche als Stopcodon dient. Daran schließt eine Sequenz an, welche für EGFP codiert, gefolgt von einer weiteren Polyadenylierungs-Sequenz als Stopcodon (Muzumdar et al., 2007).

Ohne Cre-Aktivität führt die pCA-Promotoraktivität somit zur Expression des roten Tomato-Fluoreszenzmarkers. Nach Cre-Rekombinase vermittelter Exzision des loxP-flankierten Tomato-Gens sowie der ersten pA-Sequenz kommt es zur Expression des grünen EGFP-Proteins und somit zu einer grünen Fluoreszenz in allen Geweben, in welchen die Cre-Rekombinase exprimiert wird.

Zur Generierung der doppelt-transgenen Tiere wurden adipoCre-ERT2<sup>tg/+</sup> Mäuse mit heterozygoten ROSA26 Tomato<sup>tom/+</sup> Tieren verpaart. Aus diesen Verbindungen gingen doppel-transgene Versuchstiere (Genotyp: adipoCreERT2<sup>tg/+</sup> X ROSA26 Tomato<sup>tom/+</sup>), sowie einfach-transgene Kontrolltiere (Genotyp: adipoCreERT2<sup>tg/+</sup> oder ROSA26 Tomato<sup>tom/+</sup>) hervor. In

einem Alter von 8 Wochen wurden die Tiere an 5 aufeinanderfolgenden Tagen mit 1 mg Tamoxifen in 50µl Miglyol injiziert um die Cre-Rekombinase zu aktivieren.



**Abb. 3.3: Verpaarungsschema adipoCreERT2<sup>tg/+</sup> X ROSA26 Tomato<sup>tom/+</sup>**

(A) Die Reportermaus (ROSA26 Tomato) trägt ein genetisches Konstrukt, das mittels homologer Rekombination in den ROSA26 Locus eingebracht wurde. Dieses besteht aus einem Promotor (pCA), einer Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase (graues Dreieck, loxP-Erkennungssequenz), einem Abschnitt für membranständige rote Fluoreszenz (mT), gefolgt von einer Polyadenylierungssequenz (pA) und einer weiteren loxP-Erkennungssequenz, auf welche die codierende Region für ein membranständiges grünes Fluoreszenzprotein (mG), sowie eine weitere Polyadenylierungssequenz folgen. Gewebe, welche das Reporterergen beinhalten fluoreszieren rot, nach Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen (Tam) erfolgt die Exzision des geflochten Genabschnittes und die Expression des grünen Fluoreszenzproteins. (B) Durch Verpaarung der ROSA26 Tomato Reporter-Tiere (Genotyp: ROSA26 Tomato<sup>tom/+</sup>) mit einer Adipozyten-spezifischen Cre-Maus (Genotyp: adipoCreERT2<sup>tg/+</sup>) erfolgt die Deletion des geflochten Genabschnittes ausschließlich in Adipozyten und es entsteht eine doppeltransgene Mauslinie (Genotyp: adipoCreERT2<sup>tg/+</sup> X ROSA26 Tomato<sup>tom/+</sup>).

Um die Cre-Spezifität und -Effizienz zu untersuchen wurden die Tiere im Alter von 10 Wochen wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben prozessiert. Die Gewebe durchliefen anschließend einen Sucrose-Gradienten und wurden letztlich in Gefriermedium eingebettet (s. Kapitel 3.5.2.1) und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die ROSA Tomato-Mäuse wurden über Charles River bezogen.

### 3.3 Genotypisierungen

Zur Identifikation der Jungtiere aus den beschriebenen Verpaarungen (s. Kapitel 3.2) wurden alle Mäuse in einem Alter von 3-5 Wochen mit Ohrclips markiert. Im Zuge dessen wurde bei den Tieren außerdem die Schwanzspitze biopsiert. Aus den gewonnenen Schwanzspitzenbiopsien wurde die DNA isoliert (s. Kapitel 3.3.1). Diese wurde mittels Polymeraser Kettenreaktion vervielfältigt (s. Kapitel 3.3.2) und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. Kapitel 0), um die Größe der entstandenen Amplifikationsprodukte zu analysieren.

#### 3.3.1 Extraktion von DNA aus Schwanzspitzenbiopsien

Zur Ermittlung des Genotypes wurde bei allen Jungtieren im Alter von 3-5 Wochen circa 1mm der Schwanzspitze biopsiert.

Die Extraktion der DNA erfolgte dann in mehreren Schritten mit Hilfe des *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, s. Kapitel 0). In einem ersten Schritt wurden den Biopsien 200 µl *Tissue Lysis Buffer* und 40 µl Proteinase K zugesetzt und das Gemisch für mindestens 5 Stunden, in der Regel jedoch über Nacht, unter kräftigem Schütteln (450-500 U/min) bei 55 °C inkubiert. Hierbei werden die Zellen mit Hilfe des Puffer-Proteinase-Gemisches lysiert und Proteine abgebaut. Des Weiteren inaktiviert die Proteinase K vorhandene DNasen und verhindert somit die Degradation der Schwanzspitzen-DNA. Nach der Inkubation wurden die Gewebelysate außerdem mit einer sterilen Pipettenspitze mechanisch zerkleinert. Nach anschließender Zugabe von 200 µl *Binding Buffer* und 100 µl Isopropanol wurde das Gemisch 5 min bei 13000x g zentrifugiert um Zellmembranfragmente und andere zelluläre Bestandteile zu sedimentieren. Die im Überstande befindliche DNA wurde auf Filterröhrchen überführt. Das im Bindepuffer enthaltene Guanidin ermöglichte bei der folgenden 1-minütigen Zentrifugation (8000x g), die Bindung von Nukleinsäuren an die im Filter vorliegenden Silica-Kügelchen. Bei den folgenden beiden Waschsritten mit jeweils 500 µl Waschpuffer wurden Verunreinigungen eluiert und verworfen. Hierfür wurde jeweils für 1 min bei 8000x g zentrifugiert. In einem letzten Schritt wurde die Silica-gebundene DNA mittels Zugabe von 200 µl *Elution Buffer* aus den Filtern herausgewaschen. Hierbei sorgt die hohe Tris-Konzentration in diesem Puffer für eine Destabilisierung der DNA-Bindung und ermöglicht deren Elution durch Zentrifugation (1 min, 8000 x g). Die so gewonnene DNA wurde entweder zur baldigen Weiterverarbeitung bei 4-8 °C oder zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.3.2 Vervielfältigung der DNA mittels Polymeraser Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine schnelle und verlässliche Methode zur selektiven Vervielfältigung gewünschter DNA-Fragmente *in-vitro* (Mullis et al 1986, Mullis et al. 1987). Sie setzt sich aus drei aufeinander folgenden Hauptschritten zusammen. Als erstes erfolgt die so genannte Denaturierung, bei welcher die DNA auf 94-96 °C erhitzt wird um Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen und die komplementären DNA-Stränge zu trennen. In einem zweiten Schritt erfolgt die als *Annealing* bezeichnete Hybridisierung der spezifischen Primer an die komplementären DNA-Sequenzen. Die hierfür nötige Temperatur ist in erster Linie von den Eigenschaften der Primer, vor allem

deren Schmelztemperatur, abhängig. In der Regel liegt die optimale Temperatur für den Hybridisierungs-Schritt bei 55-65 °C. Die Elongation beschreibt die Verlängerung der komplementären Stränge, ausgehend vom 3'-Ende der hybridisierten Primer. Die Temperatur dieses Schrittes hängt von der optimalen Arbeitstemperatur des Enzyms ab und liegt in der Regel zwischen 68-72 °C. Alle Schritte werden in mehreren Zyklen wiederholt um ausreichende Mengen an Amplifikationsprodukten zu erhalten.

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurde die wie unter 3.3.1 beschrieben, gewonnene DNA mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurde Primersequenzen verwendet, welche an direkt flankierende Bereiche der genetisch modifizierten Abschnitte der Maus-DNA binden konnten. Der sogenannte *Forward* Primer (F) wurde hierbei so gewählt, dass er an das 3'-Ende der jeweiligen Zielsequenz des kodierenden Stranges band, der *Reverse* Primer (R) hingegen bestand aus einer Oligonukleotidsequenz, welche am komplementären Strang anknüpfen konnte. Die optimale Temperatur für das *Annealing* lag bei 56 °C. Ausgehend von diesen gebundenen Primersequenzen erfolgte nun die Elongation des jeweils neuen komplementären Stranges in 5'-3'-Richtung durch die Taq-DNA-Polymerase. Die im PCR-Ansatz (s. Tab. 3.1) enthaltenen Desoxyribonukleotide (dNTPs) wurden hierbei als Bausteine für die Generierung neuer DNA-Stränge verwendet während die enthaltenen Magnesiumionen und der pH-Wert des Puffers sowie die gewählte Temperatur von 72 °C für eine optimale Aktivität der Taq-DNA-Polymerase eine wichtige Rolle spielten. Der beschriebene Zyklus aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Verlängerung wurde, jeweils noch weitere 35 Mal wiederholt um eine ausreichend hohe Menge an Amplifikationsprodukten zu generieren.

Die PCRs wurden alle Eppendorf-PCR-Reaktionsgefäßen, mit einem Fassungsvermögen von 500µl, mittels programmierbarem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler) durchgeführt.

Die Zusammensetzung der jeweiligen Reaktionsansätze ist unter Tab. 3.1 aufgeführt.

	<b>BK</b>	<b>Tomato</b>	<b>adipoCre</b>	<b>ob/ob</b>
MilliQ-H <sub>2</sub> O	37,3	37,8	38,8	37,8
10x Taq-Puffer	5,0	5,0	5,0	5,0
dNTPs	1,0	1,0	1,0	1,0
F1 [20µM]	1,5	1,0	1,0	1,0
F2 [20µM]	1,0	-	-	-
R1 [20µM]	1,0	1,0	1,0	1,0
R2 [20µM]	-	1,0	-	-
Taq-Polymerase	0,2	0,2	0,2	0,2
DNA	3,0	3,0	3,0	3,0

Alle Volumenangaben in [µl]

**Tab. 3.1: Zusammensetzung Genotypisierungsansatz**

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94 °C	3 min
Primerhybridisierung	56 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
Wdh. von Denaturierung (10 s), Primerhybridisierung und Elongation für 35 weitere Zyklen		
Terminale Elongation	72 °C	5 min
Kühlung	10 °C	max. 3 Std.

**Tab. 3.2: PCR-Programm Genotypisierung**

### 3.3.3 Enzymatischer Verdau von Schwanzspitzen-DNA mittels Dde1

In der ob/ob Mauslinie (s. Kapitel 3.2.2) führt eine spontane Punktmutation in Chromosom 6 des für Leptin codierenden Genes zum adipösen Phänotyp der betroffenen Tiere.

Neben dem daraus resultierenden vollständigen Unvermögen der genetisch modifizierten Tiere, funktionales Leptin-Protein generieren zu können ist durch diese Mutation im ob-Allel der Mäuse außerdem eine potentielle Schnittstelle für das Enzym Dde1 entstanden. Dieses Charakteristikum wird bei der Genotypisierung dieser Mauslinie genutzt. Dde1 kann hierbei zwischen Cytosin (C) und Thymidin (T) in einer 5'-CTNAG-3'-Sequenz schneiden. Diese Sequenz entsteht durch die beschriebene Punktmutation im Leptin-Gen und führt somit in ob-Tieren zum Auftreten einer Dde1-Schnittstelle, wohingegen WT-Allele vor Dde1-Verdau geschützt sind.

Nach der Isolation und Amplifikation der DNA wie unter Kapitel 3.3.1 und Kapitel 3.3.2 beschrieben wurde mit den PCR-Produkten der ob/ob-Tiere ein Dde1-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde das PCR-Produkt mit für 60min bei 37 °C mittels Dde1 verdaut, wodurch aus dem 155 bp umfassenden PCR-Produkt zwei Fragmente mit einer Größe von 100 bp und 55 bp entstanden. Der Verdau erfolgte hierfür wie in Tab. 3.4 beschreiben, der Reaktionsansatz setzt sich wie in Tab. 3.3 aufgeführt zusammen.

	Volumen
Dde1	1,0 µl
DNA	25,0 µl
10xNEB-Puffer 3	5,0 µl
BSA	0,5 µl
MilliQ-H <sub>2</sub> O	18,5 µl

**Tab. 3.3: Zusammensetzung Dde1-Restriktionsverdau**

	Temperatur	Zeit
Verdau	37 °C	60 min
Inaktivierung	65 °C	1 min
Kühlung	10 °C	max. 3 Std.

**Tab. 3.4: Programm Dde1-Restriktionsverdau**

### 3.3.4 Detektion der DNA mittels Ethidiumbromid und Agarose-Gelelektrophorese

Die mittels PCR gewonnenen DNA-Amplifikationsprodukte wurden anschließend in einem Agarose-Gel im elektrischen Feld aufgetrennt. Hierbei macht man sich die negative Ladung der DNA-Fragmente durch die enthaltenen Phosphatreste der Desoxyribonukleotide zunutze, welche eine Wanderung der Fragmente zur Anode, dem positiv geladenen Pol, bedingt. Die Agarose bildet hierbei eine Art Filter, welcher kleinen Molekülen eine leichte Fortbewegung ermöglicht, während größere Fragmente das Gel nur langsam durchqueren können. Dementsprechend durchlaufen die PCR-Produkte das Gel in einer Distanz, welche sich umgekehrt proportional zu ihrer Größe verhält.

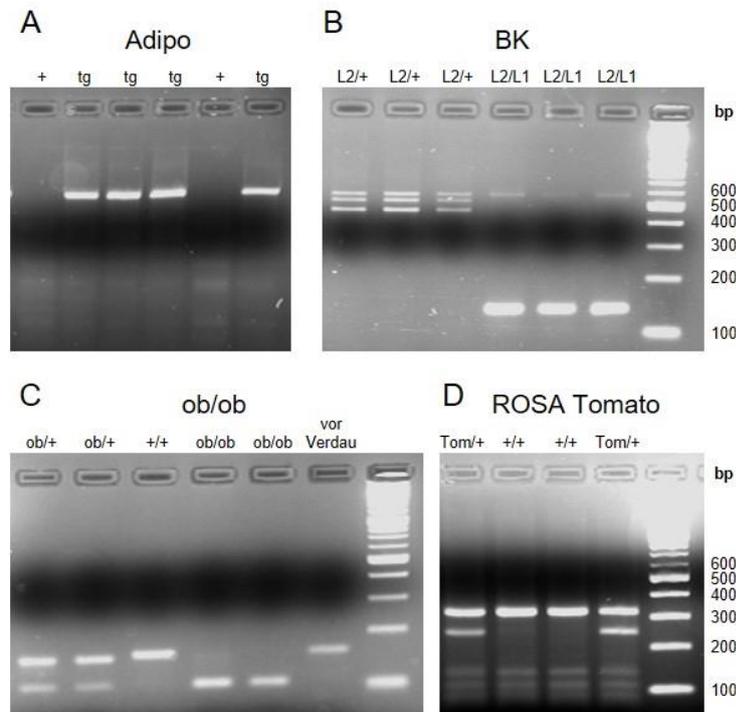
Für die Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese wurden in der Regel 2%-ige Agarose Gele verwendet. Eine Ausnahme bildeten hier wiederum ob/ob-Tiere, da auf Grund der sehr kleinen Verdau-Produkte eine Agarose-Konzentration von 3,5% gewählt werden musste um eine ausreichende Auftrennung zu erzielen.

Die Agarose wurde in TBE-Puffer (s. Kapitel 2.4.1) durch kurzes Aufkochen gelöst und anschließend unter ständigem Rühren bis auf ca. 40 °C abgekühlt, bevor Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µl/ml zugegeben wurde. Dieses interkaliert in die DNA und ermöglicht somit eine Visualisierung der DNA-Fragmente unter Bestrahlung mit UV-Licht. Das handwarme Gel wurde in entsprechenden Gelschlitten, mit Kämmen zur Ausbildung von Proben-Taschen, ausgebracht und bis zur vollständigen Polymerisierung abgekühlt.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit 6x Dye (s. Kapitel 2.4.1) versetzt, welcher einerseits die Viskosität der Proben erhöht, außerdem aber auch Xylencyanol und Bromphenolblau enthält, welche bei ca. 800 bp und 100 bp farbige Banden erzeugten und somit die Visualisierung der bisherigen Laufstrecke der DNA-Fragmente ermöglichte. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde neben den Proben auch ein Standard mit definierten DNA-Fragmenten in einem Bereich von 0,1-10 kb aufgetragen (*2-Log DNA ladder*). Die Gelelektrophorese erfolgte, nach anfänglich angelegten 80 V für ca. 15 min, über einen Zeitraum von 1-2 h bei 100-120 V bis eine ausreichende Auftrennung der DNA erfolgt war. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des BioDocAnalyse Systems von Biometra (s. Kapitel 2.1).

### 3.3.5 Bestimmung der Genotypen mittels DNA-Fragmentgrößen-Analyse

Zur Auswertung der PCR-Ergebnisse (s. Kapitel 3.3.2) wurden Agarose-Gelbilder angefertigt (s. Kapitel 3.3.4) und analysiert.



**Abb. 3.4: Repräsentative Aufnahmen der Fragmentgrößen-Analysen zur Genotypisierung**

Repräsentative Bilder nach Auftrennung der PCR-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese zur Identifizierung der jeweiligen Versuchstiere. **(A)** AdipoCre-Mauslinie, **(B)** globale BK-Mauslinie, **(C)** Leptin-Mutanten und **(D)** ROSA26-Reporter-Tiere. Fragmentgröße in Basenpaaren (bp), BK-Knockout-Gen (L1), gefloxtes/von loxP-sites flankiertes BK-Gen (L2), Leptin-Gen mit Punktmutation (ob), transgen (tg), ins Genom integrierte Tomato-Reporter-Sequenz (tom), Wildtyp (+). Weitere Erläuterungen im Text.

#### BK

Die Untersuchung des BK-Genotypes basierte auf dem Nachweis von Exon 7 des KCNMA1-Gens, welches bei BK-defizienten Tieren deletiert wurde (Sausbier et al., 2004). Das Amplifikat eines WT-Tieres umfasste hierbei eine Größe von 466 bp, während L1-Allele (mit deletierter Sequenz des Exon 7) nur noch eine Größe von 132 bp aufwiesen. Gefloxtes L2-Allelen, bei welchen das BK-Gen von loxP-sites flankiert ist, hatten eine etwas erhöhte Fragmentgröße von 577 bp. Bei heterozygoten Tieren konnten die beiden jeweiligen Banden detektiert werden.

#### adipoCreERT2<sup>tg/+</sup>

Der Nachweis der korrekt eingebauten adipoCreERT2-Rekombinase erfolgte durch eine Bande bei 600 bp, welche im WT nicht zu sehen war.

**ROSA26 Tomato<sup>tom/+</sup>**

Die transgenen ROSA26 Tomato Reporter Tieren (s. Kapitel 3.2.4) waren durch ein PCR-Amplikon mit einer Größe von 250 bp identifizierbar. In den korrespondierenden WT-Tieren wurde mit diesem Ansatz hingegen ein 330 bp großes DNA-Fragment amplifiziert.

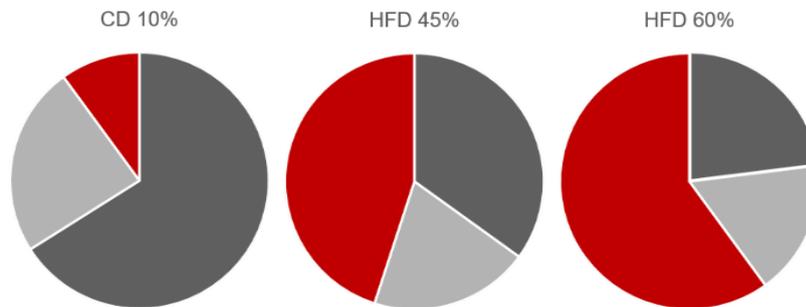
**ob/ob**

Eine Unterscheidung der Genotypen war hier erst nach der Durchführung des enzymatischen Verdauens mit Dde1 möglich (s. Kapitel 3.3.3), da zuvor sowohl WT als auch die ob-Mutanten ein PCR-Produkt mit ca. 155 bp aufwiesen. Dieses konnte bei Tieren, welche die Punktmutation im Leptin-Gen trugen durch den Dde1-Verdau in zwei Fragmente mit 100bp und 55bp aufgetrennt werden. Nach dem Verdau war zumeist nur noch die 100 bp umfassende Bande neben dem 150 bp umfassenden Signal detektierbar. Heterozygote Tiere zeichneten sich durch das Auftreten beider PCR-Produkte (100 bp + 150 bp) aus.

## 3.4 *In vivo* Versuche

### 3.4.1 Fütterungsversuche

Die Ernährung, insbesondere die Zusammensetzung der Nahrung und deren Kaloriendichte, haben weitreichende Auswirkungen auf Körpergewicht, Körperstruktur, Fetteinlagerung und daraus resultierenden Erkrankungen.



**Abb. 3.5: Zusammenstellung der verschiedenen Diäten**

CD 10 %, Kontrolldiät mit 10 % der Energie aus Fett; HFD 45 %, Hochfett-diät mit 45 % der Energie aus Fett; HFD 60 %, Hochfett-diät mit 60 % der Energie aus Fett; Protein, hellgrau; Fett, rot; Kohlenhydrate, dunkelgrau. Weitere Informationen im Text.

#### Standarddiäten

In der Versuchstierhaltung und Zucht eingesetzte Standarddiäten (*normal chow*, NC) bestehen in der Regel aus cerealischen Rohstoffen. Sie enthalten Rohstoffe aus Soja, Mais und Weizen sowie sämtliche, für die Tiere essentiellen Zusatzstoffe wie Vitamine, Spurenelemente und Mineralien. Ihre Zusammensetzung ist oftmals nicht genau bekannt oder angegeben und kann innerhalb gewisser Grenzen, auf Grund variierender natürlicher Ausgangsrohstoffe, zwischen verschiedenen Chargen leicht verändert sein.

#### Sonderdiäten

Bei der eingesetzten Kontrolldiät (*control diet*, CD) sowie den verschiedenen genutzten Hochfett-diäten (*high-fat diet*, HFD) handelt es sich um spezielle Sonderdiäten, welche aus gereinigten und/oder chemisch genau definierten Rohstoffen zusammengesetzt sind. Sie bestehen unter anderem aus speziell extrahiertem Casein, aufgereinigter Maisstärke, mikrokristalliner Cellulose, Saccharose und raffinierten Ölen wie beispielsweise Sonnenblumenöl. Entsprechend zubereitete Sonderdiäten können Übergewicht und Adipositas gezielt induzieren und so mittels geeigneter Untersuchungsmethoden einen Einblick in die dahinter steckende Pathophysiologie zu erlangen.

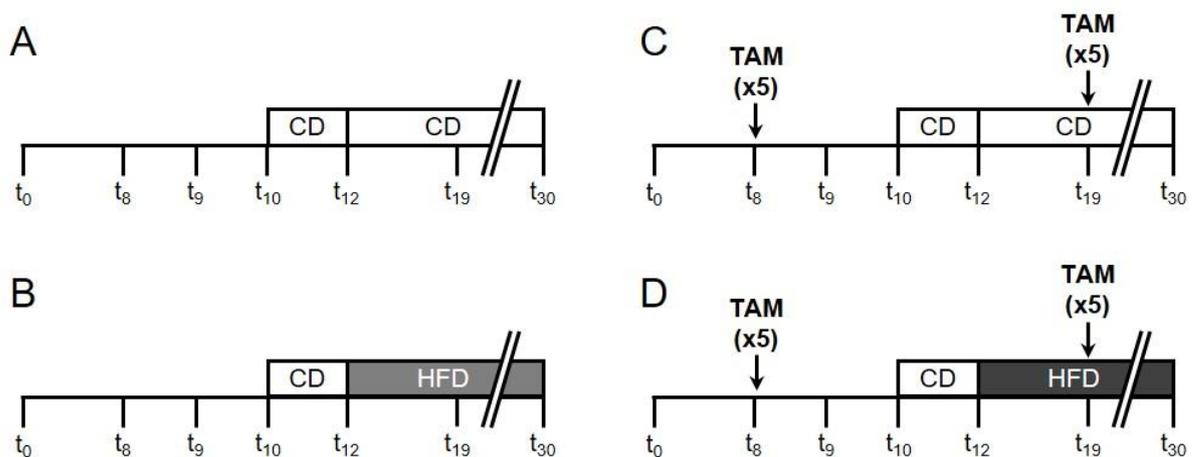
Bei Menschen, wie auch bei Mäusen (Buettner et al., 2007; Johnston et al., 2007; Samuelsson et al., 2008) ist bekannt, dass die Zufuhr von besonders fettreicher Nahrung Adipositas auslösen kann. Bei Nagetieren wie Ratten und Mäusen kommen in der Regel HFDs zum Einsatz, deren Fettgehalt 30-75% des gesamten Energiegehaltes ausmachen. Buettner et al. kamen in ihren Untersuchungen zu dem Schluss, dass besonders Diäten in einem Bereich von ca. 40% Energie aus Fett gut geeignet sind, um Adipositas in Tieren auszulösen.

### Fütterungsprotokolle mit adipoBK- und globalen BK-Tieren

Um die genauen Auswirkungen verschiedener Diäten, in Abhängigkeit von der BK-Kanal-Expression, auf das Körpergewicht wie auch auf die Körperstruktur, sowie metabolische und entzündliche Aspekte zu untersuchen, wurden verschiedene BK-Kanal-defiziente Mauslinien und ihre Wildtyp-Wurfgeschwister über einen Zeitraum von 18 Wochen mit unterschiedlichen Hoch- oder Normfett-diäten konfrontiert.

Es wurden zwei unterschiedliche Fütterungsprotokolle angewandt: Die Versuchstiere erhielten dabei entweder Zugang zu einer Kontrolldiät (CD), oder einer Hochfett-diät (HFD). Die Zuteilung für die verschiedenen Kohorten erfolgte randomisiert nach dem Zufallsprinzip, wobei darauf geachtet wurde, Wurfgeschwister jeweils in die verschiedenen Versuchsgruppen einzuteilen um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

AdipoBK-KO Tiere sowie globale BK-KO und ihre jeweiligen Kontrollen erhielten, beginnend mit einem Alter von 10 Wochen, für zwei Wochen eine purifizierte Kontrolldiät mit einem Anteil von 10% der umsetzbaren Energie aus Fett, was einem Fettanteil von ca. 4% entspricht (C1090-10, Altromin). Dieses 2-wöchige Intervall gab den Tieren die Möglichkeit, sich an die hochreine Diät zu gewöhnen und stellte außerdem einen vergleichbaren Startpunkt der Tiere hinsichtlich physiologischer und biologischer Parameter sicher.



**Abb. 3.6: Protokolle der Fütterungsversuche**

(A) Kontrolldiät (CD)- und (B) Hochfett-diät (HFD)-Fütterungsschema globaler BK-Kohorten. (C) CD- und (D) HFD-Fütterungsprotokoll von adipoBK-Tieren. Injektion von Tamoxifen (TAM) an 5 aufeinanderfolgenden Tagen im Alter von 8 Wochen ( $t_8$ ) (Präventionskohorten) oder 19 Wochen ( $t_{19}$ ) (Therapiekohorten). Weiter Informationen zum Ablauf im Text.

Mit einem Alter von 12 Wochen begannen anschließend die eigentlichen, 18 Wochen andauernden Fütterungsversuche. Während eine Kohorte als Kontrollgruppe weiterhin CD erhielt wurde die zweite Kohorte mit den eigentlichen Versuchstieren auf eine HFD umgestellt. Globale BK-defiziente Tiere sowie ihr WT-Wurfgeschwister erhielten hierbei eine HFD mit 45% der Energie aus Fett (C1090-45, Altromin), was einem Rohfettgehalt von ca. 22% entsprach. Adipozyten-spezifische BK-KO-Tiere und entsprechende Kontrollen erhielten eine 60%ige HFD (C1090-60, Altromin), deren Rohfettanteil ca. 34% ausmacht. Die genaue Zusammensetzungen aller Diäten kann auf der Internetseite des Herstellers unter:

<http://www.altromin.de/produkte/sonderdiaeten/diaet-induzierte-obesitas> eingesehen werden.

In einem Alter von 30 Wochen, d.h. nach 18 Wochen diätetischer Fütterung zuzüglich 2-wöchiger Gewöhnungsphase, wurden die Tiere wie unter Kapitel 3.4.5 beschrieben geopfert und wie unter Kapitel 3.4.6 angegeben untersucht.

### **Fütterungsprotokoll ob/ob X BK-Tiere**

Ob/ob Tiere weisen auf Grund der Mutation im Leptin-Gen und dem damit verbundenen Leptin-Mangel bereits ab einem Alter von 4 Wochen ein massiv erhöhtes Körpergewicht und damit assoziierte metabolische Veränderungen auf. Dieses etablierte Mausmodell für Adipositas musste dementsprechend nicht mit einer besonderen HFD behandelt werden, sondern erhielt über den gesamten Versuchszeitraum lediglich eine normale Standarddiät (*normal chow*, NC). Ab einem Alter von 4 Wochen wurde das Körpergewicht der Tiere über einen Zeitraum von 20 Wochen 7-tägig ermittelt. Im Alter von 24 Wochen wurden die Tiere wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben geopfert und wie unter Kapitel 3.4.6 angegeben untersucht.

Alle Tiere hatten während der gesamten Fütterungsversuche freien Zugang zu Wasser und Futter ad libitum und wurden wöchentlich gewogen. Da der besonders hohe Fettanteil der HFD die Nahrung hinsichtlich oxidativer Veränderungen und Verderb sehr anfällig macht, wurden die Sonderdiäten bei -20 °C gelagert und wöchentlich erneuert. Die Standarddiäten konnten bei Raumtemperatur gelagert werden und wurden bei Bedarf regelmäßig aufgefüllt.

### **3.4.2 Modifizierter Metabolischer Käfig**

Um den täglichen Futterkonsum der Tiere untersuchen zu können wurden die Mäuse für einen begrenzten Messzeitraum einzeln in modifizierten metabolischen Käfigen gehalten. Im Gegensatz zu klassischen metabolischen Käfigen wurden die Tiere hierfür auf Plexiglas-Platten anstatt Gittern gehalten, wodurch sich der Stress der Einzelhaltung für die Tiere weiter reduzieren ließ.

Nach einer Gewöhnungsphase von 4 Tagen wurde an 4 aufeinander folgenden Tagen die konsumierte Futtermenge mit Hilfe einer Feinwaage ermittelt. Hierfür wurde der frisch gefüllte Futterbehälter zu einem definierten Zeitpunkt sowie 24 h später erneut gewogen. Aus der Differenz dieser Massen ergab sich die konsumierte Futtermenge pro Tag.

Der Futterkonsum wurde auf diese Weise zu Beginn der Diäten (in einem Alter von 10 bzw. 12 Wochen) sowie am Ende der jeweiligen Diät (30. Woche) ermittelt.

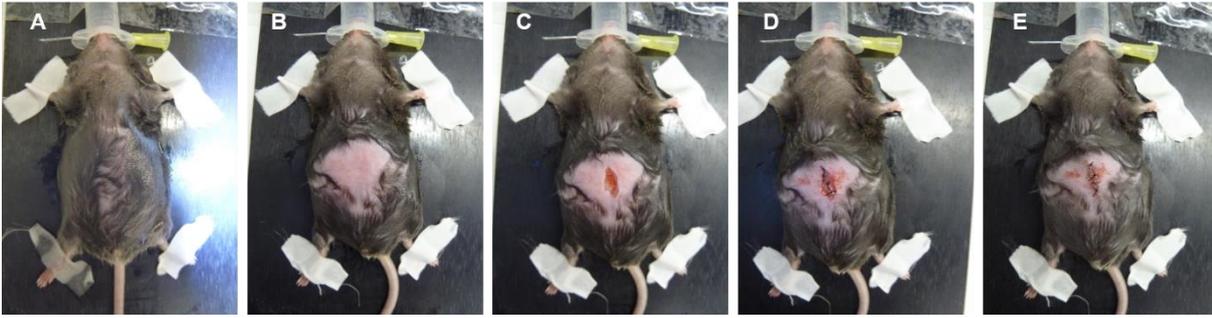
### **3.4.3 Radiotelemetrische Ermittlung von Körpertemperatur und Aktivität**

Mit Hilfe telemetrischer Systeme ist es möglich mehrere physiologische Parameter wie lokomotorische Aktivität, Körpertemperatur aber auch die Herzschlagfrequenz parallel zu ermitteln. Insbesondere für die Körpertemperaturmessung stellt dieses Verfahren eine sehr attraktive Alternative zu klassischen Rektal-Messungen oder Messung der Oberflächentemperatur mittels thermographischer Infrarot-Aufnahmen dar, da hierbei mit Hilfe der implantierten Transmittersysteme die Körperkerntemperatur ermittelt wird. Des Weiteren werden Stress-induzierte Anstiege in der Körpertemperatur während der Messung verhindert,

da die Tiere nicht wie beispielsweise bei einer Rektalmessung fixiert oder betäubt werden müssen sondern ohne jegliche Störung in ihren Haltungskäfigen verbleiben können.

Vor Implantation der Transmittersysteme wurden die Tiere mittels Inhalationsnarkose, bestehend aus einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch betäubt. Diese Methode erlaubt eine sehr gute Steuerung der Dauer und Tiefe der Narkose, welche durch Kontrolle der Zwischenzeh-Reflexe regelmäßig überprüft wurde. Zur Einleitung der Narkose wurde eine Isofluran-Konzentration von ca. 5% verwendet, im Anschluss daran wurde die Narkose während des gesamten Operationszeitraumes mit einer Konzentration von 1,5-2,5% Isofluran aufrechterhalten. Um ein Auskühlen der Tiere während der ca. 15-minütigen Implantation zu verhindern, wurden diese auf einer 37 °C warmen, beheizbaren OP-Platte gelegt (s. Abb. 3.7). Außerdem wurde eine Dexpanthenol-haltige Augensalbe auf beide Augen aufgebracht um ein Austrocknen der Hornhaut des Auges und daraus resultierende Verletzungen zu vermeiden.

Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage gebracht und an den Extremitäten fixiert. Der Bauch wurde nun mit Alkohol desinfiziert und das Fell auf einer Fläche von ca. 4-6 cm<sup>2</sup> mit Hilfe eines Skalpells vorsichtig abrasiert. Nach erneuter Kontrolle der Zwischenzeh-Reflexe wurde, bei ausreichend tiefer Narkose, die Bauchdecke durch einen ca. 12 mm langen, sagittalen Schnitt eröffnet. Anschließend erfolgte ein weiterer, etwa 10 mm langer Sagittalschnitt durch die tieferliegenden Muskelschichten des Peritoneums um dieses zu eröffnen. Der mit 0,9% Kochsalzlösung (NaCl) befeuchtete Transmitter (ETA-F10, DSI) wurde nun mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig in die Bauchhöhle geschoben. Da lediglich die Körpertemperatur und die lokomotorische Aktivität erfasst werden sollten wurden die Silikonummantelten, zur EKG-Messung vom Transmitter abgehenden, Drähte zuvor auf eine Länge von 1-2 cm gekürzt und am Ende jeweils mit Nahtmaterial abgebunden um ein Eindringen von Flüssigkeit zu vermeiden. Die flexiblen Drähte wurden gemeinsam mit dem Transmitter ins Peritoneum eingebracht und so platziert, dass eine Reizung oder gar Verletzung der Organe vermieden wurde. Nach erfolgreicher Implantation des Telemetrie-Transmitters wurde die Wunde mit einem 5-0 Seidenfaden (s. Kapitel 2.4.2) verschlossen. Hierzu wurden erst die inneren Muskelschichten mit 5-7 Einzelheftnähten fixiert, bevor auch die Bauchdecke mit weiteren 5-7 Stichen vernäht wurde. Während der gesamten Operation wurde ein Austrocknen der Bauchhöhle sowie der OP-Fläche durch wiederholtes Befeuchten mit 0,9% NaCl-Lösung verhindert. Um einer Entzündung der Operationsnaht zu vorbeugen wurde diese mit einem Octenidin- und Phenoxyethanol-haltigen Wunddesinfektionsmittel versorgt. Anschließend wurde die Fixierung der Tiere aufgehoben und diese wieder in Bauchlage gebracht bevor die Inhalationsnarkose abgestellt wurde. Zum vollständigen Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere wieder in ihre frisch befüllten Heimatkäfige verbracht und unter einer Rotlichtlampe vor einer etwaigen Auskühlung geschützt.



**Abb. 3.7: Ablauf der Implantierung telemetrischer Transmitter**

**(A)** Fixierung der betäubten Versuchstiere und Desinfektion der Operationsfläche. **(B)** Entfernung der Behaarung mittels steriler Skalpelli-Klinge. **(C)** Eröffnung der Bauchhöhle, Implantation des Transmitters. **(D)** Verschluss der Bauchhöhle mit Einzelheftnähten. **(E)** Verschluss der Bauchdecke. Weiter Informationen im Text.

Nach einer Regenerationszeit von 3-4 Tagen konnten die Temperatur- und Aktivitätsmessungen gestartet werden. Hierfür wurden die einzeln sitzenden Tiere in ihren jeweiligen Käfigen auf Empfängerplatten gestellt, welche das telemetrische Signal der implantierten Transmitter empfangen und dieses über eine Matrix-Switch-Einheit an einen Computer zur weiteren Verarbeitung mittels Dataquest A.R.T Software übermitteln konnten. Nach Anschalten der Transmitter über elektromagnetische Induktion detektierten diese alle 60 min für einen Zeitraum von 5 min die Körpertemperatur und lokomotorische Aktivität der Tiere. Diese Messungen waren für die Tiere nicht wahrnehmbar und konnten so ohne eine Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus erfolgen. Die Parameter wurden jeweils über einen Zeitraum von mindestens 96 h detektiert und konnten anschließend mit Hilfe der Dataquest A.R.T Software ausgewertet und analysiert werden.

Nach erfolgter Messung wurden die Tiere wie beschrieben (s. Kapitel 3.4.5) mit CO<sub>2</sub> euthanasiert bevor die Transmittersysteme entnommen wurden. Diese wurden nach Explantation für ein bis drei Tage in 1%iger Tergazym<sup>®</sup>-Lösung inkubiert, welche neben proteolytischen Enzymen auch Tenside enthält und dazu diente, etwaige Gewebereste am Transmitter abzubauen. Ausschließlich Transmitter, die völlig frei von Geweberesten sind, können für eine erneute Transplantation wiederverwendet werden. Anschließend wurden die Transmitter für weitere 24 h zur Desinfektion mit 2%ige Glutaraldehyd-Lösung behandelt, bevor sie mit steriler 0,9% NaCl-Lösung abgespült und getrocknet wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Transmitter in sterilen 15ml Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

### 3.4.4 Intraperitonealer Glucose-Toleranz-Test (i.p. GTT)

Der Glucose-Toleranz-Test (GTT) ist eine in der klinischen Praxis weit verbreitete Methode um den Glucose-Stoffwechsel bei Mensch und Tier hinsichtlich physiologischer und pathologischer Veränderungen zu untersuchen. Neben seiner Anwendung im klinischen Bereich kommt der GTT in verschiedenen Variationen (intraperitonealer GTT, oraler GTT, intravenöser GTT) auch in der Forschung vielfach zur Anwendung und stellt hier eine äußerst probate Methode zur Analyse von Veränderungen des Glucose-Metabolismus hinsichtlich der Entwicklung eines Diabetes mellitus oder metabolischen Syndroms in Nagetieren, sowohl

unter physiologischen Bedingungen aber auch nach diätetischen Fütterungsversuchen, *in vivo* dar.

Zur Analyse der Glucose-Toleranz wurden die Mäuse vor Beginn einer Diät, im Alter von 10 Wochen, sowie nach 18-wöchiger Fütterung mit CD oder HFD (s. Kapitel 3.4.1), in einem Alter von 30 Wochen, über Nacht für 10 h gefastet, bevor eine definierte Glucose-Dosis von 2 mg/g Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) appliziert wurde. Der Blutglucosegehalt wurde zum Zeitpunkt 0 min (unmittelbar vor der Glucose-Applikation) sowie 15, 30, 60 und 120 min nach Gabe der Glucoselösung mit Hilfe von GlucoCheck plus Sensoren und dem GlucoCheck-Advance Testgerät (Testamed) ermittelt. Hierzu wurde ca. 0,5 mm der Schwanzspitze der Tiere biopsiert und anschließend der zweite austretende Blutropfen aufgefangen.

Neben der Blutentnahme zur BG-Bestimmung wurden den Tieren außerdem zu allen Zeitpunkten zur späteren Insulin-Bestimmung einige Tropfen Blut entnommen. Dieses wurden in einer heparinisierten Microvette® (CB 300LH, Sarstedt) gesammelt und sofort mit 1 µl Aprotinin-Lösung (15 µM) versetzt. Auf diese Weise konnte sowohl eine Gerinnung der Blutproben, durch die Heparin-Beschichtung, als auch ein Abbau des Insulins, durch Zugabe von Aprotinin, verhindert werden. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung (s. Kapitel 3.5.6.1) auf Eis gelagert.

Die Versuchstiere wurden während des gesamten Versuches einzeln in Käfigen mit Einstreu, aber ohne Zellstoff, gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser *ad libitum*.

### **3.4.5 Organentnahme und Serumkollektion**

Zur finalen Blut-, sowie zur Organentnahme wurden die Tiere durch langsames Einleiten von CO<sub>2</sub> in den Heimatkäfig euthanasiert.

Nach Feststellen des Todes wurde die Bauchdecke der Tiere durch einen ca. 1 cm langen Schnitt unterhalb des Rippenbogens eröffnet. Es erfolgten transversale Schnitte beidseits entlang der Rippen sowie ein sagittaler Schnitt bis zur Schwanzwurzel. Durch dieses Vorgehen ließ sich das Bauchfell zur Seite klappen, was den Eintrag von Fell in die Bauchhöhle verhinderte. Unterstützend und auch, um eine Kontamination zu vermeiden wurden die Tiere zuvor mit ausreichend 80% Ethanol besprüht.

#### **3.4.5.1 Blutentnahme**

Anschließend erfolgten die Öffnung der Bauchhöhle und die Entnahme des Blutes über die abdominelle Aorta. Hierfür wurde eine Kanüle proximal in die Bauchaorta eingeführt und mittels einer 1 ml Spritze mit 27er-Kanüle durch sanften Unterdruck Blut entnommen. Das gewonnene Blut wurde mindestens 30 min auf Eis gelagert, um die vollständige Gerinnung zu ermöglichen. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm um die festen Blutbestandteile zu sedimentieren. Der klare Überstand wurde anschließend, ohne das entstandene Pellet aufzuwirbeln, vorsichtig entnommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die gewonnenen Serumproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **3.4.5.2 Präparation verschiedener Fettdepots und weiterer Organe**

Nach der Opfierung der Tiere und dem Eröffnen der Bauchdecke (s. Kapitel 3.4.5) wurden die subkutan gelegenen Leistenfett-Depots (iWAT) ventral der Oberschenkel entnommen. Im Anschluss erfolgten die Organentnahmen aus der Bauchhöhle, sowie die Entnahmen des um die Nebenhoden gelegenen, epididymalen Fettgewebes (eWAT), des mesenterischen Fettes, der perirenal Fettdepots, welche rings um die Nieren angeordnet sind, sowie der Nieren selbst. Diese wurden mit einer Präparierschere komplett vom umliegenden Fettgewebe gelöst. Des Weiteren wurde die Leber präpariert. Hierzu wurden die Leberlappen mit einer feinen Schere vorsichtig von der Gallenblase befreit und entlang der Wirbelsäule vom Körper abgelöst.

Die Entnahme der interscapularen Fettgewebe erfolgte von dorsal. Das Fell wurde hierfür durch einen ca. 1cm langen, transversalen Schnitt direkt oberhalb der Schulterblätter eröffnet. Im Anschluss wurde die Haut durch einen sagittalen Schnitt entlang der Wirbelsäule durchtrennt und das Fell zur Seite geklappt. Anschließend konnten die interscapularen Fettdepots entnommen werden. Dazu wurden cranial gelegene Abschnitte des weißen interscapularen Fettes caudal nach hinten umgelegt um das darunter befindliche braune interscapulare Fett (BAT) freizulegen. Die beiden pyramidenförmigen, bräunlich gefärbten BAT-Depots wurden durch gerade Schnitte vom anschließenden weißen Fettgewebe losgelöst. Im Anschluss konnte dieses mit einer geraden Schere von den umliegenden Muskelschichten abgelöst und entnommen werden.

Alle Gewebe wurden nach der Organentnahme in entsprechende 1,5 ml, 2 ml oder 15 ml Reaktionsgefäße verbracht, gewogen und anschließend entweder direkt weiter verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **3.4.5.3 Entnahme der Tibiae**

Da auf Grund der diätetischen Fütterungsversuche und der verschiedenen Genotypen stark differierende Körpergewichte innerhalb der Kohorten erwartet wurden, erfolgte außerdem die Entnahme des Schienbeinknochens, um eine adäquate und gewichtsunabhängige Normierung der verschiedenen Fettdepots, der Leber sowie des Körpergewichtes zu ermöglichen.

Zur Entnahme der Tibia wurde der rechte Femur direkt oberhalb des Kniegelenkes durchtrennt. Durch 15- bis 20-minütiges kochen konnten an der Tibia verbliebene Gewebstücke sowie mögliche Reste des Oberschenkelknochens mit Hilfe einer Pinzette recht einfach entfernt werden. Die freigelegten Schienbeinknochen wurden anschließend mittels Schieblehre vermessen.

### **3.4.6 Analyse von Körpergewicht und Fettdepotgewichten**

Um die Gewichtsentwicklung aller Tiere auf verschiedenen Diäten untersuchen zu können wurden diese, beginnend ab einem Alter von 10 Wochen für adipoBK und BK Tiere oder einem Alter 4 Wochen für ob/ob x BK-Mäuse, wöchentlich, sowie direkt vor der terminale Organentnahme gewogen. Die Tiere wurden hierzu aus ihren Haltungskäfigen in eine nach

oben hin offene Box (ca. 8 cm x 10 cm x 8 cm) gesetzt und auf einer Oberschaligen Taschenwaage gewogen.

Die verschiedenen Fettdepots, sowie die Leber und die Nieren wurden wie unter Kapitel 3.4.5.2 beschrieben entnommen und mittels Analysenwaage in Reaktionsgefäßen gewogen. Um Gewichtsunterschiede zwischen den Kohorten, welche auf Genotyp-abhängige Größendifferenzen zurück zu führen sind, auszugleichen wurden die terminalen Körpergewichte sowie die Massen der einzelnen Organe und Fettdepots auf die Tibialänge (TL) normiert.

## 3.5 *In vitro* Versuche

### 3.5.1 Determinierung der Körperstruktur mittels Soxhlet-Fettextraktion

Neben der Analyse einzelner Fettmassen und des gesamten Körpergewichtes sollte auch die genaue Körperstruktur analysiert werden. Insbesondere, da beispielsweise kleine Fettdepots oder Unterhautfettgewebe schwierig zu determinieren sind und es besonders unter HFD-Fütterungen auch zu massiven Fetteinlagerungen in Gewebe kommt, sollte auch der gesamte Körperfettanteil, sowie der Anteil an Wasser und fester Masse (Muskeln, Knochen, Knorpel, etc.) bestimmt werden.

Hierzu wurden die Tiere nach Beendigung der Fütterungsversuche über Nacht gefastet, um potentielle Verfälschungen des Fettgehaltes durch Nahrungsfette von noch im Gastrointestinaltrakt befindlichem Nahrungsbrei auszuschließen. Im Anschluss wurden die Tiere wie beschrieben mit CO<sub>2</sub> getötet und das Gesamtkörpergewicht ( $m_{\text{ges}}$ ) mittels Analysenwaage bestimmt. Im Folgenden wurden die Bauchdecke sowie die Bauchhöhle möglichst weit eröffnet und die Tiere für mindestens 24 h bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Trockenmasse ( $m_{\text{trocken}}$ ) der abgekühlten Tiere wurde hiernach erneut mittels Analysenwaage bestimmt. Der Wasseranteil der Tiere ergab sich somit aus der Differenz der beiden Werte:  $m_{\text{Wasser}} = m_{\text{ges}} - m_{\text{trocken}}$ . Anschließend wurden die getrockneten Kadaver mit Hilfe eines Standmixers für ca. 1 min auf höchster Stufe mechanisch zerkleinert. Die entstandene Gwebemixtur wurde nun vollständig in eine nach oben hin offene Cellulose-Extraktionshülse überführt und diese in die Soxhlet-Apparatur eingebracht. Das Fett wurde dann durch 6 Extraktions-Zyklen mit 180 ml Chloroform-Methanol-Gemisch (3:1) vollständig herausgelöst und aus dem Gewebe entfernt.

Dazu wird das Lösungsmittelgemisch in einen Rundkolben eingefüllt, welcher mit Hilfe eines Heizpilzes langsam auf eine Temperatur von 76 °C erhitzt wird. Der über das Dampfrohr aufsteigende Lösungsmitteldampf kondensiert im Folgenden an dem über dem Soxhlet-Aufsatz befestigten Liebigkühler und tropft so fortwährend in den Soxhlet-Aufsatz hinein, wo auf Grund der Lipophilie der Lösemittel Fett aus der Gwebemixtur herausgelöst wird. Der Lösemittelspiegel steigt nun stetig an, bis die Flüssigkeit den höchsten Punkt des dünnen Steigrohres erreicht hat. Die knapp unter diesem Punkt befindliche Olive ermöglicht nun eine Saugheberwirkung und somit ein komplettes Rückfließen des Lösungsmittel-Fett-Gemisches in den Rundkolben. Dort wird das Gemisch kontinuierlich weiter erhitzt, so dass erneut

Lösemitteldämpfe über das Dampfrohr aufsteigen können und der nächste Extraktionszyklus beginnt. Das eluiert Fett bleibt hierbei im Rundkolben zurück.

Nach 6 Elutionszyklen wurde der Heizpilz abgeschaltet und die erkaltete Lösemittel-Fett-Mischung verworfen. Die Extraktionshülse mit den darin befindlichen fettfreien Überresten der Gewebemixtur wurde über Nacht bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet. Der trockene Inhalt der Cellulose-Hülse wurde nun mit Hilfe einer Analysenwaage zur Feststellung der Magermasse der Maus ( $m_{\text{mager}}$ ) erneut gewogen. Der Fettanteil der Tiere ergibt sich nun aus der Differenz von Mager- und Trockenmasse ( $m_{\text{Fett}} = m_{\text{trocken}} - m_{\text{mager}}$ ).

### **3.5.2 Immunhistochemische Färbungen**

Für die histochemischen und morphologischen Untersuchungen wurden die entsprechenden Gewebe fixiert, teilweise entwässert und in Gefriermedium eingebettet. Anschließend wurden Kryoschnitte verschiedener Schnittdicke angefertigt, welche mittels (immun-) histochemischer Methoden angefärbt und weiter analysiert wurden.

#### **3.5.2.1 Fixierung verschiedener Fettgewebe und Leber**

Die Gewebe wurden wie in Kapitel 3.4.5.2 beschrieben komplett entnommen. Im Folgenden wurden ca. 100-200 mg große Gewebefragmente abgetrennt. Diese wurden für 90min zu Fixierung in 4%ige Paraformaldehyd-Lösung (PFA) eingebracht. Die Wirkung von PFA besteht in einer Vernetzung von Proteinen, wodurch die Gewebe stabilisiert und gefestigt werden. Im Anschluss erfolgte ein 5-minütiger Waschschrift mit PBS bevor die Gewebe einen Sucrose-Gradienten durchliefen, wodurch den Zellen Wasser entzogen wurde, wodurch sich eine irreversible Zerstörung der Zellen beim Einfrieren des Gewebes verhindern lässt. Zur Entwässerung, wurden die Proben für 1 h in 5%iger Sucrose Lösung inkubiert, gefolgt von 10%iger Sucrose über Nacht und weiteren 24 h in 20%iger Sucrose-Lösung. Das hierin enthaltene Natriumazid soll eine mikrobielle Kontamination durch Blockade der mikrobiellen Atmungskette verhindern.

Die mit PFA fixierten und Sucrose entwässerten Gewebstücke wurden anschließend in Kryomedium NEG50™ luftblasenfrei eingebettet und bis zur weiteren Verarbeitung und Analyse bei -80 °C gelagert.

#### **3.5.2.2 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Für die immunhistochemische Färbungen und Immunfluoreszenz-Färbungen wurden sehr feine Gewebeschnitte hergestellt. Hierfür wurde das Gewebe in NEG 50™ eingebettet und tiefgefroren und dann mit Hilfe eines Kryotoms sektioniert. Es wurden 8 µm Schnitte von braunem Fettgewebe und Leber sowie 14 µm feine Gefrierschnitte von weißem Fettgewebe angefertigt, welche dann auf Superfrost® Plus Objektträger aufgebracht wurden. Diese weisen eine dauerhafte, positive Ladung auf und können somit unter anderem Gefrierschnitte über elektrostatische Anziehungskräfte fest und dauerhaft adhären. Die Klinge des Mikrotoms wurde zur Herstellung der Schnitte auf durchschnittlich circa -30 °C herabgekühlt, das zu schneidende Gewebe auf im Mittel etwa -28 °C. Die Objektträger wurden im Folgenden entweder für 30 min getrocknet, bevor sie direkt für Färbungen verwendet wurden oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 3.5.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) können Zellstrukturen auf relativ einfachem Weg sichtbar gemacht und untersucht werden.

Die Färbung setzt sich prinzipiell aus zwei verschiedenen Färbeschritten zusammen. Zum einen können, mittels basischem Hämatoxylin, Zellkerne blau bis dunkelviolett angefärbt werden. Hierbei macht man sich die hohe Affinität des Farbstoffes zu sauren bzw. basophilen Strukturen wie Nukleinsäuren und ribosomalen Strukturen zu Nutze. Das saure Eosin, welches in einem zweiten Färbeschritt angewendet wird, hat hingegen eine hohe Affinität zu basisch-eosinophilen bzw. azidophilen Strukturen. Somit werden Zellplasmaproteine aber auch Kollagen, Keratin und Mitochondrien mit Hilfe von Eosin rot bis pink angefärbt.

Die erzeugten Gefrierschnitte (s. Kapitel 3.5.2.2) wurden zur Vorbereitung der Färbung für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet oder aufgetaut, falls sie zuvor bei -20 °C gelagert wurden. Anschließend wurden die Objektträger 2x für 3 min in MilliQ-Wasser gewaschen um die Schnitte von Gefriermedium zu befreien und zu rehydrieren. Ein Austrocknen der Schnitte während der folgenden Färbeschritte war zu vermeiden. Nach der Rehydrierung wurden die Objektträger für 6 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung nach Harris (s. Kapitel 2.4.5) eingetaucht. Überschüssige Färbelösung wurde durch erneutes 2-maliges Waschen mit Leitungswasser für jeweils 3 min entfernt. Durch kurzes tauchen der Schnitte in 0,1%ige Ammoniak-Lösung (s. Kapitel 2.4.5) konnte der pH-Wert erhöht werden, was einen Umschlag der bräunlichen Färbung zu blau zur Folge hatte. Auch das Waschen mit Leitungs- statt MilliQ-Wasser trägt zu dieser pH-Erhöhung bei und fördert somit die Ausbildung der kräftig blau-violetten Färbung. Vor der weiteren Färbung mit Eosin wurden die Schnitte erneut 2 mal 3 min mit Leitungswasser gewaschen. Die Eosin Färbung erfolgte durch 12-minütige Inkubation in 0,25%iger Eosin-Y-Lösung (s. Kapitel 2.4.5). Überschüssige Farbe wurde wiederum durch 2 mal 3-minütiges Waschen mit Leitungswasser entfernt. Im Weiteren wurden die Schnitte durch das Durchlaufen eines Alkoholgradienten entwässert und die Färbung intensiviert. Hierzu wurden die Objektträger für jeweils 3 min in 80%igen Ethanol, 100%igen Ethanol und im Anschluss in Toluol eingebracht, bevor die gefärbten Schnitte in wasserfreiem DePeX-Medium (s. Kapitel 2.4.5) eingebracht und mit einem Deckglas bedeckt wurden.

Nach vollständigem Aushärten des Distyren und Toluol/Xylen haltigen Einbettmediums wurden etwaige Mediumreste mit Waschbenzin entfernt und die Schnitte mittels Lichtmikroskop Axiovert 200M (Zeiss) fotografiert und anschließend mittels AxioVision Rel 4.8 Software analysiert.

### 3.5.2.4 Immunhistochemische DAB-Färbung

Bei immunhistochemischen Färbungen werden gezielt Antikörper gegen die zu untersuchenden Antigene eingesetzt, welche dann entweder selbst (direkte Methode), oder durch Kopplung an Detektions-Systeme (indirekte Methode), dargestellt und sichtbar gemacht werden können.

Bei der Diaminobenzidin (DAB)-Färbung handelt es sich um eine sogenannte ABC-Färbemethode. Hierbei macht man sich neben der klassischen Antigen-Antikörper-Reaktion den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex zunutze. Bei der hier verwendeten, indirekten ABC-Methode wird ein primär-Antikörper eingesetzt, welcher sich spezifisch an ein bestimmtes

Antigen bindet (hier: BK-Kanal, der Hormonsensitive Lipase (HSL) oder *Uncoupling* Protein 1 (Ucp1)). Als sekundärer Antikörper wird ein biotinylierter Antikörper eingesetzt, der sich gegen die Immunglobuline jener Spezies richtet, in welcher der primäre Antikörper erzeugt wurde (hier: Kaninchen für BK und HSL, bzw. Ziege für Ucp1). Das zugegebene ABC-Kit enthält Biotin-Peroxidase-Komplexe, welche durch Vorinkubation der Reagenzien gebildet wurden. Das im Reagenz enthaltene Avidin kann im Folgenden an Biotin-Reste des Sekundär-Antikörpers binden. Des Weiteren verknüpft Avidin auch Biotin-Peroxidase-Komplexe untereinander, wodurch eine Verstärkung des Detektions-Signales erreicht wird. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid, dem Substrat der Meerrettichperoxidase, wird dieses zu Wassermolekülen und freien Protonen umgesetzt. Diese dabei frei werdenden Protonen oxidieren das zuvor farblose Chromogen DAB zu einem braunen Präzipitat, welches unter normalem Tageslicht detektiert werden kann.

Die angefertigten Gefrierschnitte wurden für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet, falls sie direkt nach Herstellung der Schnitte weiterverwendet wurden oder aufgetaut, falls zuvor eine Lagerung bei -20 °C erfolgte. Währenddessen wurde eine feuchte Kammer erzeugt und die Objektträger mit einem Fettstift umrandet. Im Anschluss daran erfolgte eine Permeabilisierung der Gefrierschnitte in 0,3% Triton-X100 in PBS für 30 min. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in PBS für jeweils 5 min wurde die endogene Peroxidase durch Zugabe einer sogenannten *Quenching*-Lösung inaktiviert. Hierzu wurde eine Mischung aus 3% Wasserstoffperoxid und 20% Methanol in PBS verwendet. Nach Verwerfen der Inaktivierungs-Lösung und erneutem dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min erfolgte, bei BK- und HSL-Färbung, eine Blockade der unspezifischen Bindestellen durch Zugabe von 10% normalem Ziegen-Serum (NGS) in PBS für eine Stunde. Die Schnitte, welche im Folgenden mit einem Primärantikörper gegen Ucp1 behandelt werden sollten, wurden 60 min in 10% normalem Esel-Serum (NDS) blockiert. Im Anschluss wurden die Proben mit Primär-Antikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die genaue Zusammensetzung, sowie die Konzentration der Primärantikörper, sind in Tab. 2.19 aufgeführt. Als Negativkontrolle dienten Gefrierschnitte, welche über Nacht lediglich mit 1,5% NGS in PBS (BK, HSL) bzw. 1,5% NDS in PBS (Ucp1) inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Gefrierschnitte erneut 3 mal 5 min mit PBS gewaschen, bevor der biotinylierte Sekundär-Antikörper (die eingesetzten Konzentrationen sind in Tab. 2.19 aufgeführt) zugegeben wurde. Nach 60 min bei Raumtemperatur wurde abermals wie zuvor gewaschen. Es folgte eine 30 minütige Einwirkphase der vorinkubierten ABC-Arbeitslösung im Dunkeln, gefolgt von weiteren drei 5 minütigen Waschschritten. Da der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex lichtempfindlich ist fanden neben der Vorinkubation auch alle weiteren Schritte bis zum Stoppen der Farbreaktion im Dunkeln statt. Die Inkubation mit dem DAB-Substrat wurde nach 4-5 min (HSL, BK) bzw. 2-3 min (Ucp1) durch Verwerfen der Lösung und Einbringen der Schnitte in Leitungswasser, sowie anschließendes 5 minütiges Waschen gestoppt. Um die Gefrierschnitte zu dehydrieren, durchliefen diese einen Ethanol-Gradienten, indem sie jeweils 5 min in 80% Ethanol, 100% Ethanol und abschließend in Toluol eingebracht und im Anschluss sofort in DePeX Einbettungs-Medium eingebettet wurden. Die angefärbten Schnitte wurden nach ausreichender Aushärtung des DePeX-Mediums mit Hilfe eines Lichtmikroskopes

Axiovert 200M (Zeiss) mit Digitalkamera-Adapter fotografiert und anschließend mittels AxioVision Rel. 4.8 Software analysiert.

### **3.5.2.5 Immunfluoreszenz-Färbung**

Bei Immunfluoreszenz-Färbungen (IF) werden gezielt Antikörper gegen die zu untersuchenden Antigene eingesetzt, welche dann entweder durch eigene Fluoreszenz (direkte Methode) oder durch Bindung an Fluorophor-gekoppelte Antikörper (indirekte Methode) dargestellt und sichtbar gemacht werden können. Diese Form der Immunmarkierung wird neben ihrem Einsatz in der Diagnostik vor allem genutzt um molekulare Strukturen in Geweben und vor allem Gewebeschnitten darzustellen. Mit Hilfe geeigneter hochauflösender Mikroskope, welche außerdem in der Lage sind die Fluorophore durch Aussendung von Licht mit entsprechender Wellenlänge anzuregen, kann so die Expression und Lokalisation von Proteinen auf zellulärer Ebene untersucht werden.

Diese spezielle Form der immunhistochemischen Färbung wurde angewandt, um die Expression des BK-Kanals in verschiedenen weißen Fettzelldepots, sowie in braunem Fettgewebe zu untersuchen. Dazu wurden 8 µm-Schnitte von braunem Fettgewebe beziehungsweise 14 µm starke Schnitte aus weißem Fettgewebe (s. Kapitel 3.5.2.2) bei Raumtemperatur für 30 min aufgetaut und getrocknet. Zur Permeabilisierung wurden die Schnitte 30 min in 0,3% Triton/PBS (s. Kapitel 2.4.5) inkubiert, im Anschluss 3 mal 5 Minuten mit MilliQ-Wasser gewaschen bevor die Blockierung durch einbringen in 5% NGS/PBS (s. Kapitel 2.4.5) für 1 h bei Raumtemperatur erfolgte. Die Positiv-Proben wurden über Nacht bei 4 °C in 400 µl anti-BK-Antikörperlösung (1:1000 in 1,5% NGS/PBS, s. Kapitel 2.4.5) inkubiert, die negativ Kontrollen lediglich in 1,5% NGS/PBS (s. Kapitel 2.4.5). Am darauffolgenden Tag wurden die Lösungen wieder abgenommen und die Schnitte 3 mal 5 min mit 5% NGS/PBS (s. Kapitel 2.4.5) gewaschen, bevor die 60-minütige Inkubation in Fluorophor-gekoppeltem Sekundär-Antikörper (erfolgte 1:500 in 1,5% NGS/PBS, s. Kapitel 2.4.5) bei Raumtemperatur im Dunkeln folgte. Da Fluoreszenzfarbstoffe stark lichtempfindlich sind wurden auch alle weiteren Schritte einschließlich der Detektion im Dunkeln durchgeführt. Nach der Inkubation im Sekundär-Antikörper wurden die Schnitte 4x 4 min mit PBS gewaschen und anschließend in 120 µl PermaFluor® mit 0,1% Hoechst (s. Kapitel 2.4.5) eingedeckelt. Hoechst interkaliert hierbei mit der DNA und macht somit durch entsprechende Anregung Zellkerne im Gewebe sichtbar. Nachdem das Einbettmedium vollständig ausgehärtet war und ausgelaufene Mediumreste mit Waschbenzin entfernt wurden erfolgte die Generierung repräsentativer Bilder mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (AxioImager Z1, Zeiss) und der entsprechenden Software (s. Kapitel 2.2).

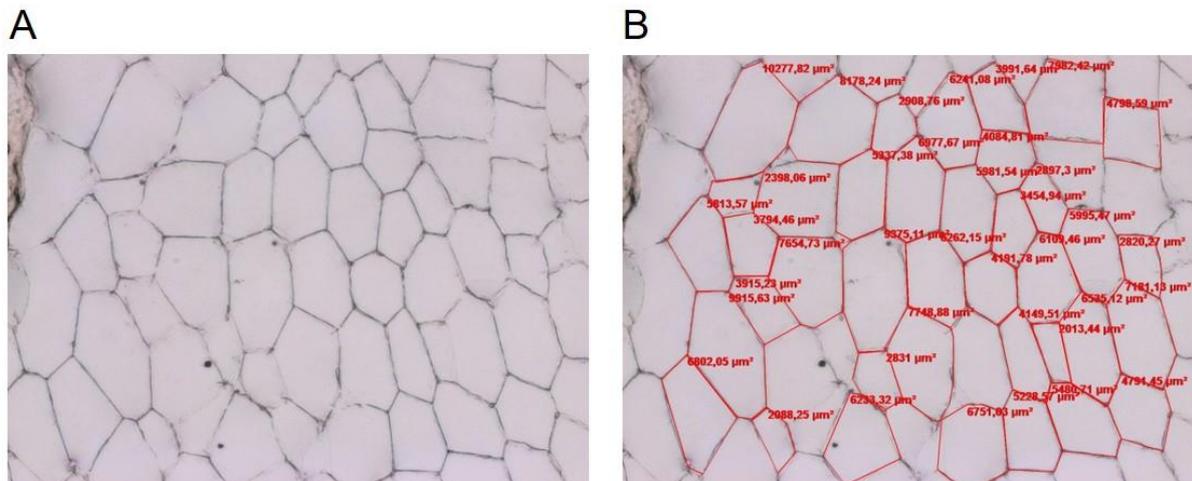
Um potentielle Fluoreszenz-Unterschiede auf Grund leicht abweichender Durchführungen zu vermeiden wurde darauf geachtet, sowohl Knockout- als auch Kontrollgewebe auf einem Objektträger zu verarbeiten und abschließend mit denselben Einstellungen zu fotografieren.

### **3.5.3 Determinierung der Fettzellgröße**

Neben der Bestimmung der Fettmassen der KO- und entsprechenden Kontroll-Tiere, war insbesondere auch die Größe der Fettzellen, in Abhängigkeit der Diät, ein entscheidendes Merkmal zur Untersuchung potentiell pathologischer Veränderungen, da eine Hypertrophie

von (Fett-) Zellen nachweislich mit vermehrten Entzündungsreaktionen im Fettgewebe und als Folge daraus auch mit metabolischen Veränderungen wie Insulinresistenz assoziiert ist.

Zur Determinierung der Fettzellgröße *in vitro* wurden 14  $\mu\text{m}$  starke Kryoschnitte (s. Kapitel 3.5.2.2) der jeweiligen Fettgewebe angefertigt und mit Hilfe des Axiovert 200M Lichtmikroskopes (Zeiss) fotografiert. Pro Tier wurden von mindestens 5 verschiedenen Gewebeschnitten insgesamt mindestens 10 Fotografien erzeugt und anschließend mittels AxioVision Rel. 4.8 Software analysiert. Dazu wurden, mit Hilfe der in der Software enthaltenen Messwerkzeuge, der Umfang der einzelnen Fettzellen ermittelt. Pro Tier wurden auf diese Weise mindestens 1000-6000 Zellen analysiert. Bei der Auswertung wurde außer der Fettzellgröße auch deren Lokalisation im Fettzellverbund hinsichtlich Randbereich oder zentraler Region festgehalten.



**Abb. 3.8: Repräsentative Aufnahme von Gewebeschnitten zur Fettzellgrößenbestimmung**

**(A)** Unbearbeitete lichtmikroskopische Aufnahme von WAT. **(B)** Gleiche Aufnahme nach Vermessung der Fettzellgrößen. Rote Linien indizieren Markierungen des Umfangs. Weiterführende Information zur Durchführung im Text.

### 3.5.4 Bestimmung der Zellkerndichte

Zur Bestimmung der Zellkerndichte wurden Gefrierschnitte der entsprechenden Gewebe (s. Kapitel 3.5.2.2) mittels Zugabe von 120  $\mu\text{l}$  PermaFluor® mit 0,1% Hoechst eingedeckelt, um die Zellkerne mit dem enthaltenen Fluoreszenzmarker anzufärben. Nach Trocknung für mindestens 24 h bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde repräsentative Bilder der Schnitte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (AxioImager Z1, Zeiss) und der entsprechenden Software (s. Kapitel 2.2) angefertigt. Diese wurden mit Hilfe der FIJI Software (s. Kapitel 2.2) ausgewertet, indem die Zellkerne pro definierter Fläche automatisch erfasst und vom Programm ausgezählt wurden. Pro Tier wurden hierfür mindestens 5 verschiedene Ausschnitte ausgewertet und ihre Zellkerndichte gemittelt.

### 3.5.5 mRNA-Expressionsanalysen mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Die Analyse von mRNA-Expressions-Leveln mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) ist ein probates Mittel zur Quantifizierung von cDNA (copyDNA), welche durch reverse Transkription aus zuvor isolierter RNA gewonnen wurde. Bei der Amplifikation der cDNA mit

Hilfe der PCR-Methode, kommt es zur Einlagerung eines Fluorophors, welches im Folgenden in Echtzeit detektiert werden kann. Da die Fluoreszenz-Stärke direkt proportional zur Menge der generierten PCR-Produkte zunimmt ermöglicht die Erfassung des Fluoreszenzsignals eine Quantifizierung der cDNA. Untersuchungen zur mRNA-Expression wurden in Zellkultur-Lysaten sowie in Fettgeweben durchgeführt.

### **3.5.5.1 Isolation von mRNA**

Die Isolation der mRNA erfolgte mittels Lyse der Zellen durch Guanidinisothiocyanat und anschließende Phenol-Chloroform-Fällung der RNA.

Hierzu wurde wie im Folgenden beschrieben vorgegangen. Zur Isolation von mRNA aus Zellkulturen wurden Zellen aus mindestens 4 Kavitäten einer 6-Loch-Platte lysiert und vereinigt. Die mRNA der Zellen wurden hierfür entweder am Tag der Inkubation (vor Inkubation) oder am Ende der Primärkultur-Dauer (Tag 13-15) isoliert. Dazu wurde das Medium der Zellen vollständig abgesaugt und die Kulturen anschließend 2x mit 37 °C warmem PBS gewaschen. Nach vollständigem Entfernen des PBS wurde 1 ml Guanidinisothiocyanat-haltiges PeqGOLD RNAPure zugegeben und mit Hilfe einer geeigneten Pipette mehrfach aufgezogen und wieder in die Kulturschale verbracht um ein vollständiges Ablösen sowie die Lyse der Zellen zu erreichen. Auch die Folgenden Kultur-Kavitäten wurden mit derselben PeqGOLD lysiert und aufgenommen. Durch wiederholtes Aufziehen in die Pipette konnte hierbei ein gänzlich Ablösen des Zellrasens sowie die Lyse der Zellen erreicht werden. Die gewonnene Zelllysat-PeqGOLD-Mischung wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Für die Isolation von mRNA aus Fettgeweben wurden die bei -80 °C gelagerten Fettbiopsien mit einer adäquaten Menge an Guanidinisothiocyanat-haltigem Reagenz versetzt (1 ml). Anschließend wurde das jeweilige Gewebe mit Hilfe eines Hand-Dispergiergerätes auf höchster Stufe für ca. 1 min vollständig homogenisiert. Das enthaltene Guanidinisothiocyanat bedingte hierbei eine Lyse der Zellen, indem es als chaotropes Denaturierungsreagenz Wasserstoffbrückenbindungen aufbricht und somit die Strukturgebenden Proteine und Lipiddoppelschichten der Membranen der Zellen zerstört. Das enthaltene Phenol dient der Aufnahme der eluierten RNA.

Sowohl die aus Zellkulturen, wie auch die aus Fettgeweben gewonnenen Zelllysate wurden im Folgenden auf die gleiche Weise weiter prozessiert.

Durch Zentrifugation mit 13.000 rpm bei 4 °C für 10 min setzten sich unlösliche Zellfragmente in einem Pellet ab, während der flüssige Überstand aus einer PeqGOLD-Phase und einer darüber liegenden Lipidphase bestand. Die zu isolierende RNA befand sich in der mittleren, der Phenol-Phase, welche für die weitere Aufreinigung vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Aufreinigung und Fällung der solubilisierten RNA erfolgte mittels der von Chomczynski und Sacchi 1987 beschriebenen Phenol-Chloroform-Fällung (Chomczynski and Sacchi, 1987). Durch Zugabe von 200 µl Chloroform zur RNA-haltigen Phenolphase wurden die Proben durch Vortexen kräftig gemischt und anschließend bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert, wobei die enthaltene RNA in die wässrige Phase übergang, wohingegen Proteine in der organischen Phenol-Chloroform-Phase verbleiben. Durch erneute Zentrifugation der Proben für 5 min bei 13.000 rpm konnte eine Trennung der

Phase erreicht werden. Die RNA-haltige wässrige Phase bildet hierbei die oberste Schicht aus, während sich die Protein-haltige organische Phase tiefer ansammelt. Die enthaltene DNA befindet sich hierbei als weißliche Intermediärschicht an der Phasengrenze. 500 µl der RNA-Phase wurden, ohne Verunreinigung durch eine der anderen beiden Phasen, abgenommen und zu Fällung der RNA mit 350 µl eiskaltem Isopropanol versetzt. Nach Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die gefällte RNA durch Zentrifugation (10 min bei 13.000 rpm) sedimentiert und das entstandene Pellet 2x mit jeweils 800 µl 75% Ethanol/DEPC-Wasser gereinigt. Hierzu wurde die Alkoholmischung, ohne ein Ablösen des Pellets zu verursachen, ins Reaktionsgefäß eingebracht und anschließend für 5 min bei 13.000rpm und 4 °C zentrifugiert bevor der Überstand vollständig abgenommen und verworfen wurde. Anschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur für ca. 15-30 min getrocknet und daraufhin in 35-50 µl DEPC-Wasser resuspendiert (Zelllysat 35 µl, Gewebelysat 50 µl). Um das Pellet vollständig zu lösen wurden die Reaktionsgefäße 10 min bei 56 °C inkubiert. Das verwendete DEPC-Wasser wurde zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, welches RNA-zerstörende Ribonukleasen (RNasen) inhibiert.

### 3.5.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Um die RNA-Konzentration der isolierten Proben zu bestimmen wurden diese mittels Nano-Photometer (Implen) bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260nm}$ ) vermessen, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Darüber hinaus erfolgte auch die Messung der optischen Dichte bei 280 nm ( $OD_{280nm}$ ), dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Der  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$ -Quotient ist dementsprechend ein Maß für die Verunreinigung der Proben mit Protein und sollte im Bereich von 1,8-2,0 liegen. Da eine  $OD_{260nm}$  von 1 dabei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht, kann die RNA-Konzentration direkt ermittelt werden.

### 3.5.5.3 DNase-Verdau

Da eine Kontamination der RNA-Proben mit genomischer DNA nicht vollständig ausgeschlossen werden kann und diese mit dem Ergebnis der qRT-PCR interferieren könnte, wurde vor der Umschreibung der mRNA in copyDNA (cDNA) ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden 20 µl der Proben mit 2 µl DNase und 2,5 µl entsprechendem 10x Taq-Puffer (s. Tab. 2.20) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert, um eventuell enthaltene genomische DNA zu degradieren. Die DNasen wurden im Anschluss durch 5-minütiges Erhitzen der Proben auf 80 °C inaktiviert.

Die Proben wurden im Anschluss durch Zugabe von 1x Taq-Puffer (10x Tag-Puffer 1:10 verdünnt) auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt und direkt in cDNA umgeschrieben oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

<b>DNase-Verdau</b>	
RNA in Nuklease-freiem H <sub>2</sub> O	20 µl
10xDNase Inkubationspuffer	2,5 µl
DNase	2 µl

**Tab. 3.5: DNase-Verdau Pipettieransatz**

### 3.5.5.4 Synthese von cDNA durch Transkription

Die cDNA wurde mit Hilfe des Iscript-cDNA Synthese Kitsystems (Biorad) durchgeführt. Hierzu wurden die RNA-Proben mittels der im Kit befindlichen reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben, welche dann in einem weiteren Schritt durch quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) quantifiziert werden konnte. Ein zusätzlicher Ansatz ohne das RT-Enzym (-RT) pro Probe diente bei der späteren qRT-PCR als Negativkontrolle und konnte etwaige Verunreinigungen mit genomischer DNA aufzeigen. Für die Umschreibung der cDNA wurde das nachstehende (Tab. 3.6) Pipettierschema verwendet.

<b>cDNA-Synthese</b>	<b>+RT</b>	<b>-RT</b>
5x iScript Mix	4 µl	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl	-
RNA (0,1 µg/µl)	5 µl	5 µl
DEPC-Wasser	10 µl	11 µl

**Tab. 3.6: cDNA-Synthese Pipettieransatz**

Die Generierung der cDNA erfolgte mit Hilfe eines Eppendorf Mastercyclers in mehreren Schritten, wobei alle für die Umschreibung benötigten Reagenzien, mit Ausnahme der reversen Transkriptase, welche gesondert zugegeben wurde, bereits im 5x Iscript-Mastermix enthalten waren. Das automatisierte Programm des Mastercyclers ermöglichte in einem ersten Schritt die Anlagerung der Primer (Annealing), für die Umschreibung der mRNA. Hierzu wurde über einen Zeitraum von 5 min eine Temperatur von 25 °C eingehalten. Um anschließend die Ausbildung des komplementären Stranges zu ermöglichen (Elongation) wurden die Proben für 30 min auf 42 °C erwärmt, bevor die reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 85 °C für 5 min inaktiviert wurde.

Die auf diese Weise generierte cDNA, auch Erststrang-DNA genannt, wurde abschließend durch Zugabe von 40 µl DEPC Wasser zu 20 µl Probe im Verhältnis 1:2 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.5.5.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Zur quantitativen Echtzeit-Bestimmung der zuvor generierten cDNA-Proben wurde der iQ™ SYBR green Supermix (Biorad) eingesetzt, welches neben den benötigten Puffersubstanzen auch dNTPs, die essentielle Taq-Polymerase sowie das DNA-Doppelstrang-bindende Fluorophor (SYBR green) enthält.

Der SYBR green Supermix wurde hierfür, wie im nachfolgenden Pipettierschema aufgeführt, wie vom Hersteller empfohlen mit Nuklease-freiem Wasser, sowie der synthetisierten cDNA und dem, für die jeweilige Analyse benötigten Primerpaar versetzt.

<b>qRT-PCR</b>	
SYBR-Green SuperMix	10 µl
Vorwärtsprimer [2 µM]	3 µl
Rückwärtsprimer [2 µM]	3 µl
cDNA	2 µl

**Tab. 3.7: qRT-PCR Pipettieransatz**

Geeignete Primersequenzen wurden mittels Primer3 Software identifiziert. Bei der Generierung der Sequenzen wurde insbesondere auf eine geeignete Schmelztemperatur, welche im Bereich von 55-65 °C liegen sollte, sowie die Größe des resultierenden PCR-Produktes geachtet. Um eine optimale Replikation während der einzelnen Zyklen zu erreichen sollte dieses eine Größe von 80-120 Basenpaaren (bp) aufweisen und auch die Größe der Primer selbst sollte im Bereich von 20-25 bp liegen, sowie zu mindestens 55 % aus Guanin- und Cytosinbasen bestehen.

Die qRT-PCR wurde mit Hilfe des Opticon-Cycler Systems durchgeführt und anschließend mittels Option-Monitor Software ausgewertet. Das automatisierte Programm durchlief nach einer initialen Denaturierung bei 98 °C für 5 min insgesamt 40 Replikations-Zyklen, welche folgendermaßen aufgebaut waren:

	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min
Primerhybridisierung	58 °C	5 s
Elongation	72 °C	15 s
Wdh. von Denaturierung (10 s), Primerhybridisierung und Elongation für 39 weitere Zyklen		
Terminale Elongation	72 °C	5 min
Kühlung	4 °C	max. 1 Std.

**Tab. 3.8: qRT-PCR Ablauf**

Im Anschluss wurde eine Schmelzkurve der generierten PCR-Produkte erstellt, welche genaueren Aufschluss über die Identität der entstandenen DNA-Fragmente geben konnte. Zur Quantifizierung der im Reaktionsansatz enthaltenen cDNA wurde nach jedem Zyklus der qRT-PCR die Stärke des Fluoreszenz-Signals detektiert und aufgezeichnet. Der Cyanin-Farbstoff SYBR green bindet hochaffin an doppelsträngige DNA (dsDNA), wobei der DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex zu einer starken Emission bei einer Wellenlänge von 521 nm führt. Da es im Zuge der DNA-Replikation bei jedem Zyklus zu einer Verdoppelung des enthaltenen PCR-Produktes kommt, verläuft die aufgenommene Fluoreszenz-Kurve exponentiell. Auf Grund des Verbrauches an dNTPs und anderer Edukte, handelt es sich jedoch auch um einen sättigbaren Prozess, so dass die Darstellung der Fluoreszenzintensität über der Zyklenzahl in einem sigmoidalen Kurvenverlauf resultiert. Der Schwellenwert, ab welchem die Zunahme des Fluoreszenzsignales exponentiell verläuft, sich dementsprechend signifikant von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet, wird als Cycle Treshold (Ct) bezeichnet. Für jede Probe wird der Ct-Wert sowohl für das zu untersuchende Gen, als auch ein sogenanntes Referenzgen (*housekeeper gene*), welches der Normierung dient, ermittelt. Das Referenzgen sollte sich hierbei insbesondere dadurch auszeichnen, dass es unabhängig von äußeren Einflussfaktoren eine konstante Expression aufweist.

Die Quantifizierung der zu untersuchenden RNA erfolgte semiquantitativ gegen  $\beta$ -Aktin als Referenzgen und wurde mittels der vergleichenden  $2^{-\Delta Ct}$ -Methode ermittelt.  $\Delta Ct$  berechnet sich hierbei folgendermaßen:

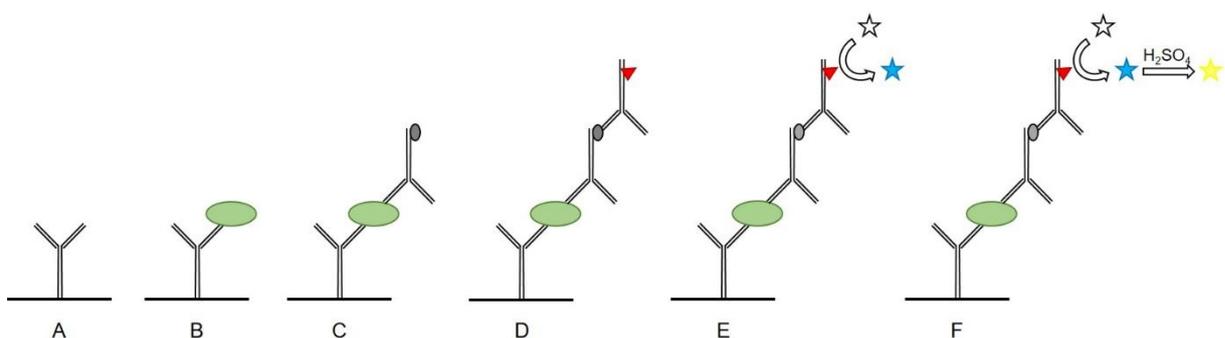
$$\Delta Ct = 2^{-(Ct(\text{Zielstruktur}) - Ct(\text{Referenz}))}$$

Um die entstandene Fragmentgröße zu verifizieren, sowie um Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen, wurden die Proben zusätzlich mittels Gelelektrophorese in einem 3 %-igen Agarosegel analysiert (s. Kapitel 2.4.1).

### 3.5.6 Serumanalytik mittels ELISA

Unter *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISAs) werden eine ganze Reihe von Antikörper-basierten Nachweismethoden, wie beispielsweise der Radioimmunoassay (RIA) oder der enzymatische Immunoabsorptionsassay (EIA), zusammengefasst. Ihnen allen ist gemein, dass sie einen Nachweis von Proteinen, Toxinen, Hormonen oder auch Viren mit Hilfe enzymatischer Farbreaktionen ermöglichen.

Beim sogenannten Sandwich-ELISA wird hierbei ein, gegen ein bestimmtes Zielepitop gerichteter, Erstantikörper (Primärantikörper) direkt auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht und adsorptiv an diese gebunden. In einem zweiten Schritt wird die zu analysierende Probe zugegeben und durch eine entsprechende Inkubationszeit deren Bindung an den Primärantikörper, über eine Antigen-Antikörper-Bindung, ermöglicht. In weiteren Schritten wird im Anschluss ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper zugegeben, welcher in der Lage ist aus einem, in einem weiteren Schritt folgenden, Substrat ein detektierbares Chromophor zu erzeugen. Die Bildung des Farbreagenzes kann in der Regel durch Zugabe einer Stopplösung abgebrochen werden, indem diese meist sehr stark sauren Reagenzien das entsprechende Enzym durch Absenken des pH-Wertes inaktivieren. Außerdem wird durch die Zugabe der Säure und die damit verbundene Protonierung das Absorptionsmaximum des Chromophors auf 450 nm verschoben (bathochromer Effekt). Die relative Konzentration des entstandenen Farbstoffes kann im Folgenden mithilfe eines (automatisierten) hochempfindlichen Photometers gemessen werden. Um eine absolute Antigen-Konzentration der Proben ermitteln zu können werden diese im Vergleich zu einer Standardreihe mit bekannten Konzentrationen ausgewertet. Bei besonders geringen Konzentrationen des zu untersuchenden Proteins kann in einem zusätzlichen Schritt ein Verstärker-Molekül eingebracht werden, welches beispielsweise durch zusätzliche Vernetzung oder die Schaffung vermehrter Bindestellen eine gesteigerte Enzymreaktion und damit ein stärkeres Farbsignal bedingen kann.



**Abb. 3.9: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines ELISA-Assays**

**(A)** Mit Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte. **(B)** Bindung des Analyten (grün) nach Zugabe der Proben. **(C)** Optionale Zugabe von Antikörpern, welche die Quervernetzung steigern um eine Signalverstärkung zu erreichen. **(D)** Zugabe des Enzym-gekoppelten (rotes Dreieck) Antikörpers. **(E)** Zugabe des Substrates (Stern) führt zu blauer Färbung. **(F)** Umschlag der Färbung zu gelb nach Zugabe einer stark Sauren Lösung (hier Schwefelsäure).

Als Reporterenzyme werden meist die Alkalische Phosphatase (AP), oder die Meerrettichperoxidase (HRP) eingesetzt, welche beispielsweise Tetramethylbenzidin (TMB)

durch Oxidation zu Tetramethylbenzidin-Diimin umsetzt, das sein Absorptionsmaximum bei 650 nm hat, und somit eine blaue Farbe aufweist. Durch Zugabe einer stark sauren Stopplösung verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 450 nm und die Lösung ist dementsprechend gelb. Weitere Enzyme wie die Glucose-Oxidase (GOD) werden ebenfalls eingesetzt, finden jedoch kaum Verwendung.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ELISA-Versuche zur Untersuchung von Leptin (Millipore, USA), Adiponektin (Millipore, USA) und IL-6 (Millipore, USA) basieren auf der Avidin/Biotin-HRP-gekoppelten Farbreaktion mit TMB und wurden wie vom Hersteller angewiesen durchgeführt. Lediglich bei der Bestimmung von IL-6 wurde die Inkubationszeit des Substrates auf 30 min erhöht, um eine detektierbare Färbung zu erhalten. Die für die Untersuchungen benötigten Serum-Proben wurden wie unter Kapitel 3.4.5.1 beschrieben gewonnen und in Duplets aufgetragen und analysiert. Alle Proben wurden mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Photometers SUNRISE (Tecan) bei 450 nm sowie bei 570 nm (Nullwert) vermessen und anschließend mittels Magellan 7 Software analysiert und ausgewertet. Zur Quantifizierung der Proben wurde die Standardkurve hierbei mittels 5-Punkt Modell nach Marquardt quantifiziert.

### **3.5.6.1 Insulin-ELISA aus Plasma-Proben nach i.p. GTT**

Die wie beschrieben (s. Kapitel 3.4.5) gewonnenen, heparinisierten und mit Aprotinin versetzten Blutproben wurden für 15 min bei 4000x g zentrifugiert um das Plasma von den festen Bestandteilen des Vollblutes abzutrennen. Der klare Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung mittels ELISA-Analyse bei -80 °C gelagert.

Zur Untersuchung der Insulin-Konzentration wurde ein hochsensitiver Insulin-ELISA (Merckodia, Schweden) durchgeführt. Abweichend von den Anweisungen des Herstellers konnten auf Grund des geringen Probenvolumens jedoch nur 15 µl Plasma pro Tier und Zeitpunkt für Einfachbestimmungen aufgetragen werden. Auch der Standard wurde aus diesem Grund nur mit 15 µl des jeweiligen Calibrators hergestellt.

Alle Proben wurden mittels des automatisierten Mikrotiterplatten-Photometers SUNRISE (Tecan) bei 450 nm sowie bei 570 nm (Nullwert) vermessen und anschließend mittels polynomischer Regression in Microsoft Excel 2013 analysiert und ausgewertet

### **3.5.7 Proteinanalytik mittels Western Blot**

Bei der Proteinanalytik mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot können Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt und anschließend mittels immunologischer Detektion identifiziert und quantifiziert werden.

Natriumdodecylsulfat (SDS) und  $\beta$ -Mercaptoethanol dienen hierbei als Denaturierungs-Agenzien, wobei es darüber hinaus zur Bildung von Komplexen aus SDS und den zu analysierenden Proteinen kommt, welche eine direkte Linearität zwischen Masse der Proteine und Ladung des Komplexes aufweisen. Diese Komplexe werden im SDS-Polyacrylamid-Gel nun anhand ihrer Ladung und Größe aufgetrennt.

Beim Western Blot selbst, werden die aufgetrennten Proteine durch Anlegen eines Stromes mittels Elektrophorese auf eine hydrophobe Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) übertragen.

Die Membran kann im Folgenden mit spezifischen Antikörpern inkubiert werden, was eine Identifizierung der zuvor aufgetrennten Proteine und darüber hinaus auch eine Quantifizierung der untersuchten Proteine erlaubt.

### **3.5.7.1 Proteinisolation**

Die wie beschrieben entnommenen, und bei -80 °C gelagerten Gewebeproben (s. Kapitel 3.4.5) wurden auf Eis für ca. 10 min angetaut und anschließend mit 350 µl (BAT) bis 450 µl (WAT) Lysepuffer (s. Kapitel 2.4.7) versetzt. Das hierin enthaltene SDS dient der Denaturierung von Proteinen, indem es die Ausbildung von Quartärstrukturen verhindert. Das im Lysepuffer ebenfalls enthaltene β-Mercaptoethanol unterstützt diese denaturierende Wirkung, indem es Disulfidbrücken in der Proteinstruktur aufbricht und zu Thiolen reduziert. PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) verhindert den Abbau der Proteine durch Inhibierung von Serin-Proteasen indem es das aktive Serin bindet. Mit Hilfe eines Gewebehomogenisators (s. Kapitel 2.1) wurden die Proben 45-60 Sekunden vollständig aufgeschlossen, wobei eine Schaumbildung möglichst vermieden werden sollte. Die Gewebelysate wurden im Anschluss für 5 min bei 50x g zentrifugiert, um die freigesetzte Fettphase abzutrennen. Der Fett-Überstand wurde abgenommen und das verbleibende Homogenisat erneut für 1 min bei 210x g zentrifugiert, um mögliche Gewebe- oder Zellreste abzutrennen.

Zur vollständigen Denaturierung der Proteinproben wurden diese 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend mit Hilfe eines Vortexers homogen vermischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 min wurden die im Überstand befindlichen Proteine abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinproben wurden nun direkt weiter verarbeitet oder bis zur weiteren Nutzung bei -80 °C gelagert.

### **3.5.7.2 Protein-Quantifizierung nach Bradford**

Die Quantifizierung der Proteine in den gewonnenen Lysaten erfolgte mit Hilfe der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Diese bereits 1976 Entwickelte Methode stellt auf Grund ihrer hohen Sensitivität in der Biochemie noch immer eine wichtige Methode zur photometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen dar. Dabei macht man sich die Komplexierung von Proteinen durch Coomassie-Brilliant-Blau G-250, und dessen Farbänderung zu nutze. Während der Triphenylmethan-Farbstoff in ungebundener Form ein Absorptionsmaximum bei 470 nm aufweist und somit eine rote Färbung hat, kommt es in saurer Lösung zur Ausbildung von Komplexen mit unpolaren und kationischen Seitenketten von Proteinen. Hierdurch wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten Sulfonatform stabilisiert, wodurch sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt. Diese Absorption kann mittels Photometer erfasst werden und steht hierbei in direktem, nicht-linearem Zusammenhang mit der Konzentration an in der Lösung enthaltenem Protein. Die Quantifizierung der Proben erfolgte gegen eine, mit bovinem Serumalbumin (BSA) erzeugten, Eichkurve.

Zur Messung von BAT-Proben wurden 97 µl MilliQ-Wasser in eine Einmalküvette vorgelegt. Anschließend wurden 3 µl Proteinlysate hinzugegeben. Für weißes Fettgewebe wurde eine Mischung aus 95 µl Wasser und 5 µl Proteinlösung erzeugt. Die verdünnten Proteinproben

wurden mit jeweils 1 ml Bradford-Lösung versetzt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Als Nullabgleich diente eine reine Wasserprobe, welche ebenfalls mit Bradford-Reagenz versetzt und auf gleiche Weise inkubiert wurde. Da die Farbreaktion zeitabhängig verläuft, wurden die Proben nach exakt 5 min bei 595 nm dreimalig vermessen.

Um im weiteren Verlauf gleichmäßige Mengen an Protein auf die Acrylamid-Gele aufbringen zu können, wurden alle zu vergleichenden Proben mit MilliQ-Wasser auf eine gemeinsame Konzentration eingestellt. Hierbei diente die Probe mit der geringsten Proteinkonzentration als Referenzwert. Anschließend wurden die Proteinverdünnungen mit 4x konzentriertem Lämmli verdünnt. Das im Lämmli-Puffer enthaltene Dithiothreitol (DTT) reduziert Disulfidbrücken der Proteine, wodurch es deren Denaturierung bedingt. Darüber hinaus kommt es durch Zugabe von DTT auch zu einer Konservierung der Proteine, da auch die Oxidation der Thiolgruppen mit Sauerstoff vermieden wird. Das zusätzlich im Puffer enthaltene Bromphenolblau ermöglicht eine Visualisierung der Protein-Lauffront während der später erfolgenden SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese.

### **3.5.7.3 SDS-Gelelektrophorese**

Die von Ulrich Laemmli entwickelte und erstmals 1970 beschriebene SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), ist eine wichtige Methode zur diskontinuierlichen Auftrennung von Stoffgemischen, in diesem Fall Proteinmischungen, im elektrischen Feld anhand ihrer Größe und SDS-bedingten Ladung. Kleine Proteine durchwandern das dieses molekulare Sieb aus porösen Acrylamid-Verbindungen hierbei leichter und schneller als größere Fragmente. Die Diskontinuität bezieht sich hierbei auf die verschiedenen pH-Werte von Sammel- und Trenngel, sowie deren unterschiedliche Porengröße.

Die Gele wurden durch radikalische Polymerisation in entsprechenden Gelgieß-Apparaturen hergestellt. Diese bestehen aus zwei vertikal ausgerichteten Glasplatten, welche mittels Abstandhalter an einer der Platten, einen Spalt von 0,75 cm aufweisen und in einer geeigneten Halteapparatur eingespannt sind. Die Gele selbst bestehen aus Acrylamid als Gelbildner sowie Bisacrylamid als Quervernetzer, welche in entsprechendem TRIS-Puffer und destilliertem, deionisiertem Wasser dispergiert wurden. Das im Acrylamid-Gel enthaltene SDS maskiert als anionisches Tensid die Eigenladung der Proteine und sorgt stattdessen für eine, ausschließlich von der Molekülmasse und SDS-abhängigen Ladung bestimmte, Auftrennung der Proteingemische in einer Art molekularem Sieb. TEMED (Tetramethylethyldiamin) dient als Katalysator, wohingegen das enthaltene APS (Ammoniumpersulfat) den Radikalstarter darstellt. Die Zugabe von TEMED und APS startet dementsprechend die Polymerisation der Gele, so dass nach deren Zugabe ein zügiges Ausgießen Gellösung in die zuvor vorbereitete Gel-Apparatur nötig war. Das ausgegossene Trenngel (12,5%) verblieb bis zum vollständigen Aushärten für 60-90 Minuten bei Raumtemperatur. Um einen blasenfreien und ebenen Meniskus zu erhalten wurde das Gel hierfür mit Isopropanol überschichtet. Das Sammelgel (5 %) wurde nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Trenngels und Abnahme der Isopropanol-Phase aufpipettiert und sofort mit einem Kamm versehen. Dieser sorgt für Aussparungen im entstehenden Sammelgel, in welche im Folgenden die Proteinproben eingebracht werden konnten. Das Sammelgel diente hierbei zur Anreicherung der Proteine an einer definierten Startfront (Übergang zum Trenngel). Die Gele wurden für die in dieser Arbeit

durchgeführten Untersuchungen maximal 24 Stunden vor Durchführung der SDS-PAGE hergestellt und in einer feuchten Umgebung bei 4 °C gelagert, um ein Austrocknen zu verhindern.

Jeweils 2 Gele, oder 1 Gel und ein abdichtender Platzhalter wurden vertikal in ein Laufmodul eingespannt und dieses anschließend in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1x Elphor-Puffer (s. Kapitel 2.4.7) aufgefüllt. Die eingestellten Protein-Lämmli-Mischungen wurden erneut für 5 min bei 95 °C erhitzt um Wasserstoffbrückenbindungen der Proteine aufzuschließen und dadurch ein lineares Vorliegen der Protein-Primärstruktur sicherzustellen. Im Anschluss wurden 25-30 µl der Proben mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Taschen des SDS-Acrylamid-Sammelgeles eingebracht. Anschließend wurde für 10-15 min eine Spannung von 80 mV angelegt, bis die Proteine an der Startfront angereichert waren. Anschließend wurde die Spannung auf 120 mV erhöht, wodurch eine Wanderung der Proteine durch das Acrylamid-Trenngel hin zur Anode erfolgen konnte. Ein ebenfalls aufgetragener Marker mit definierten Proteingrößen im Bereich von 10-170 kDa ermöglichte eine Echtzeit-Kontrolle des Elektrophoreseverlaufes.

#### **3.5.7.4 Western Blot**

Mit Hilfe eines Western Blots können Proteine aus einem Elektrophoresegel mittels Kapillarkräften, Diffusion oder Elektrophorese auf eine Trägermembran übertragen werden. Dies ermöglicht eine Konservierung der Proteine für anschließende Identitäts- und Aktivitätsnachweise.

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines halbtrockenen Blotverfahrens (semi-dry Blot) auf eine hydrophobe PVDF-Membran transferiert. Hierzu wurde das Acrylamid-Gel auf die Membran aufgebracht und beide zwischen Filterpapiere eingebracht, welche mit verschiedenen Puffern befeuchtet sind. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes, welches senkrecht zum Acrylamid-Gel ausgerichtet ist, wandern die negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe in Richtung der Anode und gelangen so auf die PVDF-Membran. Um dies zu erreichen, wurde eine Anodenplatte mit demineralisiertem Wasser befeuchtet und anschließend mit 3 Blotting-Filterpapieren belegt, welche zuvor in Anodenpuffer 1 eingeweicht wurden. Darauf wurden zwei weitere, in Anodenpuffer 2 eingetauchte Filterpapierlagen, gefolgt von einer PVDF-Membran aufgelegt, welche zuvor kurz in Ethanol aktiviert und anschließend in Kathodenpuffer inkubiert wurde. Das Polyacrylamid-Gel wurde im Anschluss vorsichtig auf die Membran transferiert und anschließend mit 5 Filterpapieren, welche mit Kathodenpuffer getränkt waren, bedeckt. Den Abschluss bildete eine ebenfalls angefeuchtete Kathodenplatte, welche mittels einer gefüllten Glasflasche beschwert und an einen Stromgeber angeschlossen wurde.

Ein elektrisches Feld wurde durch Anlegen eines Stromes erzeugt. Der 60-minütige Elektrotransfer bei 60 mA (pro Gel), gefolgt von 15 min bei 90 mV (pro Gel) sorgte für einen Übergang der Proteine aus dem Acrylamid-Gel auf die PVDF-Membran, wo sie auf Grund hydrophober Wechselwirkungen adhärirt werden.

Nach vorsichtiger Entnahme der Protein-haltigen PVDF-Membran aus der Blotting-Apparatur erfolgte eine einstündige Inkubation in 5 %-iger Milchpulverlösung (in TBS-T) (s. Kapitel 2.4.7) um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Im Folgenden wurde die Membran 3x 10 min in

TBS-T gewaschen und anschließend mittels Rollator über Nacht bei 4 °C in Primärantikörperlösung inkubiert. Dies ermöglichte die Bindung der spezifischen Antikörper gegen Epitope der zu untersuchenden Proteine.

Am nächsten Tag wurde die Membran erneut 3x für 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend in einer entsprechenden Sekundärantikörperlösung inkubiert. Diese enthielt neben TBS-T als Puffer einen Antikörper, welcher sich gegen den zuvor aufgetragenen Primärantikörper richtet und welcher an ein detektierbares Fluorophor gekoppelt ist. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Auf Grund der Photolabilität des Fluoreszenzmarkers wurde diese, wie auch die nachfolgenden Waschschriffe im Dunkeln durchgeführt. Nach ausreichendem Einwirken der Sekundärantikörperlösung wurde die Membran 5x 5 min in TBS-T gewaschen und anschließend für mindestens 30 min zwischen Füssel-freien Präzisionswischtüchern im Dunkeln getrocknet.

### **3.5.7.5 Detektion der Proteine mittels EttanDIGE**

Zur Detektion der zuvor immunmarkierten Proteine (s. Kapitel 3.5.7.4) wurde das Ettan DIGE System mit entsprechender Software verwendet. Dieses ist in der Lage, die Antikörpergekoppelten Fluorophore durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zu aktivieren und deren Signal zu erfassen.

Eine Quantifizierung der auf diese Weise detektierten Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der ImageQuant Software. Alle zu untersuchenden Proteinbanden wurden hierbei auf das GAPDH-Signal (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) der jeweiligen Probe normiert, welche als Ladungskontrolle diente.

## **3.5.8 Primäre Präadipozytenkulturen aus weißen und braunen Fettzelldepots**

Um das Wachstum und die Reifung von Fettvorläuferzellen in Abhängigkeit von der BK-Kanal Expression genauer untersuchen zu können, wurden Präadipozyten-Kulturen verschiedener weißer Fettzelldepots aus 10 Wochen alten, männlichen BK<sup>+/+</sup>- und BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen angelegt. Zur Kultivierung brauner Fettvorläuferzellen wurden männliche und weibliche Tiere im Alter von 0-2 Tagen (p0-p2) verwendet. Diese Primärkulturen wurden durch Zugabe geeigneter Medien und Supplementierung mit Reifungs- und Wachstumsfaktoren zu reifen Adipozyten differenziert und final zur Quantifizierung der eingelagerten Triglyceride mit Ölrot angefärbt.

Die im Rahmen dieser Versuche durchgeführte Isolation, Kultivierung und Quantifizierung der Kulturen wurde im Rahmen dieser Arbeit, in Anlehnung an D. Hausmann (Hausman et al., 2001), etabliert.

### **3.5.8.1 Organentnahme zur Generierung von primären Präadipozytenkulturen**

Zur Entnahme von Leistenfett (iWAT) wurde die Bauchdecke von mittels CO<sub>2</sub> getöteten Mäusen (s. Kapitel 3.4.5) durch einen ca. 1 cm langen Schnitt unterhalb des Rippenbogens eröffnet. Es erfolgten transversale Schnitte beidseits entlang der Rippen sowie ein sagittaler Schnitt bis zur Schwanzwurzel um das gesamte Fell am Bauch zur Seite klappen zu können und so ein Eintragen von Fell in die Bauchhöhle zu verhindern. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden die Tiere zuvor außerdem mit ausreichend 80% Ethanol besprüht. Die

subkutanen Leistenfettdepots wurde mit einer Irisschere (s. Kapitel 2.3.1) vorsichtig entnommen, im Fettgewebe lokalisierte Lymphknoten entfernt und das Gewebe zur sofortigen Weiterverwendung in 37 °C warmes DMEM/Ham's F12-Medium (DMEM-F12) eingebracht. Die auf der linken, sowie der rechten Körperseite der Tiere befindlichen Fettdepots wurden hierbei zusammengeführt.

Zu Entnahme von epididymalem Fett (eWAT) wurde nach der Eröffnung der Haut auch die Bauchhöhle durch einen sagittalen Schnitt vom Rippenbogen bis circa 1 cm oberhalb der Schwanzwurzel hin aufgeschnitten. Das um die Hoden und Nebenhoden lokalisierte eWAT wurde mit Hilfe einer Irisschere (s. Kapitel 2.3.1) vorsichtig vom umgebenden Gewebe abgetrennt und bis zur direkt anschließenden Isolation der Präadipozyten in DMEM-F12 (37 °C) eingebracht. Pro Genotyp wurden hierbei die Fettdepots von 2 Tieren vereinigt, um eine ausreichende Anzahl an Fettvorläuferzellen zu gewinnen.

Zur Generierung von Primärkulturen aus braunem Fettgewebe (BAT), wurden neugeborene Wildtyp-Mäuse im Alter von 0-2 Tagen (p0-p2) durch Dekapitation getötet. Das sehr junge Alter der Tiere spielt hierbei eine essentielle Rolle, da die Differenzierungsfähigkeit brauner Fettvorläuferzellen, der mesenchymalen Stammzellen (MSC), bereits wenige Tage nach der Geburt der Tiere stark rückläufig ist. Die zwischen den Schulterblättern befindlichen BAT-Depots wurden mit Hilfe einer Irisschere unter einer Stereolupe (s. Kapitel 2.1) entnommen. Hierzu wurde, ausgehend von der Dekapitationskante, die Haut der Tiere entlang der Wirbelsäule zur Schwanzwurzel hin ca. 1 cm eröffnet um die Schulterblätter freizulegen. Das interscapulare braune Fettgewebe wurde vorsichtig vom umgebenden Muskelgewebe und gegebenenfalls von weißem Fettgewebe abgetrennt und in 37 °C warmem DMEM-F12 gesammelt. Da BK-KO-Tiere weitgehend infertil sind war eine homozygote Verpaarung zur Generierung von reinen BK-KO Würfen zur Anlage von BK<sup>L1/L1</sup>-Primärkulturen nicht möglich. Darüber hinaus wurden die Fettdepots von 5-9 männlichen und weiblichen Tieren aus einem Wurf zusammen geführt, um bei der nachfolgenden Isolation der Präadipozyten eine ausreichende Anzahl an Zellen zu erhalten. Auch über heterozygote Verpaarungen können somit nicht ausreichend Jungtiere generiert werden, um reine BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen anzulegen, da lediglich jeweils ein Anteil von ca. 25% der Jungtiere einen homozygoten KO- oder WT-Genotyp aufweist.

### 3.5.8.2 Isolation der Präadipozyten

Die entnommenen Fettdepots wurden unter einer Sterilwerkbank mit laminarem Luftstrom (s. Kapitel 2.1) in ein konisches Zentrifugenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 15 ml überführt und für ca. 1-2 min mit Hilfe einer Irisschere stark zerkleinert. Anschließend wurde eine adäquate Menge zuvor hergestellter und steril-filtrierter, 37 °C warmer HEPES-Collagenase I-Lösung zugegeben. Pro Tier wurden bei eWAT und iWAT-Kulturen 2,5 ml Verdau-Puffer (s. Kapitel 2.4.8) zugegeben. Bei vereinten Geweben aus mehreren Tieren, wurde entsprechend mehr HEPES-gepufferte Collagenase I-Lösung eingesetzt. Bei der Isolation von Präadipozyten aus BAT wurden 2,5 ml (5-6 Tiere) oder 5 ml (7-9 Tiere) an Verdauung eingesetzt.

Die Gewebe-Collagenase-Mischungen wurden für 50-60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, bis alle größeren Gewebefragmente verdaut waren und eine trübe Suspension

vorlag. Während des Verdauvorganges wurden die Zentrifugenröhrchen alle 5 min durch vorsichtiges invertieren durchmischt. Nach ausreichendem Aufbruch der Gewebeverbände und Auseinanderzersetzung der Zellen wurde der Verdau durch Zugabe von DMEM-F12 gestoppt. Das zugesetzte Volumen entsprach hierbei jeweils der bereits im Reaktionsgefäß vorliegenden Menge an Zellhomogenisat.

Um eine Kontamination der Zellgemische zu verhindern wurden alle weiteren Isolations- und Aufreinigungsschritte bis einschließlich dem Ausbringen der Zellen unter einer Sterilwerkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Stripette in eine 10 ml Spritze mit nachgeschaltetem Filter mit einer Maschenweite von 180  $\mu\text{m}$  überführt und filtriert. Auf diese Weise sollten eventuell in der Suspension befindliche, nicht ausreichend verdaute Gewebestücke abgetrennt werden. Das aufgefangene Filtrate wurde mit DMEM-F12 auf 15 ml aufgefüllt und 5 min bei 50x g zentrifugiert um einerseits Zellfragmente zerstörter Zellen zu sedimentieren und darüber hinaus ausgereifte Fettzellen als aufschwimmende Phase abzutrennen. Die zwischen dem Pellet und der aufschwimmenden Fettschicht befindliche Zellphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein steriles 15 ml fassendes Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 10 min bei 200x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 2 ml abgenommen und verworfen, wobei das Pellet möglichst nicht aufgebrochen werden sollte. Im Folgenden wurde das Volumen durch Zugabe von DMEM-F12 mit 10% FCS (fetales Kälberserum) auf 5 ml aufgefüllt und das Pellet durch vorsichtiges Klopfen und sanftes Aufschütteln resuspendiert. Die entstandene Suspension wurde erneut durch eine 10 ml Spritze mit aufgesetztem Filter filtriert. Die hierbei gewählte Maschenweite von 20  $\mu\text{m}$  ermöglicht die Aufspaltung oder Abtrennung von Zellagglomeraten. Im Folgenden wurden die Zellen erneut durch 5 minütige Zentrifugation bei 200x g sedimentiert und der Überstand bis auf 0,5 ml abgenommen und verworfen. Präadipozyten aus weißen Fettzelldepots wurden im Anschluss mit DMEM-F12 mit 10% FCS auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt und wie zuvor beschrieben resuspendiert. Fettvorläuferzellen aus braunem Fettgewebe wurden vor ihrer Resuspendierung mit BAT-MS-CM auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt.

Anschließend wurden die Zellsuspensionen nochmals gut vermischt und sofort jeweils 10  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in eine C-Chip Einmal-Zählkammer überführt, welche auf der von Neubauer entwickelten Methode beruht. Die enthaltenen Zellen in vier ausgewählten Quadranten wurden dann unter einem Lichtmikroskop ausgezählt um die in der Suspension enthaltene Zellzahl zu ermitteln. Hierzu wurde der Mittelwert der in den 4 Quadranten ermittelten Zellzahlen gebildet, welcher der Anzahl an Zellen in 0,1  $\mu\text{l}$  Zellsuspension entspricht. Die gewonnenen und quantifizierten Zellen wurden anschließend in 6- oder 12-Lochplatten ausgebracht. Hierzu wurde das entsprechend benötigte Volumen an Medium vorgelegt und im Anschluss die berechnete Menge an Zellsuspension zugegeben. Die gewünschte Zelldichte für eWAT betrug hierbei 50.000 Zellen pro  $\text{cm}^2$ , während iWAT mit einer Zelldichte von 20.000 Zellen/ $\text{cm}^2$  ausgebracht wurden. Beide weißen Fettzellkulturen wurden in DMEM-F12 mit 10% FCS ausplattiert. Zur Generierung von BAT-Präadipozyten-Kulturen wurden die Zellen mit einer Dichte von 57.000 Zellen/ $\text{cm}^2$  in BAT-MS-CM ausgebracht. Für 6-Lochplatten wurde ein Gesamtvolumen von 2,5 ml verwendet pro Reaktionsreservoir, während in 12-Lochplatten 1 ml eingesetzt wurde.

### 3.5.8.3 Kultivierung der Vorläuferzellen und Reifung zu Fettzellen

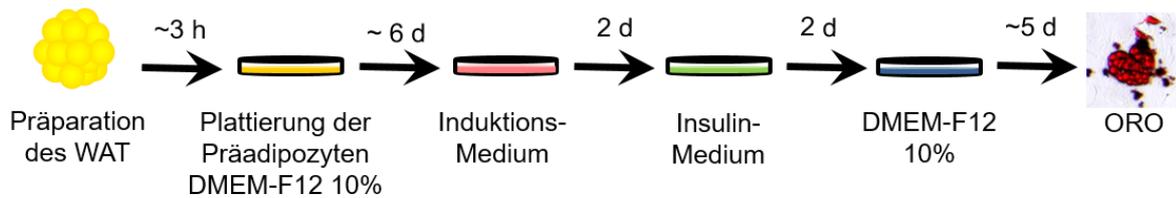
#### iWAT/eWAT

Die Kultivierung der ausgebrachten weißen Fettvorläuferzellen (Tag 0) erfolgte über einen Zeitraum von 13-15 Tagen und beinhaltete eine gezielte Induktion der Fettzellreifung.

48 Stunden nach Ausbringen der Zellen (Tag 2) wurde das Plattier-Medium durch DMEM-F12 mit 5% FCS ersetzt, welches nach weiteren 48 Stunden (Tag 4) erneut gewechselt wurde. Hierbei wurde das Medium jeweils komplett abgenommen und im Anschluss durch frisches Medium ersetzt. Nach Erreichen einer Zelldichte von 90-100%, was in der Regel an Tag 4-5 erreicht wurde, erfolgte die Induktion der Fettzellreifung durch Substitution des bisherigen Mediums durch ein Induktionsmedium (s. Kapitel 2.4.8). Das in diesem Medium enthaltene Insulin (Endkonzentration 170 nM) stellt hierbei einen wichtigen Wachstumsfaktor dar, und unterstützt darüber hinaus als anaboles Hormon die Aufnahme von Glucose, Lipiden und Aminosäuren in die Zellen. Darüber hinaus wird die Induktion der Fettzellreifung durch Zugabe von Dexamethason (Endkonzentration 1 µM) verbessert, welches über Stimulation den Glucocorticoid-Rezeptor-Signalweg pro-adipogen wirkt. Auch die Supplementierung des Mediums mit Isobutylmethylxanthin (IBMX) (Endkonzentration 500 µM) führt zu einer Steigerung der Reifung von Fettvorläuferzellen, da es durch Blockade von cAMP-abbauenden Phosphodiesterasen (PDE) die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht und somit die cAMP-abhängige Proteinkinase moduliert. Im Induktionsmedium enthaltene Indomethacin (Endkonzentration 30 µM) hat, möglicherweise über Arachidonsäure-Effekte, einen positiven Einfluss auf die Reifung von Fettvorläuferzellen, wobei die genauen zu Grunde liegenden Prozesse bislang unklar sind. Auch eine COX-unabhängige Wirkung auf die Fettzellreifung durch Erhöhung von c/EBPβ (*CCAAT-enhancer-binding protein*) und PPARγ2.

Für die Differenzierung von iWAT-Präadipozyten wurden dem Induktionsmedium, mit Rosiglitazon und Triiodthyronin (T3), zwei weitere Agenzien zugesetzt. Auch Rosiglitazon (Endkonzentration 2,5 µM) hat, als PPARγ-Agonist, einen großen Einfluss auf die Insulinsensitivität von Zellen und beschleunigen darüber hinaus die Differenzierung von Präadipozyten *in vitro*. Triiodthyronin (T3) (Endkonzentration 1 nM) ist in der Lage über Bindung an den Thyroid-Rezeptor α1 (Tra1) in Fettzellen, die Adipogenese zu steigern.

Nach 48 Stunden wird das Induktionsmedium sowohl bei iWAT als auch bei eWAT-Kulturen durch ein Insulinhaltiges Medium (s. Kapitel 2.4.8) ersetzt. Nach 48-stündiger Inkubation der Zellen in Insulin-haltigem Medium erfolgt ein Austausch gegen ein Erhaltungsmedium, welches aus DMEM-F12 mit 10% FCS besteht und alle 48 Stunden gewechselt werden muss. Da Lipid-gefüllte Adipozyten sehr empfindlich sind und bei Kontakt mit der Umgebungsluft leicht zerplatzen, wurde nach Induktion der Fettzellreifung das Medium nicht mehr komplett abgezogen. Stattdessen wurden 0,9 ml (12-Lochplatte) oder 2,0 ml (6-Lochplatte) des alten Mediums abgenommen, die Zellen mit demselben Volumen an frischem Medium „gewaschen“, bevor das genannte Volumen erneut abgenommen und entsprechend durch frisches Medium ersetzt wurde. An Tag 13-15 waren die Zellen in der Regel vollständig ausdifferenziert und wurden entweder mit Ölrot angefärbt (s. Kapitel 3.5.8.4) oder für die Isolation von RNA (s. Kapitel 3.5.5) herangezogen.



**Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Kultivierung weißer Präadipozyten**

Isolation der Präadipozyten aus weißen Fettzelldepots (WAT) und anschließendes Ausbringen in DMEM-F12 mit 10 % fetalem Kälberserum. Nach etwa 6 Tagen (6 d) und Erreichen der Konfluenz wird die Adipogenese durch Zugabe von geeignetem Induktions-Medium stimuliert. Nach weiteren 2 Tagen (2 d) erfolgte der Austausch gegen Insulin-haltiges Medium, vor erneuter Umstellung auf Erhaltungsmedium (DMEM-F12 10 %) für weitere 5 Tage (5 d). Finale Ölrotfärbung (ORO). Weitere Informationen im Text.

Um cGMP-Effekte auf die Fettzellreifung *in vitro* in Abhängigkeit von der BK-Kanal-Expression zu untersuchen, erfolgte eine Supplementierung der iWAT-Kulturen mit 8Br-cGMP. Dieses wurde dem Kultur-Medium ca. ab Tag 4 bis zur vollständigen Ausreifung der Fettzellen zugesetzt. Hierzu wurde das jeweilige Medium mit dem stabilen und zellpermeablen cGMP-Analogon 8Br-cGMP (Endkonzentration 1  $\mu$ M) versetzt (s. Kapitel 572.4.8).

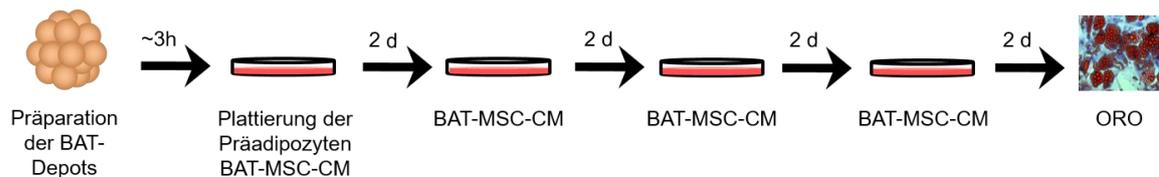
Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C und unter Zusatz von 5% CO<sub>2</sub>.

Zu gewünschten Zeitpunkten der Kultivierungen wurden lichtmikroskopische Schwarz-weiß- (vor Ölrot-Färbung) oder Farbaufnahmen (nach Ölrot-Färbung) mit Hilfe eines Axiovert 200 M Lichtmikroskops und angeschlossener Kamera angefertigt, welche im Anschluss mittels AxioVision-Software (Zeiss) aufgearbeitet werden konnten.

## BAT

Im Gegensatz zu weißen Präadipozyten benötigen mesenchymale Stammzellen (MSC), die braunen Fettvorläuferzellen, keinen spezifischen Induktionsstimulus, sondern sind in der Lage, spontan zu Fettzellen zu differenzieren. Aus diesem Grund konnte bei BAT-MSK-Kulturen über die gesamte Kultivierungszeit von 8 Tagen das gleiche Medium, BAT-MSK-CM, verwendet werden. Der Mediumwechsel erfolgte hierbei alle 48 Stunden, beginnend an Tag 1 nach Ausbringen der Zellen. Das im BAT-MSK-Kulturmedium enthaltene Natriumascorbat (Endkonzentration 25  $\mu$ g/ml) ist ein wichtiges Antioxidans und spielt darüber hinaus eine zentrale Rolle bei der Entstehung von braunen Fettzellen und der zitterfreien Thermogenese. Insulin (Endkonzentration 4 nM) sowie T3 (Endkonzentration 4 nM) haben, wie beschrieben (s. Kapitel 3.5.8), wachstumsfördernde Wirkungen auf die Zellen und fördern darüber hinaus die Reifung der Fettvorläuferzellen zu adulten Adipozyten.

Die Supplementierung mit 8Br-cGMP erfolgte durch Zugabe zum normalen Kulturmedium, beginnend an Tag 1 bis zum Ende der Kultur. Das zellpermeable und gegenüber abbauenden PDEs stabilere cAMP-Analogon Sp-cAMPS wurde dem Medium an Tag 1 und Tag 3 zugesetzt. Um die Rolle des BK-Kanals für die Reifung und Expansion brauner Fettzellen abschätzen zu können wurden BK<sup>+/+</sup>-Kulturen mit Paxillin (Endkonzentration 4  $\mu$ M) behandelt. Die gleichzeitige Analyse von BK<sup>L1/L1</sup>-Präadipozytenkulturen war nicht möglich, da keine entsprechenden Zellen zur Verfügung standen (s. Kapitel 3.5.7.33.5.8.1).



**Abb. 3.11: Schematische Darstellung der Kultivierung brauner Präadipozyten**

Isolation der Präadipozyten aus interscapularem braunem Fettgewebe (BAT) und anschließendes Ausbringen in BAT-mesenchymalem Stammzellmedium (BAT-MSC-CM). Der Mediumwechsel erfolgte 2-tägig (2 d) bis zur vollständigen Ausreifung der Zellen. Anschließend finale Ölrotfärbung (ORO). Weitere Informationen im Text.

Auch bei der Kultivierung der BAT-MSC-Kulturen musste eine ausgeprägte Luft-Exposition der Lipid-gefüllten Fettzellen möglichst vermieden werden, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Aus diesem Grund wurden bei jedem Mediumwechsel lediglich 900 µl des Mediums abgenommen und möglichst ohne Erzeugung von Schwerkräften durch 900 µl frisches Medium ersetzt. Um dennoch einen ausreichenden Austausch des Mediums zu gewährleisten wurde dieser Vorgang bei jedem Mediumwechsel zweimal durchgeführt.

BAT-MSC-Kulturen wurden unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zu gewünschten Zeitpunkten der Kultivierungen wurden lichtmikroskopische Schwarz-weiß- (vor Ölrot-Färbung) oder Farbaufnahmen (nach Ölrot-Färbung) mit Hilfe eines Axiovert 200 M Lichtmikroskops und angeschlossener Kamera angefertigt, welche im Anschluss mittels AxioVision-Software (Zeiss) aufgearbeitet werden konnten.

#### 3.5.8.4 Ölrot-Färbung zur Quantifizierung von Triglyceriden und Cholesterin

Nach vollständiger Differenzierung und Reifung der kultivierten Zellen wurde die Menge an Fettzellen mittels Ölrot quantifiziert. Ölrot ist ein sehr lipophiler Farbstoff, welcher spezifische Triglyceride und Cholesterin(-oleate) anfärbt. Eine photometrische Bestimmung der inkorporierten Ölrot Menge gibt somit Aufschluss über die in die Fettzellen eingelagerte Menge an Triglyceriden und kann aus diesem Grund zur relativen Bestimmung der Fettzellreifung heran gezogen werden.

Nach ausreichender Reifung der Zellen an Tag 13-15 (WAT) oder Tag 7-9 (BAT) wurden die jeweiligen Zellkulturgefäße 2 mal mit 37 °C warmem PBS gewaschen, bevor eine 60 minütige Fixierung der Zellen in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS erfolgte. PFA sorgt für eine Vernetzung von Proteinen und ermöglicht hierdurch eine Stabilisierung und Fixierung der Gewebestruktur. Nach erfolgter Fixierung wurde die PFA-Lösung abgezogen und verworfen und die Zellen für 40 min in Ölrot-Arbeitslösung inkubiert. Dies erfolgte bei 100 rpm auf einem Schüttler. Die Ölrot-Lösung wurde im Anschluss abgenommen und verworfen, die Zellen mindestens 3-mal mit demineralisiertem Wasser gewaschen, bis dieses völlig klar war. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen erneut mit Wasser bedeckt und konnten mit Hilfe des Axiovert M200 Lichtmikroskopes mit angeschlossener Kamera fotografiert werden.

Zur Quantifizierung des inkorporierten Ölrot wurde das Wasser im Anschluss vollständig verworfen und die rot gefärbten Zellen mit 99% Isopropanol versetzt (0,375 ml/cm<sup>2</sup>). Die Kulturgefäße wurden auf einen Schüttler verbracht und das Ölrot bei 100-200 rpm innerhalb von 10-15 min vollständig aus den Fettzellen eluiert. Das Ölrot/Isopropanol-Gemisch wurde in

geeignetem Verhältnis verdünnt (eWAT unverdünnt, iWAT 1:1, BAT 1:2) um eine photometrische Vermessung innerhalb der, durch das Lambert-Beer'sche-Gesetz definierten, Grenzen zu ermöglichen. Die verdünnten Proben wurden bei 518 nm mit Hilfe eines Photometers (Implen) in Einmal-Küvetten vermessen. Als Leerwert wurde reines Isopropanol vermessen.

### 3.5.9 Wachstumsanalyse mittels xCELLigence-System

Die xCELLigence Methode basiert auf einer Impedanzmessung an goldbeschichteten Kulturgefäßen, was eine Quantifizierung des Bewuchses adhärent wachsender Zellen *in vitro* ermöglicht und somit Rückschlüsse auf die Proliferation und das Wachstum von Zellen in Echtzeit zulässt. Das xCELLigence System beruht dabei auf einer Impedanzmessung. Über zwei Elektroden wird immer wieder eine genau definierte Spannung angelegt. Ändert sich bei dieser Messung, durch den Bewuchs der Bodenplatten, der elektrische Widerstand, so kommt es zu einer veränderten Stromstärke, was das System in einen entsprechenden Zellindex umrechnet. Allerdings kann auch eine Veränderung der Zellmorphologie oder eine Sedimentation von Zellfragmenten diese Impedanzmessung fälschlicherweise beeinflussen. Zu Untersuchungen des Zellwachstum und der Zellproliferation wurden Präadipozyten aus epididymalem Fettgewebe wie in Kapitel 3.5.8.2 beschrieben isoliert. Das für die xCELLigence-Versuche verwendete Medium wurde vor Versuchsbeginn für 1 Stunde bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach 10 minütiger Equilibrierung der Messkammern mit 180 µl Medium (DMEM-F12 mit 5% FCS) wurde ein Basalwert generiert, bevor in nächsten Schritt 20 µl Zellsuspension zugegeben wurden. Die Endkonzentration der Zellen betrug hierbei wie im jeweiligen Experiment angegeben 20.000, 30.000 oder 40.000 Zellen pro Kulturkammer. Im Folgenden wurde die Impedanz alle 15 min über einen Zeitraum von 60 Stunden detektiert und als Zellindex angegeben. Da ein Wechsel des Mediums in diesem System nicht möglich war, konnten keine Messungen über einen längeren Zeitraum erfolgen, da nach mehr als 60 Stunden davon ausgegangen werden muss, dass das im Kulturgefäß enthaltene Medium weitestgehend verbraucht und mit Stoffwechselprodukten der Zellen angereichert ist. Um neben den Effekten einer globalen BK-Kanal-Deletion auch die Auswirkung einer pharmakologischen BK-Kanal-Blockade in diesem System zu untersuchen, wurde dem Medium der hochpotente und spezifische BK-Kanal-Blocker Paxillin (Endkonzentration 1 µM) zugesetzt.

## 3.6 Statistische Analyse

In sämtlichen Diagrammen wurden die erhobenen Ergebnisse, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Sofern keine gerätespezifischen Auswerteprogramme verwendet wurden (ELISA-Versuche), erfolgten alle statistischen Analysen mittels Microsoft Excel 2010 und Microsoft Excel 2013. Signifikanzberechnungen wurden hierbei mit Hilfe eines zweiseitigen Student's t-test durchgeführt und gleiche Varianzen (homoskedastischer t-Test) vorausgesetzt. Erhaltene p-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant, <0,01 als sehr signifikant und p-Werte <0,001 als hoch signifikant betrachtet und mit entsprechenden Symbolen (\*/#) dargestellt (\*/#p<0,05;

\*\*/## $p < 0,01$ ; \*\*\*/### $p < 0,001$ ). Nicht signifikante Unterschiede  $p > 0,05$  sind entweder gar nicht oder mit der Abkürzung n.s. (nicht signifikant) gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

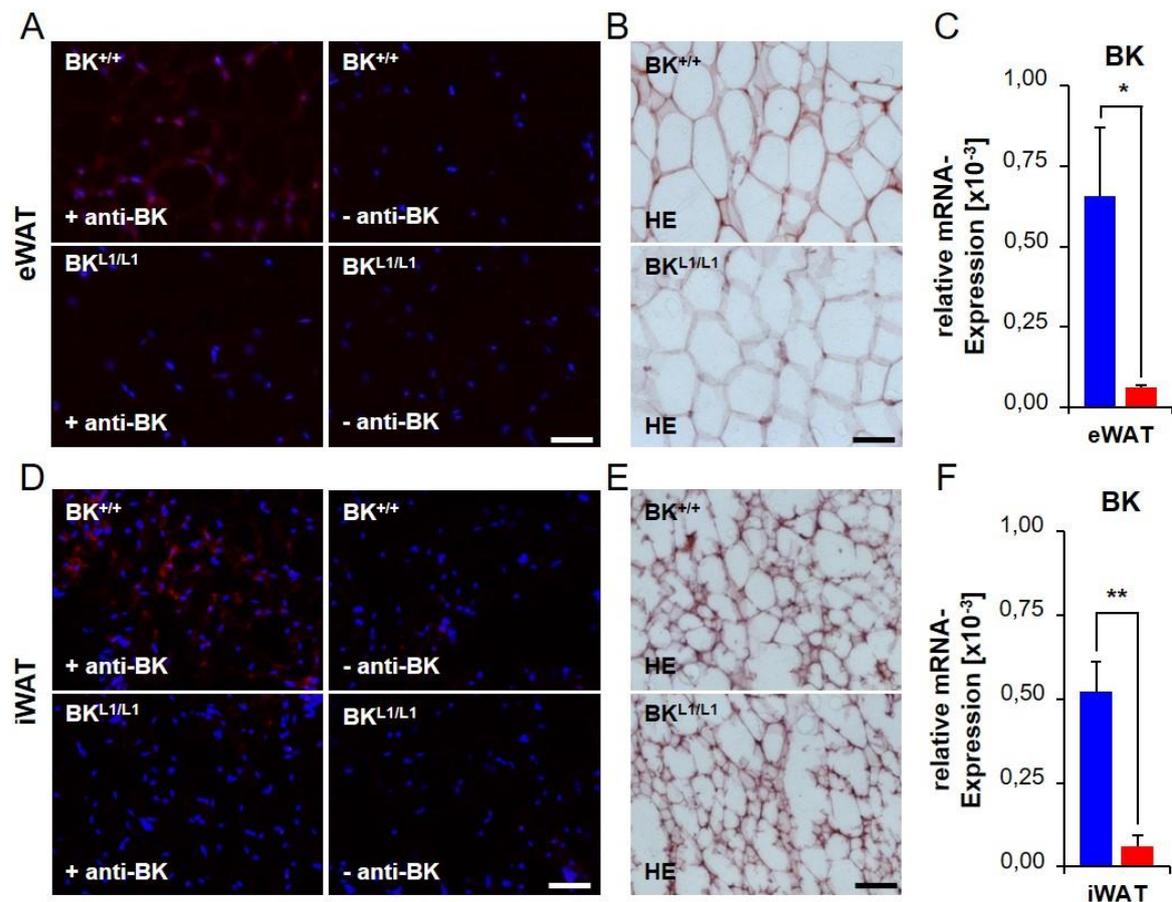
Vorausgegangenen Arbeiten implizieren, dass eine globale Deletion des BK-Kanals im Mausmodell vor übermäßiger Gewichtszunahme bei normo- und hochkalorischer Ernährung schützt. Diese Daten deuten auf einen adipogenen Effekt zentraler, wie auch peripherer BK-Kanäle hin. Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher die Rolle des BK-Kanals für die Fettzellreifung *in vitro*, sowie für die Entstehung von Adipositas und daraus resultierenden Folgeerkrankungen *in vivo* mit Hilfe eines Fettzell-spezifischen induzierbaren Knockout-Systems (Sassmann et al., 2010) untersucht.

### 4.1 Untersuchung global BK-Kanal defizienter Tiere

Da im Rahmen dieser Arbeit insbesondere die Rolle des BK-Kanals in Adipozyten untersucht werden sollte, wurde in einem ersten Schritt die Expression des Kanals in verschiedenen Fettgeweben überprüft, da dies in murinen Fettgeweben nach unserem Kenntnisstand bislang noch nicht in der Literatur beschrieben wurde.

#### 4.1.1 Nachweis des BK Kanales in verschiedenen Fettgeweben

Immunfluoreszenz-Färbungen (s. Kapitel 3.5.2.5) von Kryoschnitten (s. Kapitel 3.5.2.2) aus epididymalem Fettgewebe (eWAT) 10 Wochen alter, global BK-Kanal-defizienter Tiere ( $BK^{L1/L1}$ ) und Wildtyp-Kontrollen ( $BK^{+/+}$ ) zeigen, dass der BK-Kanal im eWAT der  $BK^{+/+}$  Tiere exprimiert wird, wohingegen die entsprechenden  $BK^{L1/L1}$ -Gewebe keine BK-assoziierte rote Fluoreszenz aufweisen (s. Abb. 4.1: BK-Expression im Fettgewebe globaler  $BK^{+/+}$ - und  $BK^{L1/L1}$ -Tiere). Auch die Negativkontrollen, welche nicht mit Primär-Antikörper gegen ein BK-Kanal-Epitop inkubiert wurden, zeigen keine BK-Kanal-spezifische Färbung (s. Abb. 4.1a). Darüber hinaus konnte die Expression des BK-Kanals in eWAT auch mittels immunhistochemischer DAB-Färbung (s. Kapitel 3.5.2.4) bestätigt werden (s. Suppl. Abb. 1, linke Spalte). Die braune Färbung des  $BK^{+/+}$ -Gewebes indiziert hierbei das Vorhandensein von BK-Kanälen, wohingegen sowohl in den  $BK^{L1/L1}$ -Geweben, als auch in der Negativkontrolle ohne Primärantikörper (s. Suppl. Abb. 1, rechte Spalte) erneut keine Färbungen zu erkennen sind. Der Nachweis des Adipozyten-spezifischen Enzyms Hormon-sensitive Lipase (HSL) bestätigt außerdem, dass es sich bei dem hier dargestellten Gewebe um Fettgewebe handelt (s. Suppl. Abb. 1, mittlere Spalte). Die zelluläre Morphologie des eWAT wurde mittels Hämatoxylin & Eosin (HE)-Färbung (s. Kapitel 3.5.2.3) von Gefrierschnitten visualisiert. Die annähernd runden, gleichmäßig geformten Zellmembranen sind hierbei pink angefärbt, während Zellkerne dunkelviolett erscheinen. Im Alter von 10 Wochen, sind unter normo-diätetischen Fütterungsbedingungen hinsichtlich der Morphologie der Fettzellen keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zu verzeichnen (s. Abb. 4.1b). Die Untersuchung der BK-Kanal-Expression, mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse (qRT-PCR) (s. Kapitel 3.5.5), konnte darüber hinaus auch auf messenger RNA (mRNA)-Ebene signifikant höhere BK-mRNA Level in den  $BK^{+/+}$ -Geweben aufzeigen (s. Abb. 4.1c+f). Die qRT-PCR Signale in den  $BK^{L1/L1}$ -Proben, sind vermutlich auf unspezifische Fluoreszenzbildung zurück zu führen, da sie im gleichen Maße auch in Negativkontrollen ohne copyDNA (cDNA), zu verzeichnen sind (nicht dargestellt / s. Suppl. Abb. 4a).



**Abb. 4.1: BK-Expression im Fettgewebe globaler BK<sup>+/+</sup>- und BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere**

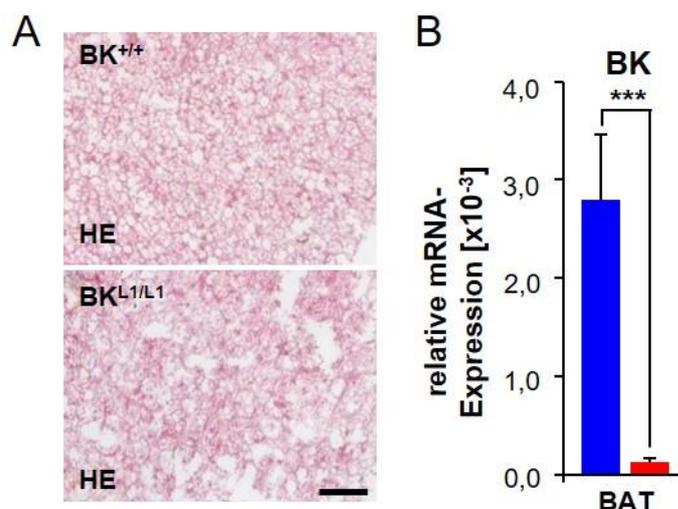
Repräsentative Darstellung von BK-Kanal-Expression und Morphologie in 14- $\mu$ m Gefrierschnitten von epididymalem Fettgewebe (eWAT) sowie Leistenfett (iWAT). Die Gewebe wurden aus 10 Wochen alten, global BK-Kanal-defizienten Tieren (BK<sup>L1/L1</sup>) und deren Wildtyp-Wurfgeschwistern (BK<sup>+/+</sup>) isoliert. **(A, C)** Immunfluoreszenz-Färbung des BK-Kanals in eWAT **(A)** und iWAT **(C)**. Rote Fluoreszenz indiziert die Expression von BK-Kanal im Wildtyp-Gewebe (jeweils oben links) wohingegen in Fettgewebe von BK-defizienten Tieren (jeweils unten links), sowie in den Negativkontrollen (rechts) ohne Primärantikörper (- anti-BK), kein BK-Kanal nachgewiesen werden kann. Zellkerne sind mit Hoechst® angefärbt (blaue Fluoreszenz). **(B, E)** Hämatoxylin & Eosin (HE)-Färbung von Gefrierschnitten. Zellkerne sind violett angefärbt, Zellmembranen fuchsiarot. Zwischen den Genotypen ist unter normodiätetischen Fütterungsbedingungen kein Unterschied in der Morphologie zu erkennen, wohingegen eWAT **(B)** sich im Vergleich zu iWAT **(E)** als deutlich hypertropher Zellverband präsentiert. **(C, F)** Analyse der BK messenger RNA-Expression (mRNA) mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR). In BK<sup>+/+</sup>-Proben (blau) war signifikant mehr BK-Kanal-Expression (normalisiert auf  $\beta$ -Aktin) in eWAT **(C)** (BK<sup>+/+</sup> n=6; BK<sup>L1/L1</sup> n=4) und iWAT **(F)** (BK<sup>+/+</sup> n=5; BK<sup>L1/L1</sup> n=5) nachweisbar, als in den entsprechenden Geweben der BK<sup>L1/L1</sup>-Wurfgeschwister (rot). Die schwach detektierbaren Signale in den BK<sup>L1/L1</sup> Proben sind vermutlich auf unspezifische Fluoreszenz zurück zu führen. **(A, B, D, E)** Maßstabsbalken entsprechen 50  $\mu$ m. **(C, F)** Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

Neben dem BK-Kanal-Nachweis in eWAT, konnte der BK-Kanal mittels Immunfluoreszenz-Färbung auch in Gefrierschnitten aus Leistenfett (iWAT) von BK<sup>+/+</sup>-Mäusen detektiert werden (s. Abb. 4.1d). Die rote Fluoreszenz des Antikörper-markierten BK-Kanals ist auch hier weder in BK<sup>L1/L1</sup>-Gewebe, noch in Kontrollschnitten ohne Primärantikörper detektierbar (s. Abb. 4.1d). Eine HE-Färbung der iWAT-Gefrierschnitte (s. Abb. 4.1e) zeigt die typische iWAT-Morphologie, bestehend aus einer heterogenen Mischung von Fettzellen unterschiedlicher

Größe. Während zwischen den beiden Genotypen kein Unterschied zu erkennen ist fällt beim Vergleich mit eWAT (s. Abb. 4.1b) derselben Magnifikation auf, dass die iWAT-Proben einen deutlich kleinzelligeren Gewebeverband aufweisen. Der Nachweis von BK-mRNA mittels qRT-PCR-Analyse offenbart auch in iWAT eine signifikant höhere BK-Kanal-Expression in BK<sup>+/+</sup> gegenüber BK<sup>L1/L1</sup> Proben (s. Abb. 4.1f). Interessanterweise war dabei das BK-Expressionsniveau im eWAT und iWAT nahezu identisch. Das erneut sehr schwache qRT-PCR-Signal im BK<sup>L1/L1</sup> iWAT ist hierbei vermutlich ebenfalls auf unspezifische Fluoreszenz-Signale und deren Detektion über diese hochsensitive Methode zurück zu führen.

Neben klassischen weißen Fettdepots wurde auch das interscapulare braune Fettgewebe (BAT) hinsichtlich seiner Morphologie und BK-Kanal-Expression untersucht. HE-Färbungen von 8 µm dicken Gefrierschnitten ermöglichen hierbei die Visualisierung des für BAT typischen, sehr kleinzelligen, Zellverbandes (s. Abb. 4.2a), in dem histologisch zunächst keine Genotyp-spezifischen Unterschiede detektierbar waren. Die BK-Kanal mRNA wurde auch hier mit der etablierten qRT-PCR-Methode bestimmt und ergab eine hochsignifikant höhere Expression von BK-Kanal in BK<sup>+/+</sup> BAT gegenüber BK<sup>L1/L1</sup>-Gewebe (s. Abb. 4.2b).

Zusammengenommen konnten die qRT-PCR-Expressionsuntersuchungen damit erstmalig einen BK Nachweis im eWAT, iWAT und BAT liefern. Mittels immunhistochemischer und Immunfluoreszenz-Färbungen konnten diese Befunde außerdem in Gewebeschnitten von eWAT, iWAT und BAT bestätigt werden.



**Abb. 4.2: Morphologische Untersuchung von BAT globaler BK-Tiere**

**(A)** Hämatoxylin & Eosin (HE)-Färbung von 8 µm starken Gefrierschnitten von braunem Fettgewebe (BAT) aus 10 Wochen alten BK-Tieren. Zellkerne sind violett angefärbt, Zellmembranen fuchsiarot. Zwischen Wildtyp (BK<sup>+/+</sup>) und BK-defizienten (BK<sup>L1/L1</sup>) Geweben ist basal kein morphologischer Unterschied zu erkennen. **(B)** Untersuchung der BK mRNA-Expression (mRNA) in BAT mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR). BK<sup>+/+</sup>-Proben (blau, n=8) zeigen hochsignifikant mehr BK-Kanal-Expression als ihre BK<sup>L1/L1</sup>-Wurfgeschwister (rot, n=6) (normalisiert auf β-Aktin). Die schwach detektierbaren Signale bei BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren sind vermutlich auf unspezifische Fluoreszenz zurück zu führen. **(A)** Maßstabsbalken entspricht 50 µm. **(B)** Abbildung zeigt Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). \*\*\* p < 0,001.

## 4.1.2 Globale BK-Kanal-Deletion schützt vor übermäßiger Gewichtszunahme und Fetteinlagerung

Wie bereits in vorausgegangenen Arbeiten (Beisan Mohammad, unveröffentlichte Dissertation, 2014) gezeigt werden konnte, ist nach globaler Deletion des BK-Kanals in Mäusen auf gemischtem Hintergrund (SV129/C57Bl6N) *ab initio* die Körpergewichtszunahme gegenüber BK-WT-Tieren signifikant reduziert. Dieser Phänotyp ist sowohl bei Fütterung einer Kontrolldiät (CD) mit geringem Fettgehalt, als auch bei diätetischer Gabe einer Hochfettdiät (HFD) erkennbar. Da insbesondere metabolische Eigenschaften in Mausmodellen stark vom Hintergrund der Tiere abhängig sein können, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst Fütterungsversuche mit BK<sup>+/+</sup> und BK<sup>L1/L1</sup> Mäusen auf einem reinen C57Bl6/N durchgeführt. Neben Untersuchungen zur allgemeinen Entwicklung des Körpergewichtes, sowie des Fettanteils, sollte dabei ein Fokus auf die Entstehung, Reifung und Ausprägung diverser Fettzelldepots liegen.

### 4.1.2.1 Analyse des Körpergewichtes

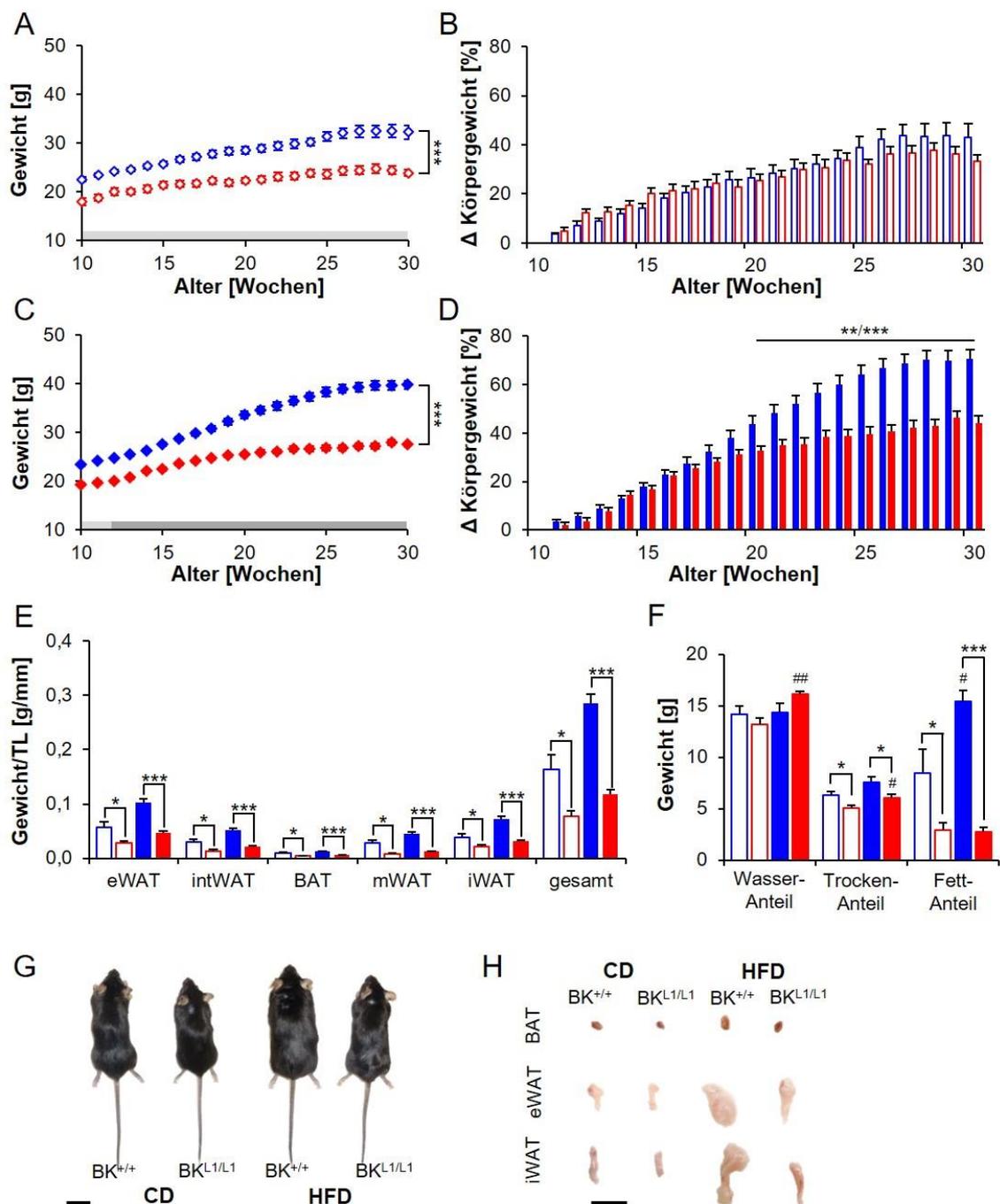
Die Gewichtsentwicklung von globalen BK-Tieren unter CD-Fütterung (s. Kapitel 3.4.1) zeigt ein, zu jedem Messzeitpunkt, hochsignifikant geringeres Körpergewicht in BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen gegenüber ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern (s. Abb. 4.3a). Das hochsignifikant geringere Körpergewicht der BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere zu Beginn der diätetischen Fütterung (Woche 10) (BK<sup>+/+</sup> = 23,38 ± 0,25 g; BK<sup>L1/L1</sup> = 19,35 ± 0,29 g; p < 0,005), ist möglicherweise auf eine reduzierte Körpergröße der Tiere zurückzuführen und spiegelt sich auch im hochsignifikanten Unterschied der ermittelten Tibialänge der beiden Genotypen (s. Suppl. Abb. 2c + Suppl. Abb. 3e) wieder. Diese Befunde stehen in Einklang mit früheren Untersuchungen, in welchen signifikant reduzierte Körperlängen von weiblichen und männlichen BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren im Alter von 4 und 8 Wochen beschrieben wurden (Sausbier et al., 2004). Die Gewichtskurven der beiden Genotypen verlaufen unter Kontrolldiät-Fütterung weitgehend parallel. Dementsprechend unterscheidet sich die prozentuale Körpergewichtszunahme (s. Abb. 4.3b) der BK<sup>+/+</sup> und BK<sup>L1/L1</sup>-Mäuse unter CD-Fütterung zu keinem Zeitpunkt. Dies spiegelt sich auch in der Gewichtszunahme ( $\Delta$  Körpergewicht) über den gesamten Versuchszeitraum wieder. Während die absolute Gewichtszunahme in Gramm in BK<sup>L1/L1</sup> Mäusen gegenüber BK<sup>+/+</sup> Tieren signifikant reduziert ist (BK<sup>+/+</sup> = 9,71 ± 1,26 g; BK<sup>L1/L1</sup> = 5,86 ± 0,24 g; p = 0,01) (s. Suppl. Abb. 2a, links), ist für die prozentuale Gewichtszunahme, ausgehend vom Anfangsgewicht der entsprechenden Tiere, lediglich eine leichte statistische Tendenz zu erkennen (BK<sup>+/+</sup> = 42,94 ± 5,52 %; BK<sup>L1/L1</sup> = 33,34 ± 2,38 %; p = 0,14) (s. Suppl. Abb. 2b, links).

Die Fütterung globaler BK-Tiere mit HFD über einen Zeitraum von 18 Wochen (s. Kapitel 3.4.1) resultiert ebenfalls in einer hochsignifikanten Reduktion der Körpergewichtszunahme in BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen gegenüber ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern (s. Abb. 4.3c). Hierbei ist, insbesondere ab einem Alter von 20 Wochen, in BK<sup>+/+</sup>-Tieren ein massiver Anstieg des Körpergewichtes zu verzeichnen bevor das Körpergewicht beider Genotypen etwa ab einem Alter von 28 Wochen eine Plateauphase erreicht. Dementsprechend ist die wöchentliche prozentuale Körpergewichtszunahme in BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen ab einem Alter von 20 Wochen stark signifikant reduziert gegenüber BK<sup>+/+</sup>-Tieren (s. Abb. 4.3d). Somit resultierte die 18-wöchige

HFD-Fütterung sowohl in einer hochsignifikant reduzierten absoluten Körpergewichtszunahme ( $BK^{+/+} = 16,44 \pm 0,83$  g;  $BK^{L1/L1} = 8,37 \pm 0,45$  g;  $p < 0,005$ ) (s. Suppl. Abb. 2a), als auch einer ebenfalls hochsignifikant reduzierten prozentualen Körpergewichtszunahme über den Versuchszeitraum in  $BK^{L1/L1}$  gegenüber  $BK^{+/+}$  ( $BK^{+/+} = 70,70 \pm 3,78$  %;  $BK^{L1/L1} = 44,26 \pm 2,68$  %;  $p < 0,005$ ) (s. Suppl. Abb. 2b). Erwartungsgemäß war bereits zu Beginn der HF-Diät ein hochsignifikanter Körpergewichtsunterschied zwischen den beiden Genotypen zu erkennen. Um potentielle Unterschiede hinsichtlich der aufgenommenen Kalorienmenge zu überprüfen wurde der Futterkonsum von  $BK^{+/+}$  und  $BK^{L1/L1}$ -Tieren im Alter von 30 Wochen mittels modifiziertem metabolischem Käfig (s. Kapitel 3.4.2) untersucht. Hierbei konnte weder unter CD-Fütterung, noch unter Gabe von HFD ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden (s. Suppl. Abb. 2e). Dementsprechend können Unterschiede hinsichtlich der Energiezufuhr als Ursache für die massiven Körpergewichtsunterschiede (s. Abb. 4.3a-h) ausgeschlossen werden. Diese Befunde stehen im Einklang mit Untersuchungen an männlichen und weiblichen BK-Tieren auf Hybridhintergrund. Auch diese Mäuse zeigten keine Genotyp-bedingten Unterschiede in der täglichen Futteraufnahme (Beisan Mohammad, unveröffentlichte Dissertation, 2014).

Um neben der Auswirkung einer Hochfettdiät auch die Folgen einer sehr Kohlenhydrat-reichen Ernährung zu untersuchen, durchlief eine kleine Kohorte von Tieren eine 18-wöchige Sucrose-Diät (s. Kapitel 3.4.1).  $BK^{L1/L1}$ -Tiere zeigten sich interessanterweise auch vor einer übermäßigen Kohlenhydrat-induzierten Gewichtszunahme geschützt (s. Suppl. Abb. 3a). Ab einem Alter von 20 Wochen ist in diesen Mäusen dementsprechend eine klare Tendenz hinsichtlich einer reduzierten prozentualen Körpergewichtszunahme zu verzeichnen, welche jedoch auf Grund der geringen Probandenzahl nur in Woche 30 einen signifikanten Unterschied aufweist (s. Suppl. Abb. 3b). Die absolute Körpergewichtszunahme über den gesamten Versuchszeitraum hinweg ist in  $BK^{L1/L1}$  Mäusen dennoch signifikant geringer, als in den korrespondierenden Wildtyp-Tieren (s. Suppl. Abb. 3d).

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die globale Deletion des BK-Kanals auch Tiere auf C57Bl6/N-Hintergrund hochwirksam und signifikant vor einer übermäßigen Gewichtszunahme durch CD- und insbesondere HFD-Fütterung schützen kann. Darüber hinaus deuten die Befunde auch auf eine BK-abhängige Rolle bei der Gewichtszunahme unter Kohlenhydrat-reicher Ernährung hin.



**Abb. 4.3: CD- und HFD-Fütterung globaler BK-Tiere**

**(A)** Gewichtsentwicklung von Wildtyp-Tieren (BK<sup>+/+</sup>) und global BK-Kanal-defizienten Mäusen (BK<sup>L1/L1</sup>) unter Kontrolldiät (CD)-Fütterung. Die Dauer der CD-Fütterung wird durch einen hellgrauen Balken dargestellt. Die BK<sup>+/+</sup>-Tiere (blaue Rahmen, n=15) zeigen über den gesamten Versuchszeitraum ein hochsignifikant erhöhtes Körpergewicht gegenüber ihren BK<sup>L1/L1</sup>-Wurfgeschwistern (rote Rahmen, n=14). **(B)** Die prozentuale Körpergewichtszunahme ( $\Delta$  Körpergewicht [%]) unterscheidet sich hierbei nicht. **(C)** Gewichtsverlauf von BK<sup>+/+</sup> (blau gefüllte Symbole, n=34) und BK<sup>L1/L1</sup> (rot gefüllte Symbole, n=29) unter Fütterung von Hochfett-Diät (HFD). Der dunkelgraue Balken indiziert die Dauer der HFD-Fütterung. BK<sup>+/+</sup>-Tiere weisen über den gesamten Versuchszeitraum ein hochsignifikant erhöhtes Gewicht gegenüber ihren BK<sup>L1/L1</sup>-Wurfgeschwistern auf. **(D)** Die prozentuale Körpergewichtszunahme ist hierbei in BK<sup>+/+</sup>-Mäusen ab einem Alter von 20 Woche ebenfalls sehr signifikant erhöht (\*\*p < 0,01 Woche 20-22, \*\*\* p < 0,001 ab Woche 23). **(E)** Das Gewicht unterschiedlicher Fettdepots, normiert auf

die Tibiallänge (TL), ist nach CD-Fütterung in BK<sup>L1/L1</sup> (n=6) in epididymalem Fett (eWAT), interscapularem weißem Fett (intWAT), braunem Fettgewebe (BAT), mesenterischem Fettgewebe (mWAT) sowie Leistenfett (iWAT) signifikant verringert. Auch das Gesamtgewicht der untersuchten Fettdepots (gesamt) unterscheidet sich signifikant zwischen den BK<sup>L1/L1</sup>- und BK<sup>+/+</sup>-Tieren (n=9) unterscheidet. Nach HFD-Fütterung führt die erhöhte Fetteinlagerung in den BK<sup>+/+</sup>-Mäusen (n=20) zu einer hochsignifikanten Zunahme der normierten Fettmasse aller Depots gegenüber den HFD-gefütterten BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren (n=12). **(F)** Die Analyse der Körperstruktur mittels Soxhlet-Fettextraktion nach diätetischer Fütterung ergibt keine Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich des Wasseranteils. Die Trockenmasse ist in BK<sup>L1/L1</sup> sowohl nach CD- als auch nach HFD-Fütterung signifikant erniedrigt. Auch der Fettanteil der BK<sup>L1/L1</sup> nach CD (n=6) ist signifikant geringer als in BK<sup>+/+</sup> Mäusen (n=6). Nach HFD-Fütterung ergibt sich hier sogar ein sehr prominenter und hochsignifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (BK<sup>+/+</sup> n=7; BK<sup>L1/L1</sup> n=5). #-Symbole weisen auf signifikante Unterschiede im entsprechenden Kompartiment zwischen CD- oder HFD-Fütterung innerhalb eines Genotypes hin. **(G)** Repräsentative Fotos von Tieren nach diätetischer Fütterung. **(H)** Repräsentative Abbildung von BAT, eWAT und iWAT nach CD- oder HFD-Fütterung. **(A-F)** Abbildungen zeigen Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). \*/# p < 0,05; \*\*/## p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. **(G, H)** Maßstabsbalken entsprechen 2 cm.

### 4.1.2.2 Untersuchung verschiedener Fettdepots und Körperstrukturanalyse

Da eine Akkumulation von Fetten ursächlich ist, für die HFD-induzierte Gewichtszunahme, wurden die verschiedenen Fettdepots auch einzeln analysiert. Diese Untersuchungen sollten außerdem einer ersten Abschätzung dienen, inwiefern der adipozytäre BK-Kanal (s. Abb. 4.1) über Fettgewebs-Effekte Einfluss auf die Körpergewichtsentwicklung der Tiere bei CD- und HFD-Fütterung nimmt. Neben dem Körpergewicht der Tiere wurde zusätzlich auch das Gewicht verschiedener Fettdepots (s. Abb. 4.3e) sowie die gesamte Körperzusammensetzung der Tiere nach Abschluss der Fütterungsversuche (s. Abb. 4.3f) analysiert.

Auf Grund der unterschiedlichen Körpergröße der Tiere (s. Suppl. Abb. 2c), wurden die Massen der untersuchten Fettdepots auf die Tibiallänge, einem validen und gewichtsunabhängigen Größenmaß, normiert. Auf diese Weise sollten Gewichtsunterschiede, welche lediglich auf den unterschiedlichen Körpergrößen der Genotypen beruhen, ausgeglichen werden. Untersucht wurden hierfür eWAT, interscapulares weißes Fettgewebe (intWAT), BAT, mesenterisches Fett (mWAT) sowie iWAT und das aus den untersuchten Depots resultierende Gesamtgewicht der Fettdepots (gesamt).

Nach CD-Fütterung zeigt sich in allen untersuchten Fettdepots der BK<sup>L1/L1</sup> ein signifikant reduziertes Gewicht/TL-Verhältnis, verglichen mit den Wildtyp-Wurfgeschwistern (s. Abb. 4.3e). Die Untersuchung der verschiedenen Fettdepots nach HFD-Fütterung, brachte erwartungsgemäß noch stärker ausgeprägte Effekte zu Tage. Hier konnte in ausnahmslos allen getesteten Fettgeweben eine massive und hochsignifikante Reduktion der normierten (s. Abb. 4.3e) und absoluten Fettmassen (s. Suppl. Abb. 2d) in BK<sup>L1/L1</sup> gegenüber BK<sup>+/+</sup>-Tieren festgestellt werden. Verglichen mit der CD-Fütterung resultierte die Fütterung der Tiere mit einer Hochfett-Diät in beiden Genotypen in einem signifikanten Anstieg der Gewichte aller weißen Fettdepots. Lediglich die Menge an BAT variierte zwischen den verschiedenen Diäten nicht signifikant (nicht dargestellt). Auch die Kohlenhydrat-reiche Sucrose-Gabe resultierte in signifikant erhöhten Mengen an normierten Fettmassen der BK<sup>+/+</sup>-Kohorte. So waren auch in diesem Fütterungsmodell in den BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren eWAT, intWAT, BAT, mWAT, iWAT sowie das resultierende Gesamtgewicht der untersuchten Fettdepots signifikant reduziert (s. Suppl. Abb. 3c).

Eine Bestimmung des Wassergehaltes mit anschließender Soxhlet-Fettextraktion (s. Kapitel 3.5.1) wurde durchgeführt, um die Körperstruktur der Tiere nach diätetischer Fütterung zu bestimmen (s. Abb. 4.3f).

Hinsichtlich des Wasseranteils ist zwischen den beiden Genotypen nach CD-Fütterung kein Unterschied zu erkennen. Allerdings sind nach CD sowohl die Trockenfraktion als auch der Fettanteil in BK<sup>L1/L1</sup>- gegenüber BK<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant verringert (s. Abb. 4.3f). Nach HFD-Fütterung ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Wasseranteil der beiden Genotypen zu verzeichnen. Allerdings zeigte sich sowohl der Trockenanteil als auch die Fettfraktion der BK<sup>L1/L1</sup>-Mäuse gegenüber BK<sup>+/+</sup>-Tieren auf HFD signifikant reduziert (s. Abb. 4.3f). Vergleicht man die einzelnen Körperkompartimente innerhalb eines Genotypes in Abhängigkeit von der Diät, so wird deutlich, dass sich der Fettanteil der BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere zwischen CD- und HFD-Fütterung nicht unterscheidet, während Wasseranteil sowie Trockenmasse in den HFD-Tieren mit BK-Ablation signifikant ansteigen. Bei BK<sup>+/+</sup>-Tieren ergeben sich hingegen andere Veränderungen der Körperkompartimente. Hier ist nach HFD-Fütterung weder der Wasseranteil noch die Trockenmasse im Vergleich zur CD-Fütterung signifikant erhöht. Lediglich der Gesamtfettanteil der Tiere ist nach HFD signifikant höher als nach CD (s. Abb. 4.3f). Dies erlaubt den Schluss, dass in BK<sup>+/+</sup>-Mäusen das höhere Körpergewicht nach HFD-Fütterung primär durch eine vermehrte Fetteinlagerung bedingt ist, wohingegen in BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren das leicht höhere Körpergewicht ausschließlich durch einen Anstieg von Wasser und Trockenmasse bedingt zu sein scheint (s. Abb. 4.3f). Die globale Deletion des BK-Kanals scheint dementsprechend effektiv vor einer Diät-assoziierten exzessiven Fetteinlagerung zu schützen.

Die Darstellung von repräsentativen Tieren nach CD- oder HFD-Fütterung bestätigt das erhöhte Körpervolumen der Wildtyp-Tiere nach HFD-Fütterung. Auch die verminderte Körpergröße der BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere gegenüber den BK<sup>+/+</sup>-Wurfgeschwistern ist in den Übersichtsaufnahmen ersichtlich (s. Abb. 4.3g).

Repräsentative Fotografien ausgewählter Fettdepots verdeutlichen die zuvor aufgezeigten Befunde hinsichtlich der Fettmassen. Gut erkennbar sind die nur geringen Genotyp-bedingten Unterschiede der Fettmassen nach CD, wohingegen nach HFD ein deutlicher Zuwachs an Fettvolumen zu verzeichnen ist. Dieser stellt sich insbesondere hinsichtlich der Wildtyp-Fettdepots besonders ausgeprägt dar (s. Abb. 4.3h).

### **4.1.3 Untersuchung zum BK-abhängigen Glucose-Metabolismus nach verschiedenen Diäten**

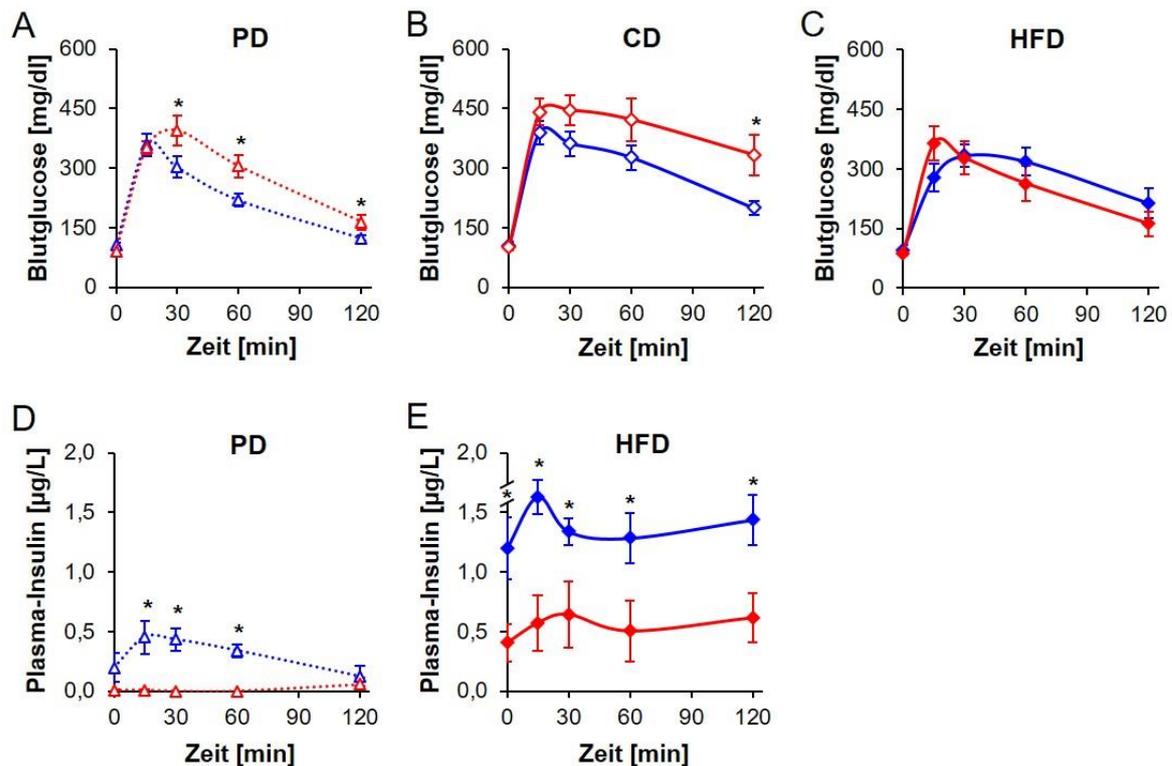
Adipositas ist oftmals mit einer Reihe metabolischer Co-Morbiditäten assoziiert, welche insbesondere den Glucose-Metabolismus sowie weitere Stoffwechsel-Veränderungen betreffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus diesem Grund sowohl die Glucosetoleranz als auch die Insulinfreisetzung von BK<sup>+/+</sup> und BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen im Alter von 10 Wochen vor diätetischer Fütterung und nach CD oder HFD-Behandlung, im Alter von 30 Wochen, untersucht. Diese stellen wichtige Surrogatparameter hinsichtlich pathologischer metabolischer Veränderungen dar.

Die Glucose-Verstoffwechslung wurde *in vivo* mittels intraperitonealem Glucose-Toleranz-Test (i.p. GTT) bestimmt, bei welchem die Versuchstiere eine Glucose-Bolus-Injektion erhielten (2

mg/g Körpergewicht) und die BG-Konzentration sowohl unmittelbar vor (0 min), als auch 15, 30, 60 und 120 min nach Injektion ermittelt wurde (s. Kapitel 3.4.4). Für die 10 Wochen alten (*prior diet*, PD) BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere ergaben sich hierbei signifikant erhöhte Blutglucose-Spiegel 30, 60 und 120 min nach Glucose-Applikation (s. Abb. 4.4a). Auch im Alter von 30 Wochen zeigten die CD-gefütterten BK-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ein deutlich erhöhtes Blutglucose-Level, welches nach 120 min Signifikanz aufweist (s. Abb. 4.4b). Die erhöhten BG-Konzentrationen der Knockout-Tiere mit 10 und 30 Wochen, in Folge eines i.p. GTT, stehen im Einklang mit Untersuchungen von Düfer et al (Düfer et al., 2011). Diese zeigten eine gestörte Glucose-Toleranz von 12-19 Wochen alten BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren. Interessanterweise war nach HFD-Fütterung im Gegensatz zu den bisherigen Befunden nach Kontrolldiät kein Unterschied im Blutglucose-Verlauf zwischen den beiden Genotypen zu verzeichnen (s. Abb. 4.4c).

Die Analyse der Plasma-Insulin-Spiegel mittels Enzym-gekoppeltem Immunoassay (ELISA) (s. Kapitel 3.5.6.1) ergab PD für Wildtyp-Tiere gegenüber BK<sup>L1/L1</sup>-Wurfgeschwistern eine signifikant erhöhte Insulinfreisetzung 15, 30 und 60 min nach Glucose-Applikation (s. Abb. 4.4d). Nach HFD-Fütterung konnte bei beiden Genotypen ein deutlicher Anstieg der Insulin-Freisetzung als Reaktion auf die Glucose-Injektion beobachtet werden (s. Abb. 4.4e). Darüber hinaus ergeben sich in Wildtyp-Tieren auch im Alter von 30 Wochen über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg signifikant höhere Plasma-Insulin-Werte, als in den korrespondierenden BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren (s. Abb. 4.4e). Auch dieser Befund unterstützt frühere *in vitro* Ergebnisse von Düfer et al. (Düfer et al., 2011). Diese Autoren konnten *in vitro* eine signifikant verringerte Glucose-induzierte Insulinfreisetzung aus pankreatischen  $\beta$ -Zellen beobachten. Die verminderte Insulinfreisetzung des Pankreas könnte somit eine mögliche Erklärung für die erhöhten Blutglucose-Werte der PD und CD BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere während des i.p. GTT sein.

Die massive Gewichts- und Fettezunahme in Folge einer HFD-Fütterung führt bei Wildtyp-Tieren jedoch möglicherweise zu einer Insulin-Resistenz. Auf Grund dieser möglichen Unempfindlichkeit der Tiere gegenüber Insulin kann auch die vermehrte Freisetzung des Hormons (s. Abb. 4.4e) keine ausreichende Reduktion der BG der Tiere vermitteln (s. Abb. 4.4c). Stattdessen erreichen die BK<sup>+/+</sup>-Tiere nach HFD-Fütterung BG-Werte, welche weitgehend jenen der BK-defizienten Mäuse entsprechen (s. Abb. 4.4c). Diese BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere wiederum scheinen von einer Adipositas-induzierten Insulinresistenz nicht, oder zumindest deutlich weniger stark, betroffen zu sein.



**Abb. 4.4: Glucose-Toleranz und Insulinausschüttung globaler BK-Tiere**

(A) BK-Kanal defiziente Tiere (BK<sup>L1/L1</sup>, rot umrandete Dreiecke, n=8) zeigen vor diätetischer Fütterung (PD) im Alter von 10 Wochen nach intraperitonealem Glucose-Toleranz-Test (i.p. GTT) nach 30, 60 und 120 min signifikant höhere Blutglucose-Werte im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (BK<sup>+/+</sup>, blau umrandete Dreiecke, n=8) (B) Auch nach Kontrolldiät (CD)-Fütterung zeigen BK<sup>L1/L1</sup> (rot umrandete Rauten, n=6) tendenziell höhere Blutglucose-Spiegel als BK<sup>+/+</sup> (blau umrandete Rauten, n=6). 120 min nach Glucose-Injektion ist diese Differenz signifikant. (C) Nach Fütterung mit Hochfettdiät (HFD) ist zwischen Wildtyp-Tieren (blaue Rauten, n=7) und BK<sup>L1/L1</sup> (rote Rauten, n=4) kein Unterschied hinsichtlich der Blutglucose zu erkennen. (D) Die Messung der Plasma-Insulin-Spiegel im Alter von 10 Wochen ergibt während des i.p. GTT signifikant erhöhte Plasma-Insulin-Level in BK<sup>+/+</sup> (n=5) gegenüber BK<sup>L1/L1</sup> (n=5) nach 15, 30 und 60 min. (E) Nach HFD-Fütterung sind die Plasma-Insulin-Werte in BK<sup>+/+</sup> (n=7) gegenüber BK-defizienten Tieren (n=5) zu allen Zeitpunkten signifikant erhöht. (D, E) Insulinkonzentrationen, welche unterhalb der Nachweisgrenze des hochsensitiven ELISAs und somit unter 0,025  $\mu\text{g/ml}$  lagen, wurden zur Ermittlung der Mittelwerte mit einer Konzentration von 0  $\mu\text{g/ml}$  eingerechnet. (A-E) Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4 Auswirkung der BK-Kanal-Defizienz auf Lebermetabolismus und Autophagie

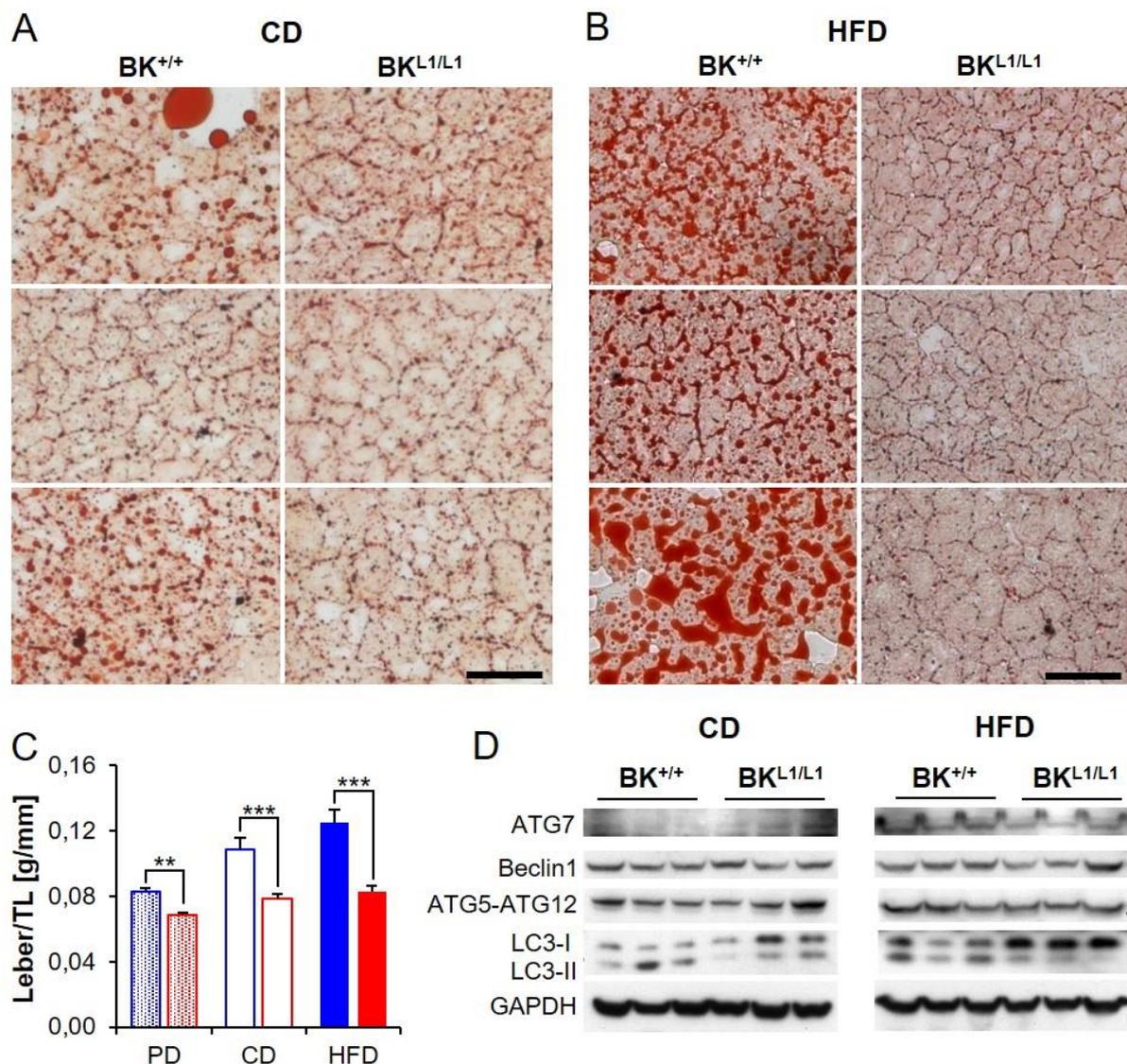
Die Entstehung einer Nicht-Alkohol-induzierten Fettleber (NAFLD) ist eine bekannte und vor allem schwerwiegende Folge von Adipositas (Lavallard and Gual, 2014; Saponaro et al., 2015), an welcher schon heute immer mehr Erwachsene und vor allem auch Kinder leiden (WHO, Fact sheet  $\approx$ 311, 2015) und welche im Folgenden wiederum zur Hepatosteatose und bis hin zum Leberkarzinom führen kann (Lavallard and Gual, 2014; Saponaro et al., 2015).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Gefrierschnitte aus Leberbiopsien von BK-Tieren nach Kontroll- oder Hochfettdiät mit Ölrot angefärbt und auf diese Weise auf die Einlagerung von Triglyceriden in Hepatozyten hin untersucht. Nach 20-wöchiger Fütterung der Tiere mit CD fällt in repräsentativen Lichtmikroskopischen Aufnahmen von BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren die Anfärbung der

Lipidtröpfchen durch Ölrot nur schwach aus (s. Abb. 4.5a, rechts). Wildtyp-Gewebeschnitte weisen hingegen deutlich erkennbare, Ölrot-gefärbte Bereiche im hepatozytären Gewebeverband auf (s. Abb. 4.5a, links). Während Lebern von BK-defizienten Tieren auch nach Hochfettdiät-Fütterung keine nennenswerten Einlagerungen von Fetten und Triglyceriden aufweisen (s. Abb. 4.5b, rechts) konnte in Biopsien von BK<sup>+/+</sup>-Tieren eine massive Zunahme von Fett-Einlagerungen ins Lebergewebe festgestellt werden (s. Abb. 4.5b, links). Auch hinsichtlich der auf die Tibialänge normierten Lebermassen zeigen sich hochsignifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Bereits vor diätetischer Fütterung (PD) weisen BK-Kanal-defiziente Tiere ein deutlich verringertes Lebergewicht gegenüber ihren Wildtyp-Kontrollen auf (s. Abb. 4.5c). Sowohl nach CD- als auch nach HFD-Fütterung ist dieser, möglicherweise durch vermehrte Fetteinlagerung bedingte, Anstieg an Lebermasse in Wildtyp-Tieren noch stärker ausgeprägt (s. Abb. 4.5c). BK-defiziente Mäuse scheinen hingegen vor einer fütterungsbedingten Zunahme der Lebermasse geschützt zu sein.

Autophagie, auch als Autophagozytose bezeichnet, beschreibt die Degradation von nicht mehr benötigten Zellbestandteilen und -organellen sowie den Abbau von Nahrungsbestandteilen wie Proteinen oder Fetten und ist somit ein wichtiger und potenter Mechanismus zur Regulation des Lipid-Stoffwechsels. Sie ermöglicht eine Elimination von aufgenommenen Fetten in Form von Triglyceriden (Lavallard and Gual, 2014). Dabei kommt es in einem ersten Schritt zur Initiation, d.h. Proteine, Lipidtröpfchen oder Zellorganellen werden von einer Membran umschlossen und es kommt zur Bildung des Autophagosoms. Durch dessen Fusion mit einem Hydrolasen-enthaltenden Lysosom kommt es zur Ausbildung des sogenannten Autolysosoms, in welchem die enthaltenen Nährstoffe und Zellbestandteile enzymatisch abgebaut werden. Die Autophagosomen tragen an ihrer Oberfläche eine Reihe von Proteinen, unter anderem die leichte Kette 3 (Typ II) des Mikrotubuli-assoziierten Proteins (LC3-II), welches aus Phosphatidylethanolamin-gebundenem LC3-I (LC3 Typ I) besteht. LC3-II wird in frühen Stadien des autophagozytären Prozesses mit Hilfe des Autophagie-assoziierten Proteins 7 (ATG7) aus LC3-I gebildet und während der Entstehung des Autolysosoms aus dessen Membran verdrängt und freigesetzt. Dementsprechend steht ein hohes LC3-II/LC3-I-Verhältnis für ein hohes Maß an ablaufender Autophagie innerhalb einer Zelle. Weitere Autophagie-assoziierte Proteine sind beispielsweise der ATG5-ATG12-Komplex, der an der Bildung des Autophagosoms beteiligt ist oder Beclin1, welches eine wichtige Rolle bei der Fusion von Lysosom und Autophagosom spielt. Die Untersuchung verschiedener Autophagozytose-Markern in Leberbiopsien von BK<sup>+/+</sup>- und BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren mittels Western Blot Proteinanalyse, konnte weder nach CD, noch nach HFD Unterschiede in der Proteinexpression von ATG7, Beclin1 oder des ATG5-ATG12-Komplexes aufzeigen (s. Abb. 4.5d). Allerdings war sowohl in den CD-gefütterten Tieren, als insbesondere auch nach HFD-Fütterung, ein massiv reduzierter LC3-II-Proteingehalt bei BK-Defizienz detektierbar. Gleichzeitig waren die Konzentrationen an LC3-I in BK<sup>L1/L1</sup>-Lebern deutlich erhöht, was in Summe zu einem massiven Abfall des LC3-II/LC3-I-Verhältnisses in diesen Tieren führte und somit einen Hinweis auf eine stark reduzierte Autophagie in BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen darstellt (s. Abb. 4.5d).

Diese Befunde weisen darauf hin, dass die globale Deletion des BK-Kanals vor massiver Fetteinlagerung in die Leber zu schützen scheint und als Folge daraus auch die Fett-induzierte Autophagie in BK-Kanal-defizienten Tieren reduziert ist.



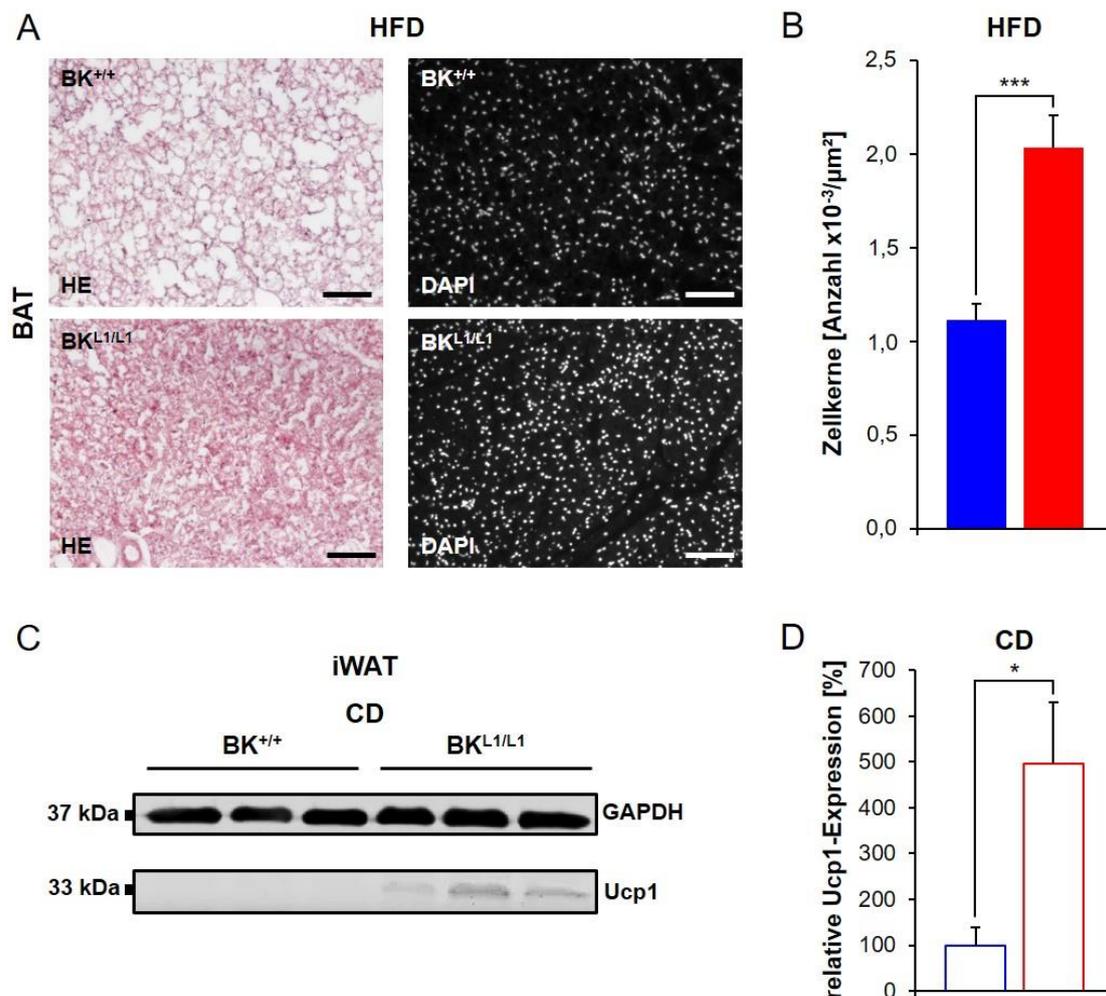
**Abb. 4.5: Hepatische Ölrot- und Autophagie-Analyse globaler BK-Tiere**

Repräsentative Darstellung von Ölrot-gefärbten, 8 µm dicken Gefrierschnitten aus Lebern von Wildtyp- (BK<sup>+/+</sup>, n=3) und BK-Kanal-defizienten (BK<sup>L1/L1</sup>, n=3) Tieren nach Kontrolldiät (CD)- (A) oder Hochfettdiät (HFD)-Fütterung (B). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Gewebeausschnitt pro Tier. Fetteinlagerungen sind als rot angefärbte Tropfen zu erkennen. BK<sup>L1/L1</sup>-Gewebe weist hierbei im Vergleich zu BK<sup>+/+</sup>-Tieren sowohl nach CD als auch insbesondere nach HFD deutlich geringere Abschnitte an Ölrot-gefärbten Fetteinlagerungen auf. (C) Die Lebermasse, normiert auf die Tibiallänge (TL), ist vor diätetischer Fütterung (PD) in den BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren (rot, n=3) verglichen mit Wildtyp-Kontrollen (blau, n=3) sehr signifikant verringert. Nach CD Fütterung (BK<sup>+/+</sup> n=9, BK<sup>L1/L1</sup> n=6) ist dieser Unterschied ebenso wie nach HFD-Fütterung (BK<sup>+/+</sup> n=20, BK<sup>L1/L1</sup> n=12) noch stärker ausgeprägt und hochsignifikant. (D) Die mittels Western Blot-Analyse ermittelte Menge an Autophagie-spezifischen Marker-Proteinen in der Leber, wie dem Autophagie-assoziierten Protein 7 (ATG7), Beclin-1 oder dem Komplex aus Autophagie-assoziiertem Protein 5 und 12 (ATG5-ATG12), weist weder nach CD- noch nach HFD-Fütterung Unterschiede zwischen den Genotypen auf. Nach CD-Fütterung war in BK<sup>L1/L1</sup>-Proben die Expression der leichten Kette 3 Typ I des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1A/1B (LC3-I) erhöht, wohingegen die Abundanz des LC3-II (Typ II) Proteins vermindert zu sein scheint. Nach HFD-Fütterung sind sowohl die verminderte LC3-II-Expression als auch die erhöhte LC3-I-Expression in

BK<sup>L1/L1</sup>-Lebern im Vergleich zu BK<sup>+/+</sup>-Proben noch stärker ausgeprägt (n=3 pro Genotyp und Diät). Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) stellt die Ladungskontrolle dar. Die Untersuchung der Autophagie-Marker wurde von der Arbeitsgruppe H.U. Simon, Pharmakologisches Institut, Universität Bern durchgeführt. **(A, B)** Maßstabsbalken entsprechen 50 µm. **(C)** Abbildung zeigt Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

#### **4.1.5 Hypertrophie des braunen Fettgewebes in Abhängigkeit der BK-Kanal-Expression**

Adipositas entsteht, wie bereits beschrieben (s. Kapitel 1.2), in der Regel durch eine Imbalance an zugeführter Energie und Energieverbrauch. Ein wichtiger Anteil des Energieverbrauches stellt neben der Bildung von ATP zur Aufrechterhaltung der Körperfunktionen insbesondere die zitterfreie Generierung von Wärme in Mitochondrien-reichem braunem Fettgewebe dar (Klingenspor et al., 2012; Flachs et al., 2013). Da Vorversuche einen signifikanten Anstieg der Körpertemperatur in weiblichen BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren nach HFD-Fütterung zeigen konnten und auch in männlichen Mäusen eine ähnliche Tendenz zu erkennen war (unpublizierte Daten von Anette Schürmann, Potsdam-Rehbrücke), sollten im Rahmen dieser Arbeit potentielle BK-abhängige Veränderungen hinsichtlich der Morphologie und Funktion von BAT untersucht werden. Basierend auf diesen Befunden wurden 8-µm Gefrierschnitte aus BAT nach HFD-Fütterung angefertigt um morphologische Untersuchungen zu ermöglichen. HE-Färbung repräsentativer Schnitte offenbarten eine deutliche Hypertrophie des BAT in BK<sup>+/+</sup>-Tieren nach HFD-Fütterung, welche in BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen nicht zu sehen war (s Abb. 4.6a, linke Spalte). Die Anfärbung der Zellkerne mittels Hoechst<sup>®</sup> ermöglichte eine Visualisierung der Zellkerndichte, welche in BK<sup>L1/L1</sup> bei mikroskopischer Betrachtung deutlich höher ausgeprägt zu sein scheint (s. Abb. 4.6a, rechte Spalte). Dieser Befund konnte durch Quantifizierung der Zellkerndichte mittels FIJI-Software (s. Kapitel 3.5.4) bestätigt werden. So zeigt sich in braunem Fettgewebe von BK-Kanal-defizienten Tieren eine hochsignifikant höhere Anzahl an Zellkernen pro Fläche (s. Abb. 4.6b). Die Gefrierschnitte wurden ebenso wie die Färbungen in Zusammenarbeit mit Tanja Burke im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte basierend auf diesen Daten mittels FIJI-Software zu einem späteren Zeitpunkt.



**Abb. 4.6: Einfluss von BK-Kanälen auf BAT-Morphologie und Ucp1-Expression in iWAT nach HFD-Fütterung**

(A) Repräsentative Darstellung von Hämatoxylin & Eosin (HE)-gefärbten 8 μm starken Gefrierschnitten aus braunem Fettgewebe (BAT) von BK-Kanal-defizienten (BK<sup>L1/L1</sup>) und Wildtyp-Tieren (BK<sup>+/+</sup>) nach Hochfett-diät-Fütterung (HFD) (linke Spalte) zeigt eine verminderte Hypertrophie der BK<sup>L1/L1</sup> BAT-Zellen. Zellkerne sind dunkelviolett gefärbt, Zellmembranen pink dargestellt. In der rechten Spalte sind repräsentative Ausschnitte aus Hoechst<sup>®</sup>-gefärbten Gefrierschnitten zur Visualisierung der Zellkerndichte dargestellt. Die BK<sup>L1/L1</sup>-Gewebe weisen hierbei eine deutlich höhere Anzahl an Zellkernen pro Fläche auf. (B) Die Quantifizierung der Zellkerndichte, von jeweils 4-8 Gewebe-Aufnahmen pro Tier aus BK<sup>+/+</sup>- (n=7) und BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen (n=4) mittels FIJI-Software, zeigt eine hochsignifikant höhere Zellkerndichte in BK<sup>L1/L1</sup>- im Vergleich zu BK<sup>+/+</sup>-Schnitten. (C) Western Blot Analyse des Uncoupling Protein 1 (Ucp1) in Leistenfett (iWAT) zeigt stärkere Ucp1-Proteinexpression in BK<sup>L1/L1</sup> nach HFD-Fütterung. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) dient als Ladungskontrolle. (D) Die Quantifizierung der Ucp1-Proteinexpression, normalisiert auf GAPDH, ist in BK<sup>L1/L1</sup> (n=6) gegenüber der Wildtypkontrolle (n=6) um ca. 400% signifikant erhöht. Die HE- und Hoechst<sup>®</sup>-Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit Tanja Burke im Rahmen einer Masterarbeit angefertigt. (A) Maßstabsbalken entsprechen 100 μm. (B, D) BK<sup>+/+</sup> ist in blau dargestellt, BK<sup>L1/L1</sup> in rot. Abbildungen zeigen Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001.

#### 4.1.6 Vermehrte Expression von Ucp1 in iWAT nach CD hat keinen Effekt auf die Körperkerntemperatur von BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen

Die Fähigkeit des BAT, zitterfreie Thermogenese zu betreiben, wird in hohem Maße vom *Uncoupling Protein 1* (Ucp1) beeinflusst. Dieses ist in der Lage, die Atmungskette in Mitochondrien zu entkoppeln und die Generierung von Wärme an Stelle von ATP zu medieren. Neben seiner klassischen Expression in braunem Fettgewebe kann Ucp1 auch in sogenanntem beigem Fettgewebe exprimiert werden, einem Intermediärtyp aus weißem und braunem Fettgewebe, welcher Eigenschaften beider Fettzelltypen in sich vereint. Das Maß an braunen Fettzellen innerhalb eines eigentlich weißen Fettdepots (*Browning*) kann durch die Expressionsanalyse von Ucp1 bestimmt werden. Ucp1 kann dementsprechend als Marker-Protein für die Funktionalität von braunem Fettgewebe hinsichtlich zitterfreier Thermogenese sowie als Marker für das *Browning* von weißem Fettgewebe herangezogen werden. Die Untersuchung der Ucp1-Expression in iWAT globaler BK-Tiere nach CD-Fütterung mittels Western Blot ergab Hinweise auf eine deutlich erhöhte Expression von Ucp1 in iWAT von BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren gegenüber Wildtyp-Kontrollen (s. Abb. 4.6c). GAPDH diente als Ladungskontrolle und zur Normierung der Ucp1-Spiegel. Die Quantifizierung der im Western Blot ermittelten Ucp1-Expression konnte die zuvor erhobenen Befunde bestätigen. Normalisiert auf GAPDH ist die auf den Wildtyp bezogene, prozentuale Expression von Ucp1 in BK<sup>L1/L1</sup>-iWAT annähernd 4-fach erhöht und unterscheidet sich somit hochsignifikant von der Ucp1-Expression in Kontrollgeweben (s. Abb. 4.6d).

Auf Grund dieser Befunde, sowie der Voruntersuchungen von A. Schürmann (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke), wurden mittels telemetrischer Messung sowohl die Körpertemperatur als auch die lokomotorische Aktivität von BK-Tieren nach CD- oder HFD-Fütterung untersucht (s. Kapitel 3.4.3). Die Tiere durchliefen hierbei ihren gewohnten 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Das 24-Stunden Profil der Körperkerntemperatur zeigt für diese Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen auf (s. Suppl. Abb. 4a). Auch die mittlere Körpertemperatur während der Nacht, des Tages sowie das Gesamtmittel über 24 Stunden unterscheiden sich nicht (s. Suppl. Abb. 4b). Bei der Erfassung der lokomotorischen Aktivität konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Tagesverlauf (s. Suppl. Abb. 4c) oder den gemittelten Hell- oder Dunkelphasen erfasst werden (s. Suppl. Abb. 4d). Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den Untersuchungen der Körpertemperatur und Aktivität nach HFD. Auch hier verlaufen die Temperaturkurven der BK<sup>+/+</sup>- sowie der BK<sup>L1/L1</sup>-Mäuse im Tagesverlauf nahezu identisch (s. Suppl. Abb. 4e), wodurch sich auch im Tagesmittel, sowie im Mittel über die Dunkelphase oder das 24-Stunden-Intervall keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ergeben (s. Suppl. Abb. 4f). Auch die Aktivität der Tiere nach Hochfettdiät unterscheidet sich weder im 24-Stunden Profil (s. Suppl. Abb. 4g), noch in den über die aktive Phase oder Ruhephase der Tiere gemittelten Werten (s. Suppl. Abb. 4h).

Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Tanja Burke im Rahmen einer Masterarbeit, bestärken die hier erhobenen Befunde insofern, dass die in der Masterarbeit durchgeführten Messungen der Rektaltemperatur im Alter von 10 Wochen ebenfalls keine Unterschiede zwischen BK-Kanal-defizienten Tieren und ihren Wildtyp-Kontrollen aufzeigten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Deletion des BK-Kanals zwar vor einer massiven Hypertrophie des braunen Fettgewebes schützt und auch ein verstärktes *Browning* von iWAT nach CD-Fütterung induzieren kann, die global BK-Kanal-defizienten Tiere nach Kontrolldiät- oder Hochfettdiät-Fütterung aber dennoch keine messbar erhöhte Körpertemperatur im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen aufweisen.

#### 4.1.7 Primärkulturen verschiedener Fettgewebe

Vorausgegangene Untersuchungen legen nahe, dass neben den bereits gezeigten Effekten von neuronalen BK-Kanälen (Beisan Mohammad, unveröffentlichte Dissertation, Universität Tübingen, 2014) auch periphere Effekte des BK-Kanals zum schlanken Phänotyp der global BK-Kanal-defizienten Tiere beitragen.

Die bisherigen Befunde dieser Arbeit unterstützen diese Vermutung, da sowohl hinsichtlich der Fettmassen und Körperstrukturanalyse (s. Abb. 4.3e-h), als auch in Bezug auf Morphologie und Funktionalität verschiedener Fettdepots (s. Abb. 4.3e-h + Abb. 4.6a-b) klare Unterschiede zwischen Wildtyp und BK-Kanal-defizienten Tieren *in vivo* aufgezeigt werden konnten. Ausgehend von diesen Befunden, sollten im Folgenden weitere Untersuchungen insbesondere zur Reifung und Proliferation von Präadipozyten und Fettzellen aus verschiedenen Fettdepots *in vitro* durchgeführt werden. Ziel dieser Versuche war es, die möglicherweise BK-Kanal-abhängigen Reifungs- oder Wachstumsdefekte in Fettzellen direkt zu betrachten. In dem hier verwendeten Präadipozyten-Modell ist ein Einfluss nicht-adipozytärer BK-Kanäle, beispielsweise über neuronale, metabolische oder endokrine Signalwege, auf die Fettzellfunktion unwahrscheinlich.

##### 4.1.7.1 BK-Kanal-Ablation führt zu einer erhöhten Zahl an reifen Fettzellen in epididymalen WAT-Kulturen

Um die Rolle der BK-Kanäle hinsichtlich Reifung und/oder Wachstum untersuchen zu können, wurden zunächst Primärkulturen mit epididymalen Präadipozyten angelegt. Nach Isolation der Zellen (s. Kapitel 3.5.8.2) folgte eine circa 14-tägige Differenzierungs- und Reifungsphase, während derer geeignete Induktionsmedien die Differenzierung der Präadipozyten zu Fettzellen auslösten (s. Kapitel 3.5.8.3). Durch Zugabe eines adäquaten Reifungsmediums konnten diese im Folgenden schließlich zu Lipid-gefüllten-Adipozyten ausreifen (s. Kapitel 3.5.8.3). Um eine Visualisierung und anschließende Quantifizierung der Fettzellen zu ermöglichen wurden die Kulturen nach 14-tägiger Kultivierung mittels Ölrot angefärbt (s. Kapitel 3.5.8.4).

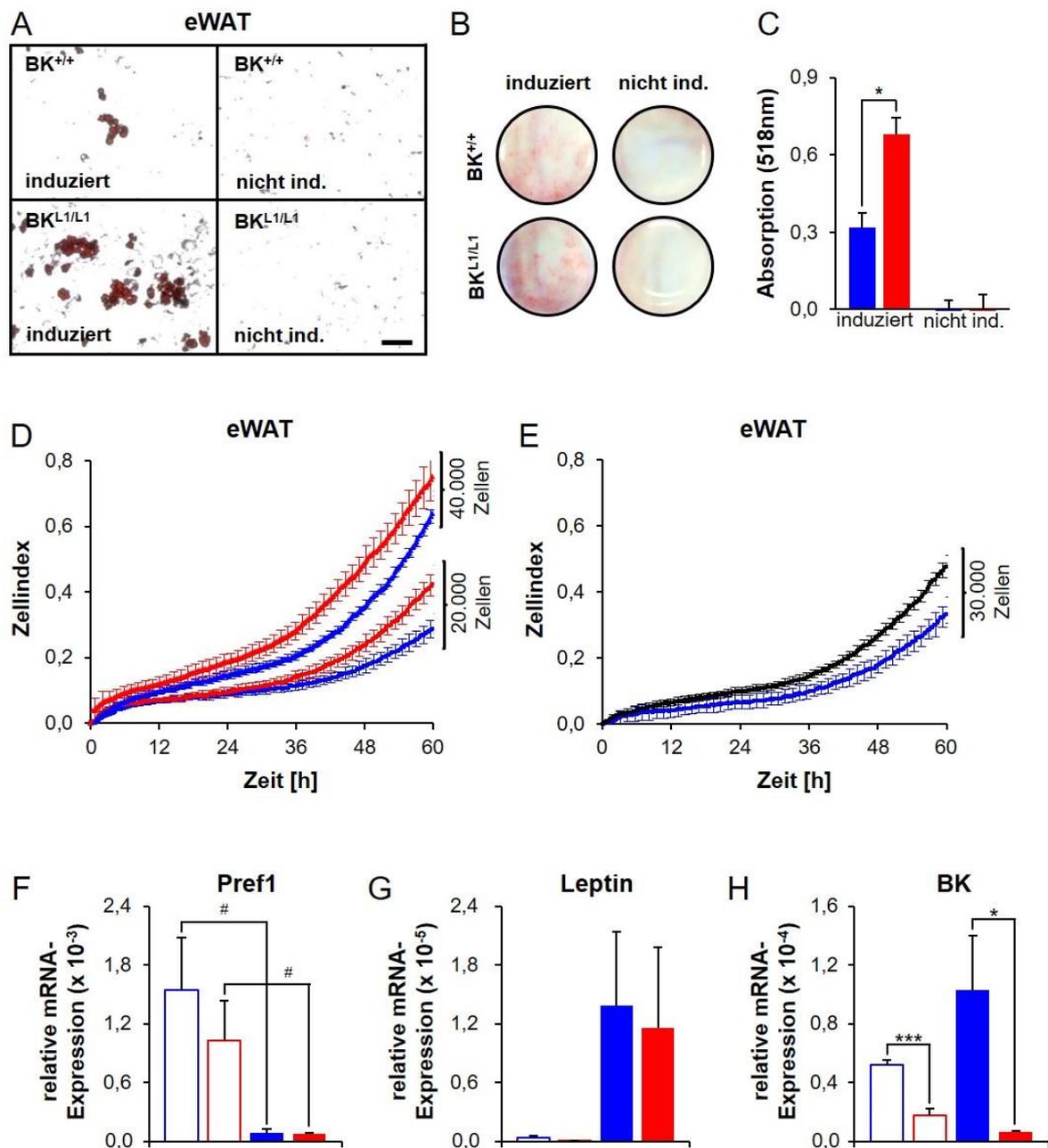
Lichtmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Kulturen zeigen unerwarteter Weise eine deutlich erhöhte Bildung von reifen Adipozyten in BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen *in vitro* (s. Abb. 4.7a). Auch Übersichtsaufnahmen der gesamten Kulturgefäße bestätigen diese deutliche Ölrot-Färbung der BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen (s. Abb. 4.7b). In den Negativkontrollen, bei welchen keine Induktion der Fettzelldifferenzierung erfolgte, zeigten sich erwartungsgemäß bei keinem der beiden Genotypen Lipid-gefüllten Fettzellen, was die Funktionalität des Differenzierungsprotokolls bestätigt (s. Abb. 4.7a-c). Die darauf folgende Quantifizierung des in die Fettzellen eingeschlossenen Ölrot durch Elution mit Isopropanol und anschließender photometrischer Vermessung bei einer Wellenlänge von 518nm (s. Kapitel

3.5.8.4) konnte die mikroskopisch erhobenen Befunde bestätigen. Die Absorptionswerte der BK<sup>L1/L1</sup>-Ölrot-Proben waren nach Induktion signifikant höher als die Werte der entsprechenden Wildtypproben (s. Abb. 4.7c). Auf Impedanz-Messungen basierende Echtzeit-Untersuchungen zum Wachstum der Vorläuferzellen im xCELLigence-System (s. Kapitel 3.5.9) deuten darauf hin, dass BK-Kanal-defiziente Zellen, unabhängig von der ausgebrachten Ausgangszellzahl pro Messkammer, ein deutlich stärkeres Wachstum aufweisen, als die parallel untersuchten Wildtyp-Zellen (s. Abb. 4.7d). Ebenso wie die genetische Deletion des Kanals führte auch seine pharmakologische Blockade durch Zugabe von Paxillin (Endkonzentration 1 µM) *in vitro* zu einem verstärkten Wachstum der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Fettzellkulturen.

Es bleibt unklar, ob es sich bei den beobachteten Unterschieden um verstärkte Proliferation oder ein vermehrtes Wachstum der Zellen im Sinne einer Hypertrophie handelt. Das xCELLigence-System den Widerstand der gold-beschichteten Bodenplatte, was lediglich das Ausmaß des adhärennten Bewuchses der Platten mit Zellen detektiert. Aussagen zur Zellzahl, sowie der Qualität oder Zusammensetzung dieses Bewuchses sind daher mit diesem System nur mit Einschränkungen möglich.

Zur genaueren Charakterisierung der eWAT-Kulturen wurden aus diesem Grund auch qRT-PCR-basierte mRNA-Expressionsanalysen bestimmter Differenzierungs- und Proliferationsmarker sowohl unmittelbar vor (Tag 4-5), als auch nach der Induktion der Zelldifferenzierung und anschließender Reifung der Fettzellen (Tag 14) durchgeführt.

Die Untersuchung der mRNA-Expression des Präadipozyten-Markers Pref1 ergibt keinen Hinweis auf eine veränderte Differenzierung der Fettvorläuferzellen in Abhängigkeit von der BK-Kanal-Expression. Sowohl vor, als auch nach der Induktion der Fettzellreifung sind keinerlei signifikante Unterschiede der Pref1-Expression zwischen den beiden Genotypen festzustellen (s. Abb. 4.7f). Der fast vollständige Rückgang der Pref1-mRNA-Expression in den BK<sup>+/+</sup>- und BK<sup>L1/L1</sup>-Proben nach Induktion des adipozytären Reifungsprozesses bestätigt dabei die hohe Effektivität des hier verwendeten Differenzierungsprotokolls, da offensichtlich annähernd alle Fettvorläuferzellen in Adipozyten umgewandelt werden konnten (s. Abb. 4.7f). Der starke Anstieg von Leptin-mRNA ist, analog zur Abnahme an Pref1, als Indikator der guten Differenzierung und Reifung der Kulturen zu werten, da nur reife Adipozyten in der Lage sind Leptin zu bilden. Auch die Analyse der Leptin-Expression ergab keine Unterschiede zwischen den Genotypen, was möglicherweise durch die sehr starke Varianz der Leptin-mRNA-Level in den stimulierten Proben bedingt ist (s. Abb. 4.7g). Neben Reifungsmarkern wurde auch die Expression des BK-Kanals in Vorläuferzellen, wie auch in reifen Fettzellen untersucht. Bereits in Präadipozyten (vor Induktion) war die Expression der BK-mRNA in den BK<sup>+/+</sup>-Kulturen im Vergleich zu BK-Kanal-defizienten Zellen hochsignifikant erhöht. Das dennoch detektierbare mRNA-Signal in BK-Kanal-defizienten Kulturen ist vermutlich auf Fluoreszenzbildung in unspezifischen PCR-Randprodukten zurückzuführen, da auch in Kontrollproben ohne cDNA (sogenannte -RT Proben), eine Fluoreszenzentwicklung in annähernd identischem Umfang festzustellen war (s. Suppl. Abb. 5a).



**Abb. 4.7: Untersuchung zur Reifung und Fettakkumulation von Präadipozyten-Kulturen aus eWAT**

(A) Lichtmikroskopische Aufnahmen von Ölrot-gefärbten, repräsentativen Ausschnitten einer ausgereiften Präadipozyten-Kultur aus epididymalem Fett (eWAT) zeigen nach 14-tägiger Fettzellreifung *in vitro* eine vermehrte Anzahl an reifen, Ölrot-positiven Adipozyten. Die Anzahl der Ölrot-gefärbten Zellen war in BK-defizienten Fettvorläuferzellen (BK<sup>L1/L1</sup>) verglichen mit Wildtypzellen (BK<sup>+/+</sup>) erhöht. Negativkontrollen (nicht ind.), ohne Induktion der Fettzellreifung, zeigen keine Ölrot-gefärbten reifen Fettzellen. (B) Übersichtsaufnahmen der Kulturgefäße zeigen ebenfalls eine vermehrte Ölrot-Färbung der BK<sup>L1/L1</sup> Zellkultur-Platten. (C) Photometrische Bestimmung des Ölrot-Gehaltes bei 518nm. Die Absorptionswerte der Proben waren nach Elution aus den differenzierten BK<sup>L1/L1</sup>-Zellkulturen (in rot dargestellt, n=4) signifikant erhöht gegenüber BK<sup>+/+</sup>-Proben (in blau dargestellt, n=4). (D) Die Echtzeit-Analyse des Zellindex mittels Impedanz-Analyse zeigt, für unterschiedliche Zellzahlen, ein verstärktes Wachstum der BK<sup>L1/L1</sup> Zellen gegenüber den WT-Zellen *in vitro*. (E) Die pharmakologische Blockade des BK-Kanals durch die Zugabe von Paxillin (1 µM Endkonzentration, schwarz) führte ebenfalls zu einem verstärkten Wachstum gegenüber unbehandelten Wildtypzellen (blau). (F-H) Analyse verschiedener messenger RNA-Expressionen (mRNA) mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR),

normiert auf  $\beta$ -Aktin, vor Induktion (Tag 4-5) der Fettzellreifung (offene Balken) sowie an Tag 14 der Kultur (ausgefüllte Balken). BK<sup>+/+</sup> ist in blau dargestellt, BK<sup>L1/L1</sup> in rot. Die mRNA-Expression des Präadipozyten-Faktor 1 (Pref1) nimmt nach Induktion der Fettzellreifung in beiden Genotypen signifikant ab (**F**), während die Expression von Leptin nach Induktion der Fettzellreifung klar erhöht ist (**G**). Die BK-Kanal-Expression in BK<sup>+/+</sup>-Zellen ist sowohl vor Induktion, als auch in reifen Adipozyten-Kulturen gegenüber BK<sup>L1/L1</sup>-Proben signifikant erhöht (vor Induktion: BK<sup>+/+</sup> n=5, BK<sup>L1/L1</sup> n=5; nach Induktion: BK<sup>+/+</sup> n= 6, BK<sup>L1/L1</sup> n= 5). (**A**) Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m. (**C, F-H**) Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*/# p < 0,05, \*\*\* p < 0,001.

Außerdem ergab die BK-Expressionsanalyse, dass die mRNA-Level des BK-Kanals in reifen Adipozyten etwas stärker ausgeprägt zu sein scheinen, als in Fettvorläuferzellen. Diese Tendenz erreichte jedoch auf Grund der hohen Varianz nicht das Signifikanzniveau (Abb. 7h). Untersuchungen zur BK-Kanal Protein-Expression mittels Western Blot Analyse, welche in der Arbeitsgruppe von Prof. Mike Shipston (Zentrum für integrative Physiologie, Universität Edinburgh) durchgeführt wurden, zeigen neben einer erhöhten Expression des Glucose-Transporters 4 (GLUT4) insbesondere auch eine deutliche Zunahme der BK-Kanal Expression in Adipozyten im Vergleich zu Präadipozyten (s. Suppl. Abb. 5b), was in Einklang mit den hier erhobenen mRNA-Befunden steht. Die Gruppe um Mike Shipston konnte im Rahmen dieser Kollaboration außerdem zeigen, dass die BK-Kanal assoziierten Ionenströme in Adipozyten im Vergleich zu Fettvorläuferzellen deutlich stärker ausgeprägt sind (s. Suppl. Abb. 5c), was ebenfalls einen Anstieg der Anzahl membranständiger BK-Kanäle in reifen Fettzellen impliziert.

Die zuvor beobachtete vermehrte Bildung reifer Fettzellen in BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen *in vitro* (s. Abb. 4.7a-c) war auf Grund des schlanken Phänotyps (s. Abb. 4.3a+c) und insbesondere der signifikant geringeren Fettakkumulation dieser Tiere (s. Abb. 4.3e+f) eher überraschend. Folgende Erklärungsansätze für diese zunächst kontrovers erscheinenden Befunde sind daher plausibel: Zum einen könnte die vermehrte Fettakkumulation (s. Abb. 4.3e+f) in Wildtyptieren *in vivo* durch eine massive Hypertrophie, und nicht durch eine Hyperplasie an Fettzellen bedingt sein. Darüber hinaus implizieren die *in vitro* beobachteten Effekte bezüglich Zellzahl (s. Abb. 4.7d+e) und Ölrot-Akkumulation (s. Abb. 4.7a-c) in den BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen nicht unbedingt eine vermehrte Bildung von weißen Fettzellen, sondern sind möglicherweise viel mehr ein Indikator für ein vermehrtes *Browning*, also einer vermehrten Ausbildung brauner Fettzellen innerhalb des eigentlich weißen Fettdepots.

Um insbesondere diese letzte Hypothese zu überprüfen wurde eine Reihe von *Browning*-Markern und anderer Fettzell-Marker mit Hilfe von qRT-PCR basierter mRNA-Expressionsanalyse untersucht. Weder die Expression von Ucp1, einem klassischen braunen Fettzellmarker, noch die Expression von Prdm16, einem Protein welches als Transkriptions-Coregulator die Bildung von braunen Fettzellen mediiert, wies hierbei signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen auf. Auch der Peroxisom-Proliferator aktivierte Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), welcher als nukleärer Rezeptor die Speicherung von Fettsäuren in Fettzellen sowie den Glucose-Metabolismus reguliert, sowie der PPAR $\gamma$ -Coaktivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ), scheinen nicht in Abhängigkeit von der BK-Kanal Expression moduliert zu werden (s. Suppl. Abb. 5d). In reifen Fettzellen ist jedoch die mRNA-Expression des Adipozyten-Differenzierungs- und Determinierungsfaktor 1 (ADD1) in BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen hochsignifikant erhöht. ADD1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher *in vivo* vor allem in braunen Fettzellen

exprimiert wird und auch bei der Determinierung und Differenzierung von braunen Fettzellen *in vitro* eine wichtige Rolle spielt (Tontonoz et al., 1993). Des Weiteren zeigte sich auch die Expression von Adiponektin (APN), einem Hormon welches von reifen Fettzellen sezerniert wird und in die Regulation des Glucose-Metabolismus sowie den Abbau von Fettsäuren involviert ist (Diez and Iglesias, 2003; Nedvidkova et al., 2005), in BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen signifikant erhöht gegenüber Wildtyp-Zellen. Die erhöhte APN-Expression ist vermutlich auf die vermehrte Bildung reifer Adipozyten, und damit einer höheren Anzahl an potentiell Hormon-sezernierenden Zellen, zurückzuführen (s. Suppl. Abb. 5d).

Die Untersuchungen an Präadipozyten-Kulturen aus eWAT hinsichtlich Differenzierung, Reifung und Wachstum ergaben zusammengenommen eine signifikant erhöhte Anzahl an reifen BK<sup>L1/L1</sup>-Fettzellen *in vitro*. Ob dieser kontrovers erscheinende Effekt durch ein vermehrtes *Browning* der Kulturen oder tatsächliche Unterschiede in der Menge weißer Fettzellen bedingt ist, bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

#### **4.1.7.2 Wachstum und Reifung von iWAT-Präadipozytenkulturen werden nicht von BK-Kanälen beeinflusst**

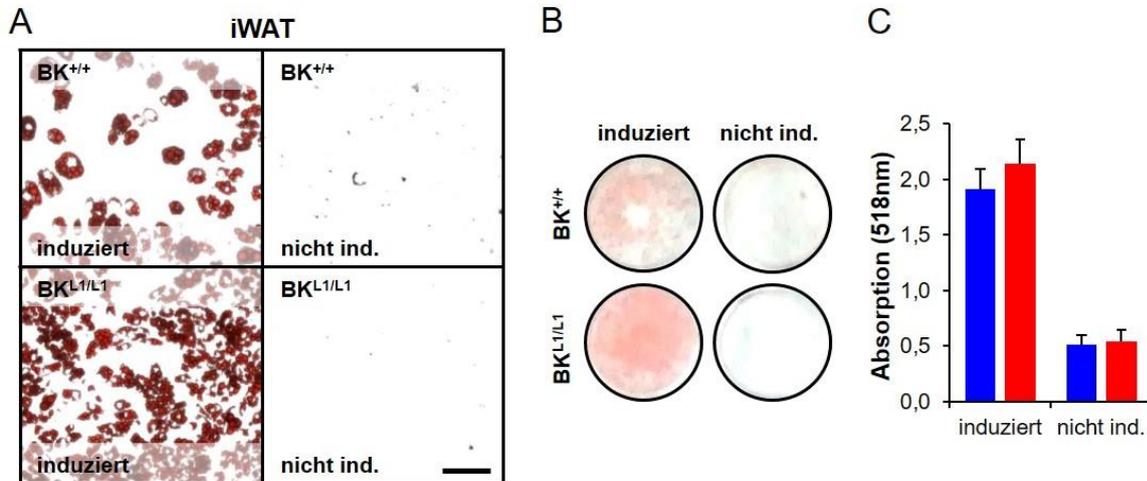
In einem alternativen Präadipozyten-Kulturmodell wurden Fettvorläuferzellen aus dem iWAT von BK<sup>+/+</sup>- und BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen untersucht. Dieses Fettdepot stellt ein potentes Gewebe zur Generierung von Primärkulturen dar, da es sich gegenüber eWAT durch eine besonders hohe Effizienz hinsichtlich der Ausbeute an adulten Fettzellen nach Differenzierung aber auch durch eine deutliche gesteigerte Induzierbarkeit des *Brownings*, die sogenannte *Browning*-Kapazität, beispielsweise nach Zugabe cyclischer Nukleotide auszeichnet (Pfeifer et al., 2013).

Die Differenzierung und Reifung der aus Leistenfett gewonnenen Präadipozyten-Kulturen erfolgte wie in Kapitel 3.5.8 beschrieben. Nach 13-tägiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und die inkorporierten Triglyceride mittels Ölrot angefärbt. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der gefärbten Kulturen (hier beispielhaft an Tag 13) zeigten generell eine deutlich stärker ausgeprägte Differenzierungseffizienz der Präadipozyten aus iWAT gegenüber eWAT-Kulturen. Dies wird bereits durch die hohe Dichte an rotgefärbten, reifen und lipidgefüllter Adipozyten in BK<sup>+/+</sup>-Kulturen aus Leistenfett deutlich. Die Fettzellendichte in BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen scheint gegenüber Wildtypzellen nach Induktion leicht erhöht, die Fettzellen selbst erscheinen jedoch weniger lipidgefüllt (Abb. 8a). Auch Übersichtsaufnahmen der Zellkulturgefäße zeigen eine deutliche Rotfärbung beider Genotypen nach Induktion der Kulturen, wohingegen in nicht behandelten Negativkontrollen kaum Fettzellen nachweisbar sind (Abb. 8b). Die Quantifizierung des inkorporierten Ölrot (s. Kapitel 3.5.8.4) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Allerdings ist eine tendenziell leicht erhöhte Ölrot-Quantität in BK<sup>L1/L1</sup>-Zellen zu verzeichnen. Auf Grund der recht ausgeprägten Variabilität der einzelnen Kulturen ist jedoch weder hinsichtlich der direkten Absorption (Abb. 8c) noch in Bezug auf den relativen, auf Wildtyp-Zellen normalisierten, Ölrotgehalt (s. Suppl. Abb. 5g) ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen zu verzeichnen.

Wie in der Literatur beschrieben (Haas et al., 2009; Mitschke et al., 2013; Pfeifer et al., 2013), führte die Behandlung der iWAT Zellen mit 8Br-cGMP (Endkonzentration 100 µM), einem gegenüber hydrolytischem Abbau durch Phosphodiesterasen stabilen und zellpermeablen cGMP-Analogon, zu einer Steigerung der Anzahl lipidgefüllter BK<sup>+/+</sup>-Fettzellen, sowie zu einer

vermehrten Farbstoff-Inkorporation nach 13-tägiger Kultivierung. In den BK-Kanal-defizienten Kulturen war eine ähnliche, wenn auch deutlich schwächer ausgeprägte Effekte zu erkennen (s. Suppl. Abb. 5e). Übersichtsaufnahmen der Kulturgefäße konnten diese Befunde weiter untermauern. So konnte durch die Zugabe von 8-Br-cGMP in Wildtyp-Kulturen, wie auch in der Literatur beschrieben (Mitschke et al., 2013), eine vermehrte Farbstoffinkorporation in Fettzellen nach Ölrot-Färbung sichtbar gemacht werden (s. Abb. 4.8b und Suppl. Abb. 5f). Der relative Anstieg der jeweiligen Ölrot-Absorptionswerte von BK<sup>+/+</sup>- und BK<sup>L1/L1</sup>-Zellen nach 8-Br-cGMP Exposition war dabei annähernd identisch. Dass dieser cGMP-Effekt in BK<sup>L1/L1</sup>-Zellen im Gegensatz zu den Wildtyp-Kulturen nicht signifikant ist, ist möglicherweise auf die hohen Varianzen zwischen den einzelnen Kulturansätzen zurückgeführt werden. Außerdem ist in BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen bereits ohne cyclische Nukleotide eine sehr hohe Dichte an Fettzellen zu verzeichnen (s. Abb. 4.8b, linke Spalte), so dass fraglich ist ob sich die Menge an Fettzellen durch 8-Br-cGMP-Gabe noch wesentlich weiter erhöhen kann oder stattdessen bereits eine Sättigung der Kulturgefäße vorliegt.

Zusammengefasst scheinen die durch 8-Br-cGMP erzielten Differenzierungs- und Reifungseffekte der iWAT-Prädipozytenkulturen nicht von der BK-Kanal-Expression abhängig zu sein. Vielmehr lassen die Daten zur 8-Br-cGMP-abhängigen Fettzellreifung vermuten, dass der BK-Kanal, welcher eine gut charakterisierte Zielstruktur des cGMP-Signalweges in zahlreichen Zelltypen darstellt (Alioua et al., 1995; Alioua et al., 1998; Schubert and Nelson, 2001; Cui et al., 2009), cGMP-unabhängige Effekte auf das *Browning* bzw. eine vermehrte Adipogenese der iWAT-Kulturen hat.



**Abb. 4.8: Untersuchung zur Reifung und Fettakkumulation von Prädipozyten-Kulturen aus iWAT**

**(A)** Lichtmikroskopische Aufnahmen von Ölrot-gefärbten, repräsentativen Ausschnitten einer ausgereiften Prädipozyten-Kultur aus Leistenfett (iWAT) zeigen nach 14-tägiger Fettzellreifung *in vitro*, eine tendenziell leicht vermehrte Anzahl an reifen Adipozyten in Kulturen aus BK-defizienten Fettvorläuferzellen (BK<sup>L1/L1</sup>) verglichen mit Wildtypzellen (BK<sup>+/+</sup>). Negativkontrollen (nicht ind.), ohne Induktion der Fettzellreifung, zeigen keine Ölrot-gefärbten reifen Fettzellen. **(B)** Übersichtsaufnahmen der Kulturgefäße zeigen ebenfalls eine stärkere Rotfärbung der BK<sup>L1/L1</sup> Zellkultur-Platten nach Ölrot-Färbung. **(C)** Photometrische Bestimmung des Ölrot-Gehaltes nach Elution bei 518nm. Nach 8-Br-cGMP Behandlung ist kein signifikanter Unterschied in der Ölrot-Akkumulation zwischen BK<sup>L1/L1</sup>- (n=7) und BK<sup>+/+</sup>-Kulturen (n=8) erkennbar. **(A)** Maßstabsbalken entspricht 100 µm. **(C)** Abbildung zeigt Mittelwerte ± Standardfehler (SEM).

#### 4.1.7.3 Einfluss der cyclischen Nukleotid-Analoga 8-Br-cGMP und Sp-cAMPS auf das Wachstum und die Reifung von Präadipozyten aus BAT

Bisherige Befunde legen die Vermutung nahe, dass die globale Deletion des BK Kanals Einfluss auf das *Browning* von Leistenfett *in vivo* zu haben scheint (s. Abb. 4.6c-d). Darüber hinaus scheint der BK-Kanal Knockout braunes Fettgewebe offensichtlich auch direkt vor einer übermäßigen Hypertrophie zu schützen (s. Abb. 4.6a+b). Um die zellulären Mechanismen, welche diesen Befunden zu Grunde liegenden, näher untersuchen zu können wurden im Rahmen dieser Arbeit auch BAT-Präadipozyten-Kulturen angelegt.

Da die mesenchymalen Stammzellen, welche als Vorläuferzellen des BAT fungieren, bereits wenige Tage nach der Geburt ihre spontane Differenzierungsfähigkeit einbüßen, wurden die BAT-Präadipozyten-Kulturen aus interscapularem braunem Fettgewebe von neugeborenen Tieren an Tag 0 bis Tag 2 nach der Geburt (p0-p2) angelegt. Im Gegensatz zu anderen Versuchen wurden hierbei die Gewebe männlicher und weiblicher Tiere genutzt und zusammengeführt. Außerdem war es aus technischen Gründen nicht möglich, BAT-Präadipozyten-Kulturen mit einer genetisch bedingt BK-Kanal-Defizienz zu generieren (s. Kapitel 3.5.8.1 für weitere Details). Aus diesem Grund in allen Experimenten Paxillin, in einer Endkonzentration von 4  $\mu\text{M}$ , als pharmakologischer BK-Kanal-Blocker eingesetzt.

Während der 8-tägigen Kultivierungsdauer der BAT-Kulturen erfolgte alle 48 Stunden ein Mediumwechsel mit BAT-MS-CM. Im Gegensatz zu weißen Fettvorläuferzellen können mesenchymale Stammzellen spontan zu braunen Fettzellen differenzieren und benötigen hierfür keine spezielle Stimulation durch ein Induktionsmedium. Nach 8 Tagen konnten die lipidgefüllten Fettzellen fixiert und mittels Ölrot angefärbt werden (s. Kapitel 3.5.8.4).

Die Blockade des BK-Kanals durch Zugabe von Paxillin führte *in vitro* zu einer Zunahme an adulten Fettzellen zum Ende der Kultivierungszeit (s. Abb. 4.9a, linke Spalte). Dies spiegelt sich auch in einer signifikanten Erhöhung des relativen Ölrot-Gehaltes wieder ( $118,7 \pm 11,2\%$ ), welcher mit Hilfe photometrischer Bestimmung ermittelt wurde (s. Kapitel 3.5.8.4) (s. Abb. 4.9b).

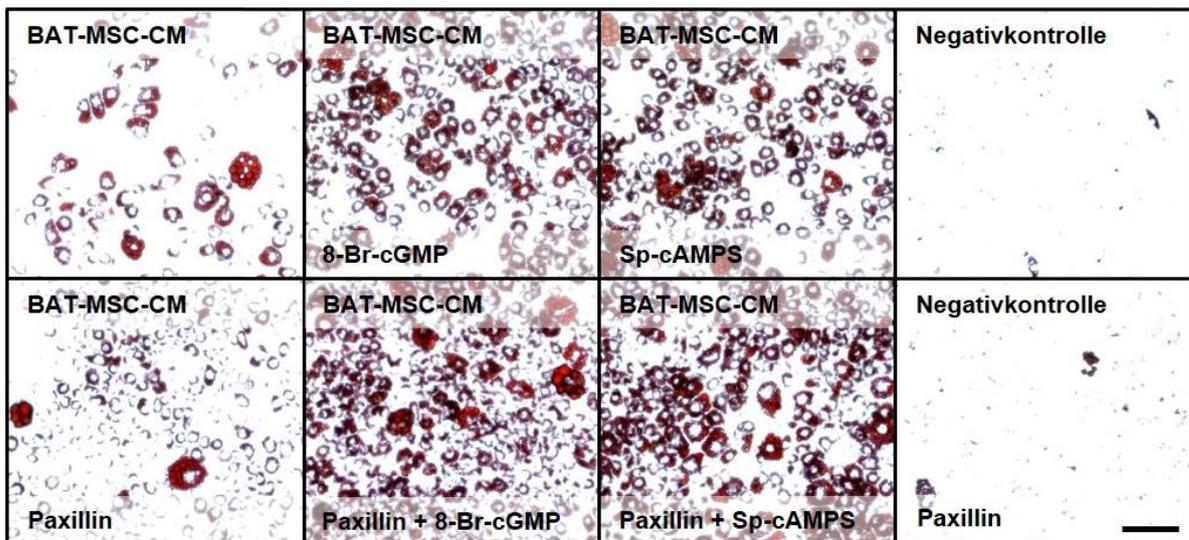
Die cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP stimulieren bekanntlich sowohl die Zelldifferenzierung von Präadipozyten, als auch die Fettzellreifung und resultiert somit in einer erhöhten Menge an adulten braunen Fettzellen (Ayala et al., 2007; Colombo et al., 2013; Mitschke et al., 2013; Pfeifer et al., 2013; Kim et al., 2014). Die Zugabe des zellpermeablen und stabilen cGMP-Analogons, 8-Br-cGMP (Endkonzentration 100  $\mu\text{M}$ ), führte auch in den hier untersuchten BAT-Kulturen zu einer massiven Zunahme an reifen Fettzellen (s. Abb. 4.9a) und damit einhergehend zu einer hochsignifikanten Steigerung der Ölrot-Absorptionswerte um mehr als 50 % ( $155,2 \pm 10,8\%$ ) (s. Abb. 4.9b). Auch die Supplementierung des BAT-MS-CM Kulturmediums mit Sp-cAMPS, einem Membran-permeablen und gegenüber Phosphodiesterasen stabileren cAMP-Analogon, konnte die Generierung reifer Fettzellen im Vergleich zu BAT-MS-CM massiv steigern (s. Abb. 4.9a) und resultierte in einem ebenfalls hochsignifikanten Anstieg der Triglyceridkonzentration, gemessen am Ölrotgehalt. Die Steigerung betrug hierbei knapp 50% ( $149,1 \pm 11,2\%$ ) (Abb. 9b). Die Co-Stimulation der Zellen mit Paxillin und 8-Br-cGMP führte zu synergistischen Effekten. D.h. einerseits zu einer noch stärker ausgeprägten Generierung reifer Adipozyten (Abb. 9a), sowie daraus resultierend auch

zu einer hochsignifikanten nahezu Verdopplung des Fettgehaltes der entsprechenden Kulturen ( $193,4 \pm 21,9\%$ ) (s. Abb. 4.9b).

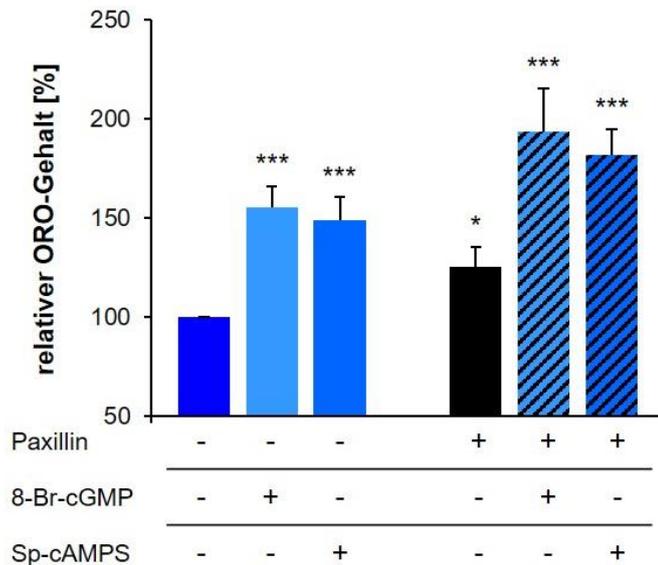
Sowohl die pharmakologische Blockade des BK-Kanals, als auch die Behandlung der BAT-Prädipozyten mit cyclischen Nukleotid-Analoga resultierten in einer signifikanten Steigerung der Differenzierung und/oder Fettzellreifung *in vitro*. Dabei zeigten sich synergistische Effekte der BK-Kanal-Hemmung durch Paxillin und den cAMP/cGMP-Analoga, d.h. es war eine weitere Steigerung der Ölrot-Absorptionswerte erkennbar. Dieser scheint über ein rein additives Maß hinaus zu gehen. Die gleichzeitige BK-Kanal-Blockade und Aktivierung von cAMP/cGMP-Signalwegen scheint demnach die BAT-Prädipozyten-Reifung bzw. -Differenzierung zu begünstigen.

Bei beiden cyclischen Nukleotiden führt die gleichzeitige Blockade des BK-Kanals durch Paxillin außerdem zu einer Steigerung des Fettgehaltes der reifen Kultur, gemessen an der Ölrot-Konzentration, der über rein additive Effekte hinaus zu gehen scheint. Vielmehr scheinen hier synergistische Prozesse abzulaufen, welche durch gleichzeitige BK-Kanal-Blockade und Aktivierung von cAMP/cGMP-Signalwegen begünstigt werden.

A



B



**Abb. 4.9: Untersuchung zur Reifung und Fettakkumulation von Präadipozyten-Kulturen aus braunem Fettgewebe**

(A) Lichtmikroskopische Aufnahmen von Ölot-gefärbten, repräsentativen Ausschnitten einer ausgereiften Präadipozyten-Kultur aus BAT von Wildtyp-Tieren ( $BK^{+/+}$ ) zeigen *in vitro* nach 8-tägiger Fettzellreifung in BAT-MSC-CM (Kulturmedium für BAT-Kulturen aus mesenchymalen Vorläuferzellen) ausgereifte braune Fettzellen. Die pharmakologische Blockade des BK-Kanals durch Paxillin ( $4 \mu\text{M}$  Endkonzentration) führt zu einer vermehrten Reifung von Vorläuferzellen zu adulten Fettzellen (erste Spalte). Die Zugabe von 8-Br-cGMP ( $100 \mu\text{M}$  Endkonzentration) sorgt nach 8-tägiger Inkubation sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Paxillin für einen Anstieg der Fettzellreifung (zweite Spalte). Ebenso führt das cAMP-Analogon Sp-cAMPS (Endkonzentration  $100 \mu\text{M}$ ) zu einer vermehrten Entstehung von adulten, lipidgefüllten Fettzellen (dritte Spalte). Die Negativkontrolle ohne BAT-MSC-Kulturmedium weist kaum reife Fettzellen auf (vierte Spalte). (B) Photometrische Bestimmung des Ölot-Absorptionswertes bei  $518\text{nm}$  zeigt eine signifikant erhöhte Ölot-Inkorporation in Paxillin-behandelten Kulturen (schwarz,  $n=8$ ) gegenüber unbehandelten  $BK^{+/+}$ -Zellen (dunkelblau,  $n=9$ ). 8-Br-cGMP Exposition (hellblau,  $n=9$ ) resultiert in einem hochsignifikanten Anstieg des relativen Ölotgehaltes, bezogen auf die  $BK^{+/+}$ -Zellen in BAT-MSC-CM ohne Zusatz von Paxillin und/oder cAMP/cGMP-Analoga. Ein ebenfalls hochsignifikanter Anstieg der Ölot-Absorptionswerte bei  $518 \text{ nm}$  wurde durch die

gleichzeitige Exposition der Zellen mit Paxillin und 8-Br-cGMP (hellblau/schwarz gestreift, n=6) erreicht. Sp-cAMPS Stimulation alleine (mittelblau, n=8) oder Sp-cAMPS mit Paxillin (mittelblau/schwarz gestreift, n=6) führten ebenfalls zu einem hochsignifikanten Anstieg des relativen Ölrot-Gehaltes. **(A)** Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . **(B)** Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , alle Signifikanzen beziehen sich auf BAT-MS-CM.

## 4.2 Analyse der ob/ob X BK-Doppelmutanten

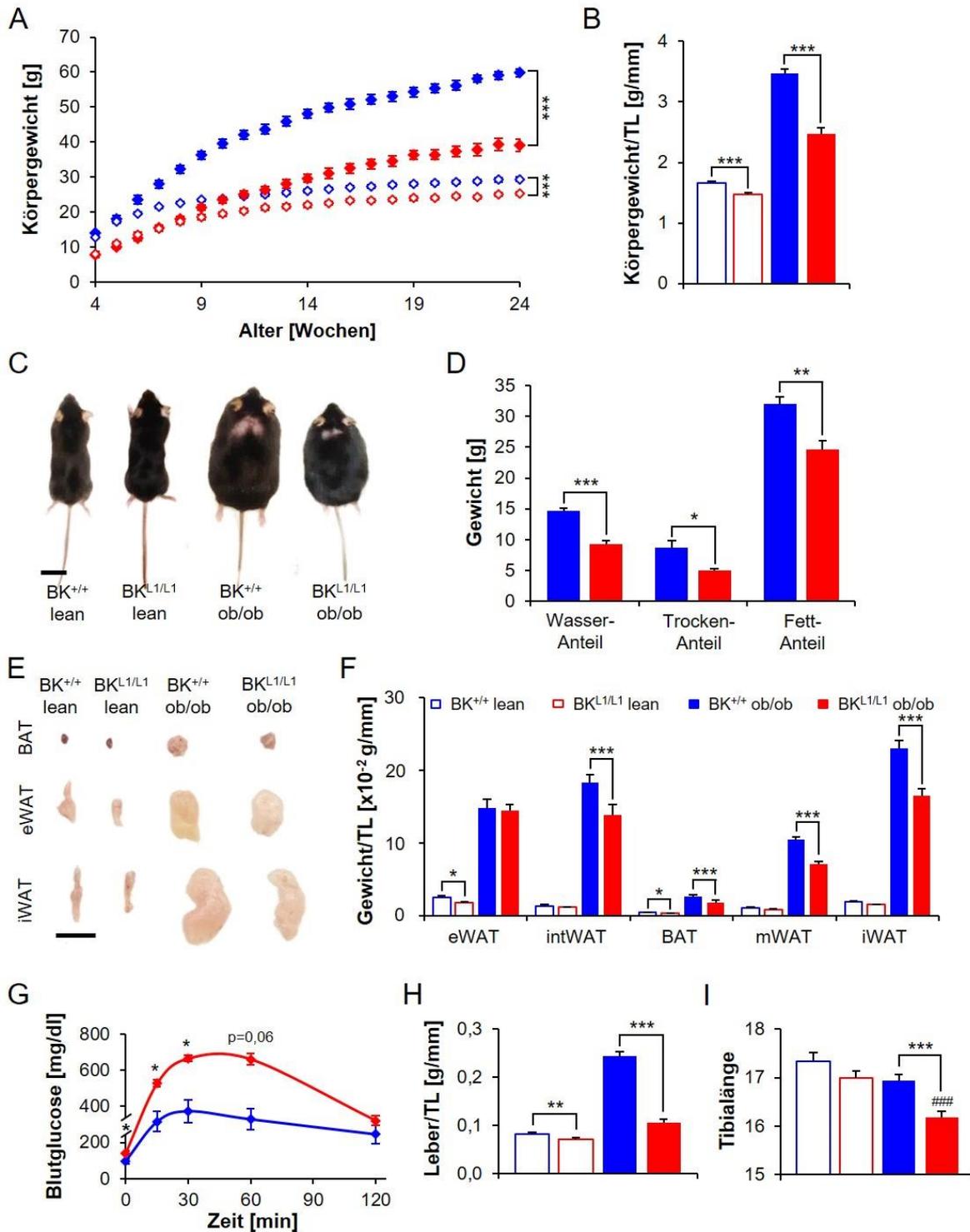
Die bisher erhobenen Befunde zeigen ganz klar, dass die globale Deletion des BK-Kanals Mäuse effektiv vor massiver Gewichtszunahme und exzessiver Fetteinlagerung bei HFD-Fütterung zu schützen vermag. Auch metabolische Folgeerkrankungen der Gewichts- und Fettakkumulation wie beispielsweise die NAFLD oder eine Insulinresistenz scheinen durch die Deletion des BK-Kanals beeinflussbar zu sein. Angesichts dieser Befunde stellt sich die Frage, inwiefern die Deletion des BK-Kanals auch eine aufgrund genetischer Ursachen bereits bestehende Adipositas therapieren kann.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die globale Deletion des BK-Kanals den schwer adipösen Phänotyp eines etablierten Adipositas-Mausmodells aufzuheben vermag, oder diesen zumindest partiell mildert. Zu diesem Zweck wurden BK-Kanal-defiziente und Wildtyp-Tiere mit ob/ob-Mäusen und deren Wildtyp-Kontrollen verpaart und die daraus resultierenden Doppelmutanten in Hinblick auf Körpergewichtsentwicklung, Fettakkumulation sowie bezüglich metabolischer Parameter untersucht (s. Kapitel 3.2.2 für Details zur Generierung der Tiere). Bei den ob/ob-Mäusen handelt es sich um Tiere mit einer Punktmutation in dem für Leptin codierenden „obese“-Gen. Auf Grund dieser Mutation sind die betroffenen Tiere nicht in der Lage, funktionales Leptin-Protein zu bilden (s. Kapitel 3.2.2 und Kapitel 1.3.2.2). Basierend auf der Mutation des Leptin-Gens und dem daraus resultierenden Mangel eines Sättigungsgefühls, kommt es in ob/ob-Mäusen zu einer massiven und unkontrollierten Nahrungsaufnahme. In Folge dessen sind ob/ob-Mäuse durch eine schwerwiegende Adipositas und eine Reihe massiver Folgeerkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus Typ 2, Insulinresistenz, gesteigerten Entzündungsparametern und NAFLD charakterisiert.

### 4.2.1 Partieller Schutz vor exzessiver Fetteinlagerung, Gewichtszunahme und metabolischen Veränderungen in ob/ob Mäusen bei gleichzeitiger BK-Kanal-Defizienz

Die Körpergewichtsentwicklung der schlanken Tiere ( $\text{Lep}^{+/+}$ , lean) unter der Fütterung mit normalem Chow-Futter (s. Kapitel 3.4.1) konnte die zuvor unter CD- und HFD-Fütterung erhobenen Befunde bestätigen. Über den gesamten Versuchszeitraum von 20 Wochen weisen die schlanken  $\text{BK}^{\text{L1/L1}}$ -Tiere hochsignifikant verringerte Körpergewichte gegenüber den  $\text{BK}^{+/+}$ -Kontrolltieren auf. In männlichen  $\text{BK}^{+/+}$  ob/ob- Probanden kommt es hingegen bereit ab einem Alter von 6-7 Wochen zu einer enormen Zunahme des Körpergewichtes, welches in einem finalen Körpergewicht von  $58,46 \pm 1,43$  g (gegenüber  $29,4 \pm 0,63$  g  $\text{BK}^{+/+}$  lean) resultiert. Interessanterweise war das Körpergewicht der BK-negativen ob/ob-Tiere über den gesamten Versuchszeitraum hochsignifikant verringert und das finale Körpergewicht der Doppelmutanten war um annähernd 33% reduziert ( $38,99 \pm 1,66$  g). Das finale Körpergewicht

der schlanken  $BK^{L1/L1}$ -Tiere beläuft sich am Ende des Versuches auf  $25,36 \pm 0,37$  g (s. Abb. 4.10a) und lag somit beinahe 4 g unter dem mittleren Vergleichsgewicht der schlanken  $BK^{+/+}$ -Tiere. Auch bei weiblichen Tieren ist ein ähnlicher Effekt zu verzeichnen (s. Suppl. Abb. 6): Schlanke  $BK^{+/+}$ -Mäuse weisen gegenüber  $BK^{L1/L1}$  ein hochsignifikant höheres Körpergewicht während des gesamten Observationszeitraumes auf und erreichen ein finales Körpergewicht von  $24,14 \pm 0,28$  g ( $BK^{L1/L1}$   $20,31 \pm 0,61$  g). Während das Gewicht der schlanken weiblichen Tiere somit etwas geringer ausfällt als das der männlichen Versuchstiere, führt die homozygote Mutation des Leptin-Gens in weiblichen  $BK^{+/+}$ -Tieren zu einer ebenso extrem ausgeprägten Gewichtszunahme wie in Männchen. Dies resultiert bei den weiblichen Tieren bereits ab einem Alter von 4-5 Wochen in deutlichen Gewichtsunterschieden gegenüber den schlanken Kontrollen. Das finale Körpergewicht der  $BK^{+/+}$  ob/ob Weibchen erreicht im Alter von 24 Wochen  $59,05 \pm 1,07$  g. Die BK-Kanal-Ablation führte wiederum zu einem hochsignifikant um beinahe 20 g reduzierten Endgewicht der weiblichen Mäuse ( $BK^{L1/L1}$  ob/ob  $40,98 \pm 2,34$  g) (s. Suppl. Abb. 6a). Da sich, wie bereits beschrieben (s. Kapitel 4.1.2.1), die Körpergröße der  $BK^{L1/L1}$ -Tiere, vermutlich auf Grund von Entwicklungsstörungen, signifikant von jener ihrer korrespondierenden Wildtyp-Wurfgeschwister unterscheidet und auch die Mutation des Leptin-Gens weiteren Einfluss auf diese Differenzen zu nehmen scheint (s. Abb. 4.10i + Suppl. Abb. 6i), wurde eine Normierung der Körper- wie auch der untersuchten Fettgewichte auf die TL vorgenommen. Für die männlichen Tiere ergab sich dabei ein hochsignifikanter Unterschied des finalen Körpergewichtes zwischen den schlanken  $Lep^{+/+}$ -Tieren ( $BK^{+/+}$   $1,66 \pm 0,04$  g/mm,  $BK^{L1/L1}$   $1,47 \pm 0,03$  g/mm) sowie zwischen den ob/ob-Kohorten ( $BK^{+/+}$   $3,47 \pm 0,07$  g/mm,  $BK^{L1/L1}$   $2,35 \pm 0,11$  g/mm) (s. Abb. 4.10b). Auch bei den Weibchen waren die normierten Finalgewichte zwischen den BK-Genotypen hochsignifikant verschieden ( $BK^{+/+}$  lean  $1,38 \pm 0,02$  g/mm und  $BK^{L1/L1}$  lean  $1,21 \pm 0,03$  g/mm, sowie  $BK^{+/+}$  ob/ob  $3,53 \pm 0,08$  g/mm und  $BK^{L1/L1}$  ob/ob  $2,71 \pm 0,09$  g/mm) (s. Suppl. Abb. 6b). Repräsentative Fotografien der vier untersuchten Genotypen zeigen sowohl in männlichen (s. Abb. 4.10c), als auch in weiblichen Tieren (s. Suppl. Abb. 6c) ganz deutlich die massiv erhöhte Körpermasse der ob/ob Mäuse gegenüber ihren schlanken Wurfgeschwistern. Die hochsignifikante Gewichtsreduktion der  $BK^{L1/L1}$  ob/ob-Tiere war im Vergleich zu  $BK^{+/+}$  ob/ob-Mäusen in beiden Geschlechtern deutlich zu erkennen. Diese Gewichtsunterschiede sind zumindest teilweise auch das Resultat der unterschiedlichen Körpergrößen der BK-Kanal-defizienten ob/ob Tiere und den entsprechenden  $BK^{+/+}$  ob/ob Kontrollen.



**Abb. 4.10: Untersuchung von BK X ob/ob Doppelmutanten**

(A) Gewichtsentwicklung von Wildtyp-Tieren (BK<sup>+/+</sup> lean, blau umrandet) und global BK-Kanaldefizienten Mäusen (BK<sup>L1/L1</sup> lean, rot umrandet) sowie BK<sup>+/+</sup> ob/ob (blau ausgefüllte Rauten und Balken) und BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob Doppelmutanten (rot ausgefüllte Rauten und Balken) mit Zugang zu normalem Chow-Futter. BK<sup>+/+</sup>-Tiere (n=17) zeigen über den gesamten Versuchszeitraum ein hochsignifikant erhöhtes Körpergewicht gegenüber ihren BK<sup>L1/L1</sup>-Wurfgeschwistern (n=21). Die Deletion des BK-Kanals führt in den doppelmutanten BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob Mäusen (n=25) zu einer hochsignifikanten Reduktion des Körpergewichtes gegenüber BK<sup>+/+</sup> ob/ob Tieren (n=25). (B) Das auf die Tibiallänge (TL) normierte finale Körpergewicht im Alter von 24 Wochen, ist in BK<sup>L1/L1</sup> (n=12) hochsignifikant reduziert gegenüber BK<sup>+/+</sup> (n=9). Darüber hinaus resultiert die Deletion des BK-Kanals auch in BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob (n=13) in einer hochsignifikanten Reduktion des Körpergewichtes gegenüber BK<sup>+/+</sup> ob/ob (n=17). (C) Repräsentative

Fotos von Tieren im Alter von 24 Wochen. **(D)** Die Analyse der Körperstruktur mittels Soxhlet-Fettextraktion zeigt signifikante Gewichts-Reduktionen in allen Kompartimenten der BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob Tiere (n=4) im Vergleich zur BK<sup>+/+</sup> ob/ob Kontrollgruppe (n=5). **(E)** Repräsentative Darstellung von braunem Fettgewebe (BAT), epididymalem Fett (eWAT) und Leistenfett (iWAT) der verschiedenen Genotypen im Alter von 24 Wochen. **(F)** Das Gewicht unterschiedlicher Fettdepots, normiert auf die TL, ist in schlanken BK<sup>L1/L1</sup> (n=13) in eWAT und BAT signifikant erniedrigt gegenüber schlanken BK<sup>+/+</sup>-Tieren (n=9). Bei interscapularem weißem Fett (intWAT), dem mesenterischen Fettdepot (mWAT) sowie iWAT ist kein signifikanter Unterschied erkennbar. Bei den global BK-defizienten Doppelmutanten (n=13) ist gegenüber den BK<sup>+/+</sup> ob/ob Tieren (n=17) eine hochsignifikante Reduktion der, auf die Tibialänge normierten, Fettmasse in intWAT, BAT, mWAT und iWAT zu beobachten, während sich das eWAT-Gewicht nicht unterscheidet. **(G)** Die Untersuchung des Glucose-Stoffwechsels mittels intraperitonealem Glucose-Toleranz-Test (i.p. GTT) zeigt stark erhöhte Blutglucose-Spiegel in BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob (n=4) gegenüber BK<sup>+/+</sup> ob/ob (n=6) sowohl basal (0 min) als auch 15 und 30 min nach Glucose-Injektion. **(H)** Die Deletion des BK-Kanals erzielt sowohl in lean Kohorten als auch bei den BK ob/ob Doppelmutanten eine hochsignifikante Reduktion der Lebermasse/TL-Ratio. **(I)** Die Tibialänge der schlanken BK<sup>+/+</sup>-Tiere unterscheidet sich nicht signifikant von jener der BK<sup>L1/L1</sup> Tiere. In den Doppelmutanten BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob Mäusen ist eine hochsignifikante Reduktion der TL zu verzeichnen. Diese zeigt sich beim Vergleich mit BK<sup>+/+</sup> ob/ob wie auch gegenüber lean BK<sup>L1/L1</sup> Mäusen. (Signifikanz dargestellt durch #). **(A-I)** Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*/####  $p < 0,001$ . **(C, E)** Maßstabsbalken entsprechen 2 cm.

Neben dem Gesamtkörpergewicht wurde bei den ob/ob BK-Doppelmutanten, analog zur Untersuchung der globalen BK-Tiere, eine Körperstrukturanalyse mittels Trocknung und anschließender Soxhlet-Fettextraktion durchgeführt (s. Kapitel 3.5.1). Diese ergab für männliche BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob eine signifikante Reduktion der Massen aller Kompartimente. So war neben dem Wasseranteil (BK<sup>+/+</sup> ob/ob  $14,73 \pm 0,38$  g, BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob  $9,26 \pm 0,61$  g) auch die Trockenmasse (BK<sup>+/+</sup> ob/ob  $8,70 \pm 1,08$  g, BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob  $4,96 \pm 0,30$  g) sowie der Fettanteil (BK<sup>+/+</sup> ob/ob  $32,06 \pm 1,08$  g, BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob  $24,60 \pm 0,57$  g) signifikant reduziert (s. Abb. 4.10d). In weiblichen Tieren war die Trockenmasse hingegen nicht signifikant verschieden. Sowohl der Wasseranteil (BK<sup>+/+</sup> ob/ob  $12,58 \pm 0,39$  g, BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob  $9,03 \pm 0,67$  g), als auch die Fettmasse (BK<sup>+/+</sup> ob/ob  $35,68 \pm 1,97$  g, BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob  $25,66 \pm 0,18$  g) zeigten jedoch signifikante Abweichungen zwischen den BK-Genotypen auf (s. Suppl. Abb. 6d).

Übersichtsaufnahmen ausgewählter Fettdepots zeigen implizieren eine exorbitant gesteigerte Zunahme an eWAT und iWAT in BK<sup>+/+</sup> ob/ob Tieren gegenüber schlanken Kontrollen. In BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob Tieren fällt dieser Anstieg der iWAT-Fettmasse deutlich geringer aus, wohingegen sich die eWAT-Masse von BK-defizienten ob/ob Tieren kaum von jener, der BK<sup>+/+</sup> ob/ob Mäuse unterscheidet (s. Abb. 4.10e, Suppl. Abb. 6e). Dies steht in Einklang mit den relativen Fettdepotmassen (s. Abb. 4.10f). Das interscapulare braune Fettgewebe scheint durch die homozygote Mutation des Leptin-Gens massiv vergrößert und verliert außerdem seine charakteristische braun-Färbung, was vermutlich mit einer starken Hypertrophie der Fettzellen zusammenhängt. Ähnliche Effekte sind in BK<sup>+/+</sup> Tieren nach HFD zu beobachten (s. Abb. 4.6a).

Eine genaue Untersuchung ausgewählter, auf die Tibialänge normalisierter Fettmassen, in männlichen Tieren offenbarte außerdem eine signifikant gesteigerte Menge an intWAT (BK<sup>+/+</sup> ob/ob  $18,48 \pm 1,02 \times 10^{-2}$  g/mm, BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob  $11,14 \pm 0,91 \times 10^{-2}$  g/mm), BAT (BK<sup>+/+</sup> ob/ob  $2,61 \pm 0,31 \times 10^{-2}$  g/mm, BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob  $1,71 \pm 0,14 \times 10^{-2}$  g/mm), sowie mWAT (BK<sup>+/+</sup> ob/ob  $10,57 \pm 0,37 \times 10^{-2}$  g/mm, BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob  $6,49 \pm 0,66 \times 10^{-2}$  g/mm) und iWAT (BK<sup>+/+</sup> ob/ob  $23,35 \pm 0,95 \times 10^{-2}$  g/mm, BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob  $14,13 \pm 0,95 \times 10^{-2}$  g/mm) gegenüber BK-Kanal-defizienten ob/ob-

Mäusen. Die Menge an eWAT war hingegen nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Genotypen (BK<sup>+/+</sup> ob/ob  $14,88 \pm 0,98 \times 10^{-2} \text{g/mm}$ , BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob  $14,74 \pm 1,12 \times 10^{-2} \text{g/mm}$ ) (s. Abb. 4.10f). Die Deletion des BK-Kanals ist also auch in ob/ob-Tieren in der Lage die übermäßige Fetteinlagerung teilweise zu reduzieren. In weiblichen Tieren waren die Befunde ähnlich. Interscapulares WAT sowie BAT, mWAT und Leistenfett waren in BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob Mäusen gegenüber BK<sup>+/+</sup> ob/ob hochsignifikant reduziert (s. Suppl. Abb. 6f). Lediglich in Hinblick auf die normierte Masse von eWAT ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den ob/ob BK-Genotypen (s. Abb. 4.10f).

Die globale Deletion des BK-Kanals kann dementsprechend auch den adipösen Phänotyp etablierter Adipositas-Mausmodelle, wie beispielsweise der ob/ob-Mauslinie, hochsignifikant verbessern. Möglicherweise wirkt der BK-Kanal-Knockout den aus dem Leptin-Gendefekt resultierenden Störungen der Leptin-Hypothalamus-Achse, sowie den hierdurch bedingten Veränderungen der Körpergewichtsentwicklung und Fetteinlagerung zumindest partiell entgegen.

Wie im CD- und HFD-gefütterten globalen BK-Knockout (s. Abb. 4.4a+b) resultierte die Deletion des BK-Kanals im ob/ob Mausmodell in einer schlechteren Glucose-Stoffwechsellage. Obwohl die BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob weniger Körpermasse und einen geringeren Körperfettanteil aufweisen (s. Abb. 4.10) waren die Blutglucose-Werte der männlichen Versuchstiere sowohl basal (0 min), als auch in Folge eines i.p. GTT (15 und 30 min;  $p = 0,06$  bei 60 min) im Vergleich zu den BK<sup>+/+</sup> ob/ob Wurfgeschwistern signifikant erhöht (s. Abb. 4.10g). In weiblichen Tieren erreichte dieser Effekt auf Grund der deutlichen höheren Blutglucose-Werte der BK<sup>+/+</sup> ob/ob-Tiere jedoch zu keinem Zeitpunkt Signifikanzniveau. Dennoch lässt sich aus dem i.p. GTT auch für die BK-defizienten weiblichen ob/ob Tiere eine klar verschlechterte Glucose-Verstoffwechslung ableiten (s. Suppl. Abb. 6g). Diese Befunde lassen sich möglicherweise mit der im globalen BK-Mausmodell beobachteten signifikant verringerten Insulinfreisetzung in diesen Tieren (s. Abb. 4.4d+e) und der daraus resultierenden schlechten Verwertung der injizierten Glucosemenge erklären.

Auf die Entwicklung des Lebergewichtes in ob/ob-Tieren, scheint die Deletion des BK-Kanals hingegen durchweg positive Effekte zu haben. Während männliche BK<sup>+/+</sup> ob/ob Tiere im Alter von 24 Wochen ein Lebergewicht von  $24,37 \pm 0,87 \times 10^{-2} \text{g/mm}$  aufweisen, beläuft sich dieses bei BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob Tieren lediglich auf  $10,48 \pm 0,87 \times 10^{-2} \text{g/mm}$  (s. Abb. 4.10h). Auch in weiblichen ob/ob-Mäusen führt die Ausschaltung des Kanals zur Reduktion der Lebermasse von  $20,01 \pm 0,93 \times 10^{-2} \text{g/mm}$  auf  $10,6 \pm 0,63 \times 10^{-2} \text{g/mm}$  (s. Suppl. Abb. 6h). Die Deletion des BK-Kanals führt also in beiden Geschlechtern zu einer Reduktion des normalisierten Lebergewichtes. Da dabei davon ausgegangen werden kann, dass die Zunahme der Lebermasse gegenüber schlanken Tieren nicht unwesentlich auf eine vermehrte Einlagerung von Fett in das Leberparenchym zurückzuführen ist (s. Abb. 4.5a+b), stellt die Reduktion der Lebermasse möglicherweise gleichzeitig eine Reduktion der Adipositas-induzierten NAFLD dar und verringert hierdurch das Risiko einer resultierenden Hepatosteatose oder gar eines Leberkarzinoms.

## 4.3 Untersuchungen zum metabolischen Phänotyp der Adipozyten-spezifischen BK-Mauslinie

Die bisherigen Befunde deuten darauf hin, dass die globale Deletion des BK-Kanals weitreichende positive Effekte auf die Entwicklung des Körpergewichtes hat. Die von der Kanalablation ausgehende Protektion war sowohl während Hochkohlenhydrat- als auch Hochfettdiät zu beobachten (s. Abb. 4.3 und Suppl. Abb. 3) und konnte darüber hinaus in einem genetischen Adipositas-Modell bestätigt werden (s. Abb. 4.10). Besonders prominente Befunde dieser Untersuchungen stellen die mit der globalen Deletion des BK-Kanals assoziierte Reduktion der Fettakkumulation (s. Abb. 4.3) sowie durchweg positive Effekte auf die Entstehung einer NAFLD (s. Abb. 4.5) als schwerwiegende Folgeerkrankung von Adipositas dar.

Dass diese Effekte offensichtlich nur teilweise durch zentral-gesteuerte Mechanismen erklärbar sind, konnte von Beisan Mohammad im Zuge ihre Dissertation gezeigt werden. Dementsprechend scheinen neben neuronalen Ursachen auch periphere Effekte zum schlanken Phänotyp der BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere beizutragen. Die im Zuge dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse zur BK-abhängigen Modulation der Fettzellendifferenzierung und -reifung unterstützen diese Hypothese und implizieren außerdem, dass die Ausschaltung der adipozytären BK-Kanäle positive Auswirkungen auf die Körpergewichtsentwicklung und Körperstruktur haben können. Auch die von der Arbeitsgruppe um H. Jiao durchgeführten genomweiten Assoziations-Studien mit menschlichen Probanden konnten in schwer adipösen Studienteilnehmern (BMI >40) hinweise auf BK-Expressionsunterschiede in Fettgewebe und Adipozyten feststellen (Jiao et al., 2011). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im Rahmen dieser Dissertation ein neues Mausmodell mit Fettzell-spezifischer BK-Kanal Ablation generiert (s. Abb. 3.2 und Abb. 4.11).

### 4.3.1 Rekombinationsanalyse der adipoCreERT2-Mauslinie mittels ROSA26 Tomato-Reporter Tieren

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Dissertation ein Mausmodell generiert, mit welchem es möglich ist, den BK Kanal sowohl zu einem bestimmten Zeitpunkt, wie auch ausschließlich in Adipozyten zu deletieren. Ein solches, induzierbares Mausmodell mit Adipozyten-spezifischer Expression der Cre-Rekombinase (s. Kapitel 3.2.3) wurde kürzlich von A. Sassmann und S. Offermanns (Max-Planck-Institut, Bad Nauheim) generiert und für die im Rahmen dieser Dissertation geplanten arbeiten zur Verfügung gestellt.

Um zunächst die Effizienz des adipoCreERT<sup>2</sup>-Modelles zu überprüfen wurden adipoCre<sup>tg/+</sup>-Mäuse mit ROSA Tomato-Reporter Tieren gekreuzt (ROSA 26 Tomato<sup>tom/+</sup>) (s. Kapitel 3.2.4). Diese Cre-Reporter-Mäuse tragen eine zusätzliche Gensequenz, welche für zwei unterschiedlich membranständige, fluoreszierende Proteine codiert. Genauere Informationen sind in Kapitel 3.2.4 näher beschrieben. ROSA Tomato-Reporter Tiere zeichnen sich basal durch eine rote Fluoreszenz aller Gewebe aus, welche durch die Implementierung eines membranständigen Tomato-Fluorophors erreicht wird. Nach Cre-vermittelter Rekombination kommt es zur Deletion des roten Fluorophors (membranständiges td Tomato) und stattdessen zur Expression einer membranständigen grünen Fluoreszenz (EGFP). Die Aktivierung der

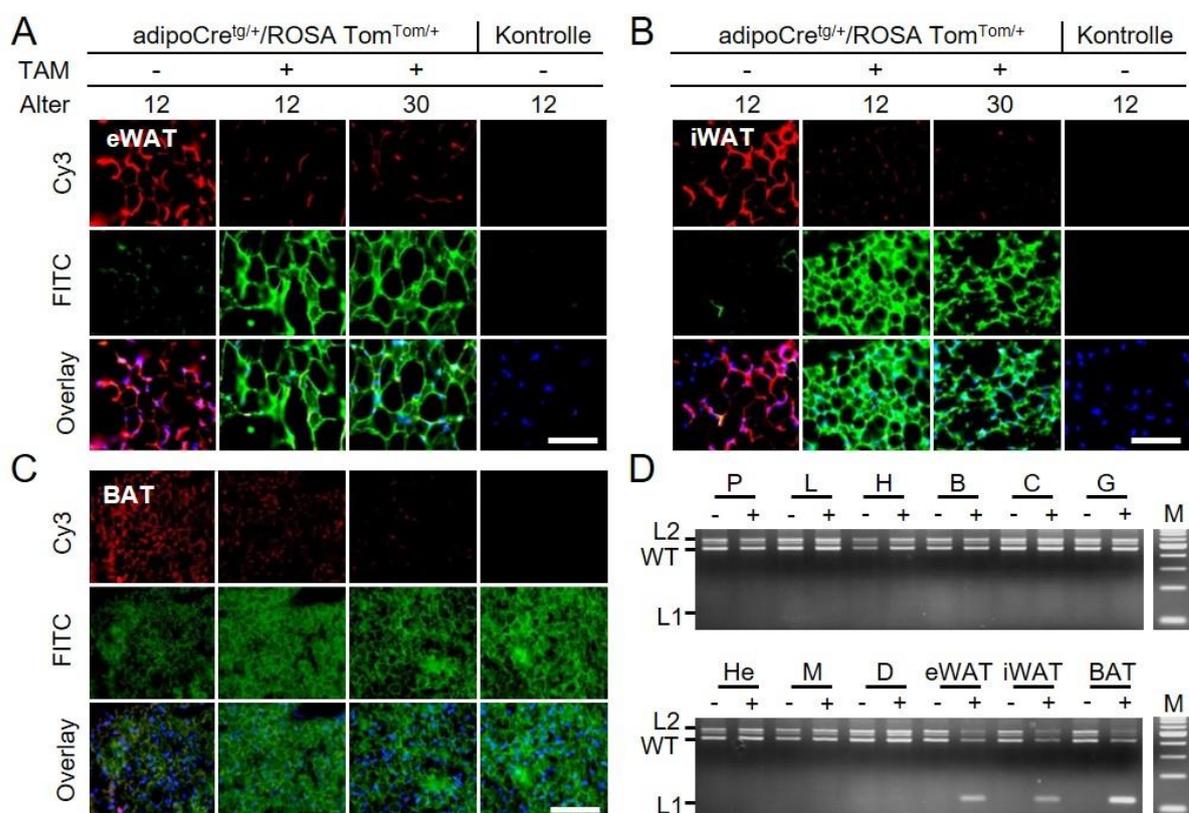
Cre-Rekombinase wird durch die konsekutive Injektion von Tamoxifen (1 mg/Tag) an fünf aufeinander folgenden Tagen im Alter von 10 Wochen ausgelöst (s. Kapitel 3.2.3).

Gefrierschnitte aus epididymalem Fettgewebe (eWAT) dieser doppeltransgenen *adipoCreERT2<sup>tg/+</sup> X ROSA26 Tomato-Reporter* Tiere zeigen nach Injektion des Lösungsmittels (Mygliol®) im Alter von 12 Wochen eine ubiquitäre rote Fluoreszenz, was auf eine Inaktivität einer gegebenenfalls vorhandenen Cre-Rekombinase hindeutet. Im Gegensatz dazu löst die Gabe von Tamoxifen einen nahezu vollständigen Verlust der roten Fluoreszenz im eWAT aus, während gleichzeitig die grüne Fluoreszenz der Gewebeschnitte zunimmt (s. Abb. 4.11a), was der Beweis für die Expression und vor allem die hocheffektive Funktionalität der Cre-Rekombinase darstellt. Gewebeproben von *adipoCreERT2<sup>tg/+</sup> ROSA26 Tomato<sup>tom/+</sup>* Tieren, welche im Alter von 10 Wochen mit Tamoxifen injiziert wurden, bei denen die Organentnahme jedoch erst im Alter von 30 Wochen erfolgte, zeigen ebenfalls eine ausgeprägt grüne Fluoreszenz in eWAT und iWAT (s. Abb. 4.11a+b). Dieser Befund impliziert eindeutig, dass auch zu einem späteren Zeitpunkt die Rekombinase-bedingte Deletion des geflochtenen Genabschnittes persistiert. Kontrollgewebe aus Wildtyp-Tieren ohne Injektion von Tamoxifen weist keine Fluoreszenz auf (s. Abb. 4.11a). Auch in 14 µm dicken Gewebeschnitten von Leistenfett (iWAT) ist eine hocheffektive Effizienz der Cre-Rekombinase durch den völligen Verlust roter Fluoreszenz zu erkennen. Der anhaltende Effekt der Cre-bedingten Gen-Deletion kann auch in diesem Fettdepot durch die anhaltende grüne Fluoreszenz im Alter von 30 Wochen bestätigt werden. Die persistierende rote Fluoreszenz nach Placebo-Injektion sowie die fehlende Fluoreszenz der Negativkontrolle beweisen sowohl die korrekte Expression der Reporter-Sequenz und als auch die Abwesenheit einer Autofluoreszenz des iWAT (s. Abb. 4.11b). Die Effektivität der Cre-vermittelten Rekombination scheint demnach, in Einklang mit der Literatur (Sassmann et al., 2010), sowohl in eWAT als auch in iWAT bei nahezu 100 % zu liegen. Da in der Erstbeschreibung der vermeintlich WAT-spezifischen *adipoCreERT2*-Mäuse jedoch auch von einer etwa 10 %-igen Rekombinationseffizienz in braunem Fettgewebe berichtet wird (Sassmann et al., 2010), wurden auch BAT-Gewebeschnitte hinsichtlich der Effizienz der Cre-Rekombinase untersucht (s. Abb. 4.11c). Nach Injektion einer Kontrolllösung ist in BAT-Gefrierschnitten eine klare rote Fluoreszenz zu erkennen. Die Gabe von Tamoxifen führt hingegen zu einer deutlichen Abschwächung des roten Fluoreszenzsignales im Alter von 12 Wochen. Im Gegensatz zu den WAT-Depots war die im BAT zu beobachtende Rekombination jedoch nicht vollständig, was die Hinweise auf eine partielle Aktivität der *adipoCre*-Rekombinase in diesem Fettdepot bestätigt (Sassmann et al., 2010). Die starke grüne Eigenfluoreszenz erlaubt in braunem Fettgewebe jedoch keine Aussagen über potentielle Veränderungen der grünen Fluoreszenz in Folge einer Tamoxifen-Injektion. Im Alter von 30 Wochen ist jedoch noch immer eine leichte rote Fluoreszenz des Gewebes zu erkennen, was auch hier eine Persistenz der Rekombinase-Effekte impliziert. Zusätzlich macht die sehr kleinzellige Morphologie des BAT eine Quantifizierung der Cre-Rekombinase-Effizienz in diesem Gewebe letztlich unmöglich.

Zur Generierung Adipozyten-spezifischer BK-Mutanten wurden *adipoCreERT2<sup>tg/+</sup>* Tiere mit Mäusen verpaart, deren BK-Gen von zwei loxP-Sequenzen flankiert ist, welche wiederum als Schnittstelle für die Cre-Rekombinase fungieren. (s. Kapitel 3.2.3). Die Gewebe-Spezifität der Cre-Rekombinase konnte durch die Kopplung ihrer Expression an einen Adiponektin-Promotor

erzielt werden (Sassmann et al., 2010). Die durch entsprechende Verpaarungen (s. Abb. 3.2) erhaltenen, doppeltransgenen adipoCreERT2 BK-Tiere (kurz: adipoBK) wurden im Folgenden zunächst hinsichtlich ihrer Gewebe-spezifischen Cre-Expression untersucht. Hierzu erfolgte eine DNA-PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese nach Injektion von Tamoxifen in adipoBK<sup>L2/+</sup>-Tieren. Die Applikation des Cre-Aktivators Tamoxifen resultierte in Geweben mit Cre-Rekombinase-Aktivität in einer Deletion des geflochtenen BK-L2-Allels und somit in der Generierung eines BK-L1-PCR-Produktes. In Geweben, welche die Cre-Rekombinase nicht exprimieren sollte hingegen nach TAM-Gabe keine BK-L1 Bande nachweisbar sein. Die Untersuchung von Pankreas, Leber, Herz, Skelettmuskel und Duodenum ergab keinerlei Expression der Rekombinase. Ebenso wenig konnte in neuronalen Strukturen wie Hypothalamus, Bulb, Cerebellum oder Gesamthirn eine Cre-Aktivität nachgewiesen werden. Sowohl in epididymalem Fettgewebe, als auch in Leistenfett und BAT ist dagegen eine deutliche L1-Bande im Agarose-Gel zu erkennen, was einen Indikator der spezifischen Cre-vermittelten Rekombination des geflochtenen BK-Lokus darstellt (s. Abb. 4.11d).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Fettzell-Spezifität des adipoCreERT2-Modelles eindeutig bestätigt werden konnte. Die Rekombinations-Effizienz in eWAT sowie iWAT scheint dabei nahezu lückenlos, während in BAT keine vollständige Deletion des geflochtenen Gens zu erreichen war.



**Abb. 4.11: Effizienz- und Spezifitäts-Analyse des adipoCreERT2 Mausmodells mittels ROSA26 Tomato-Reporter Tieren**

Repräsentative Aufnahmen von Gefrierschnitten aus adipoCre/ROSA Tomato Doppelmutanten im Alter von 12 oder 30 Wochen. Ohne Applikation von Tamoxifen (TAM -) fluoreszieren alle Gewebe rot. Nach Induktion der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen-Injektion (TAM +) im Alter von 10 Wochen kommt es in allen Geweben mit Cre-Aktivität zur Ausbildung einer grünen Fluoreszenz. Zellkerne sind mittels

Hoechst® angefärbt und fluoreszieren blau. **(A)** Untersuchung von 14-µm Gefrierschnitten aus epididymalem Fett (eWAT) zeigen starke rote Fluoreszenz im Cy3-Kanal vor Tamoxifen-Injektion, während im FITC-Kanal keine grüne Fluoreszenz erkennbar ist. Nach Cre-Aktivierung ist sowohl im Alter von 12 Wochen als auch zu einem späten Zeitpunkt (30 Wochen) eine klare grüne Fluoreszenz zu erkennen. Wildtypkontrollen (Kontrolle) zeigen keine Fluoreszenz des Gewebes. **(B)** Auch in 14 µm dicken Schnitten aus Leistenfett (iWAT) ist eine starke Zunahme der grünen Fluoreszenz und der gleichzeitige Verlust roter Fluoreszenz durch Tamoxifen-Gabe zu erkennen, was auf eine hohe Effizienz der Cre-Rekombinase schließen lässt. **(C)** Wie in 8 µm dicken Schnitten der Wildtyp-Kontrolle zu erkennen ist, weist braunes Fettgewebe (BAT) per se eine deutliche grüne Autofluoreszenz auf. Dementsprechend ist durch Tamoxifen-Gabe keine deutliche Verstärkung der grünen Fluoreszenz zu erkennen, dennoch ist eine klare Abnahme der roten Fluoreszenz zu verzeichnen. **(D)** Untersuchung der DNA aus verschiedenen Geweben von adipoBK<sup>L2/+</sup>-Tieren vor (-) und nach (+) Tamoxifen-Injektion mittels PCR hinsichtlich der Cre-vermittelten Rekombination des geflochten BK-Lokus (L2). Während in Pankreas (P), Leber (L), Hypothalamus (Hy), Bulb (B), Cerebellum (C), Gehirn (G), Herz (He), Skelettmuskel (M) und Duodenum (D) durch Injektion von Tamoxifen keine L1-spezifischen PCR-Produkte entstehen, kommt es nach Applikation von TAM in eWAT, iWAT und BAT zur Ausbildung einer L1-Bande bei gleichzeitiger Abschwächung des L2-Amplikons, während die Wildtyp-spezifische BK-Bande (WT) erwartungsgemäß unverändert bleibt. Eine Marker-Spur (M) mit 2-*log ladder* dient als Fragmentgrößen-Kontrolle. **(A - C)** Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

### 4.3.2 Nachweis des BK-Kanals in verschiedenen Fettdepots der adipoBK-Tiere

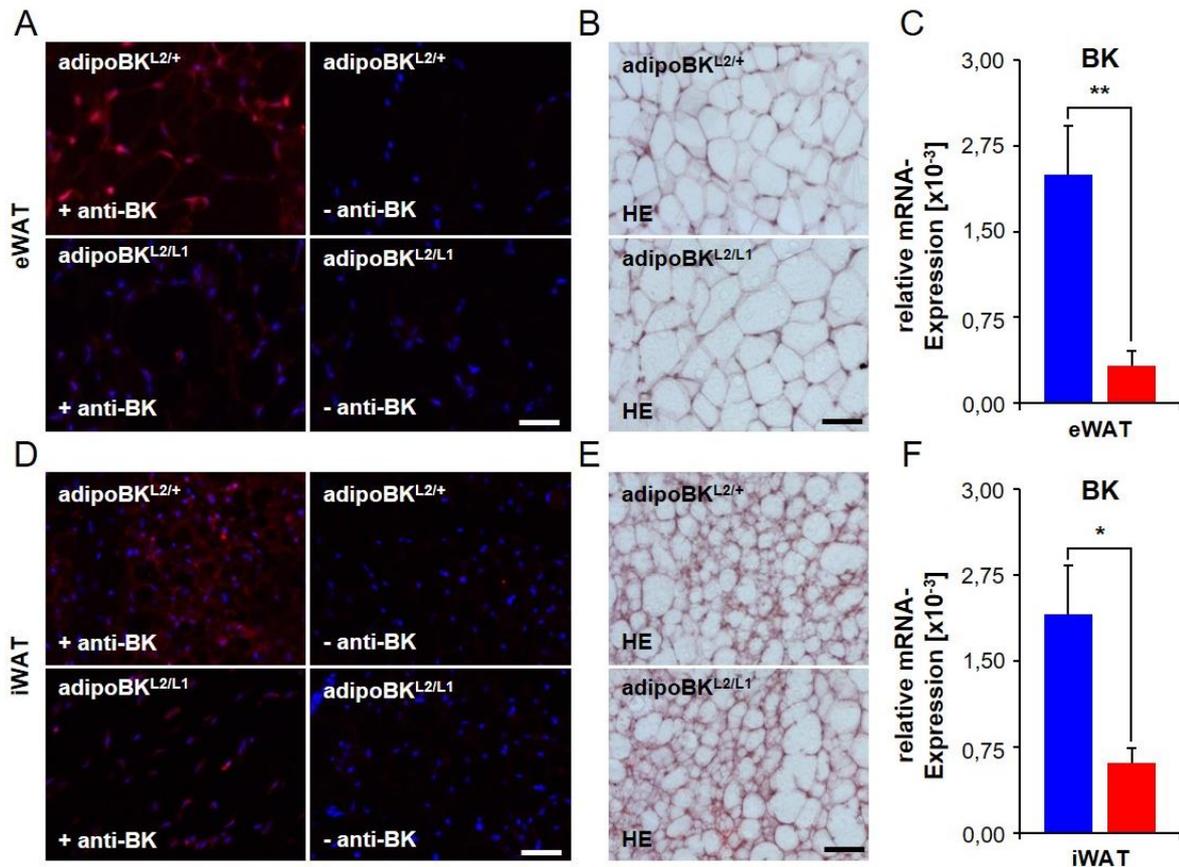
Im Zuge dieser Arbeit konnte der BK-Kanal bereits in eWAT, iWAT und BAT globaler BK<sup>+/-</sup>-Tiere, sowie seine vollständige Deletion in BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen nachgewiesen werden (s. Abb. 4.1 + Abb. 4.2).

Mittels Immunfluoreszenz-Färbung und mRNA-Analytik sollte nun auch die Expression des Kanals in den Adipozyten-spezifischen BK-Kanal Knockout Tieren (adipoBK<sup>L2/L1</sup>) sowie deren Wurfgeschwisterkontrollen (adipoBK<sup>L2/+</sup>) untersucht werden.

Kryoschnitte der entsprechenden Fettdepots wurden hierzu mit einem gegen den BK-Kanal gerichteten Primärantikörper oder einer Antikörper-freien Kontrolllösung inkubiert (Negativkontrolle) und anschließend mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper behandelt (s. Kapitel 3.5.2.5). In eWAT ist eine deutliche Rotfärbung des mit Primärantikörper behandelten Kontrollgewebes einer repräsentativen adipoBK<sup>L2/+</sup>-Maus zu erkennen. Das adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Gewebe weist hingegen nur sehr vereinzelt rot fluoreszierende Zellen auf, bei welchen es sich jedoch auf Grund ihrer spindelförmigen Morphologie nicht um Fettzellen zu handeln scheint. Die Negativkontrollen beider Genotypen sind frei von roter Fluoreszenz, was die Spezifität des hier verwendete BK-Antikörpers bestätigt (s. Abb. 4.12a). HE-Färbungen von eWAT-Schnitten zeigen die klassische Morphologie weißer Fettzellen und weisen dabei keine prominenten Größenunterschiede oder andere Differenzen zwischen den Genotypen auf (s. Abb. 4.12b). Zur Quantifizierung der BK-Kanal-Expression wurden die BK mRNA-Level mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht. Dabei konnten in Kontrollgeweben im Vergleich zu den adipoBK<sup>L2/L1</sup> Proben signifikant höhere Level an BK-mRNA nachgewiesen werden (s. Abb. 4.12c). Da bei der Isolation der RNA aus Fettdepots nicht nur Fettzellen, sondern auch andere im Gewebeverband befindliche Zellen wie Fibroblasten sowie glatte Muskelzellen aus Blutgefäßen verarbeitet wurden, ist auch in den adipoBK<sup>L2/L1</sup> Proben erwartungsgemäß ein schwaches Echtzeit-PCR Signal zu detektieren (s. Kapitel 3.2.3). Auch in Kryoschnitten aus Leistenfett konnte mittels Immunfärbung eine deutliche rote Fluoreszenz in den adipoBK<sup>L2/+</sup>

Gewebe nachgewiesen werden, wohingegen in den  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Schnitten nur vereinzelt rote Fluoreszenzmarkierungen erkennbar und die Negativkontrollen beider Genotypen erneut keine BK-Färbung zeigten (s. Abb. 4.12d). Das Vorhandensein BK-Kanal-positiver Zellen im Fettgewebe der  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Tiere ist möglicherweise auf die Erfassung von im Fettgewebe befindlichen Fibroblasten, glatte Muskelzellen oder kompletten Blutgefäßen zurückzuführen, welche durch die ausschließlich Fettzell-spezifische Deletion des BK-Kanals noch immer in der Lage sind, BK-Protein zu exprimieren. Durch Anfärben zellulärer Bestandteile wie Zellmembranen oder der Nuclei mittels HE-Färbung konnte die morphologische Struktur der Gewebeschnitte visualisiert werden. Die iWAT-Zellverbände unterscheiden sich von eWAT-Schnitten vor allem durch ihre Hypotrophie, wie durch ihren eher inhomogenen Aufbau aus sehr kleinen, BAT-ähnlichen Zellen sowie größeren Zellen mit typischer WAT-Struktur (s. Abb. 4.12e). Die Quantifizierung der BK-mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestätigte auch im iWAT signifikant reduzierte Level an BK-mRNA in  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  Tieren gegenüber  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$  Mäusen. Das auch hier im  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Tieren auftretende Echtzeit PCR-Signal ist vermutlich, wie auch im eWAT, auf im Fettgewebe enthaltene Fibroblasten und Blutgefäße zurück zu führen (s. Abb. 4.12f). Auf Grund des kleinzelligen Gewebeverbandes, ist in iWAT auch mit einem vermehrten Vorkommen von Blutgefäßen und Bindegewebszellen zu rechnen, was sowohl das stärkere BK mRNA-Signal in  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -iWAT gegenüber  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -eWAT wie auch die verstärkte Fluoreszenz erklären könnte.

Die Fluoreszenzfärbungen und qRT-PCR-Analysen konnten die Präsenz des BK-Kanals in  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ -Gewebe eindeutig belegen und darüber hinaus eine signifikant verringerte Expression des BK-Kanals in  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Zellen zeigen. Die effiziente Ablation des BK-Kanals in Fettzellen konnte dabei mittels quantitativer mRNA-Analysen und auf zellulärer Ebene durch Untersuchungen zur Protein-Abundanz bestätigt werden. Die mit Hilfe des Cre/loxP-Systems erzeugten gewebespezifischen  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Mutanten sollten also ein geeignetes Werkzeug zur Aufklärung der Rolle des adipozytären BK-Kanal *in vivo* darstellen.



**Abb. 4.12: BK-Expression im Fettgewebe der adipoBK-Mauslinie**

Repräsentative Darstellung von BK-Kanal-Expression und Morphologie in 14- $\mu\text{m}$  Gefrierschnitten von epididymalem Fettgewebe (eWAT) sowie Leistenfett (iWAT) aus 10 Wochen alten, Adipozyten-spezifischen BK-Kanal-defizienten Tiere ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ ) und deren Kontroll-Wurfgeschwister ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ ). **(A, C)** Immunfluoreszenz-Färbung des BK-Kanals im eWAT **(A)** und iWAT **(D)**. Rote Fluoreszenz indiziert die Expression von BK-Kanal im Kontroll-Gewebe (oben links) wohingegen im Fettgewebe von  $\text{adipoBK}$ -defizienten Tieren (unten links) kaum rote Fluoreszenzmarkierung zu erkennen ist und in den Negativkontrollen (rechts), ohne Primärantikörper (- anti-BK), kein BK-Kanal nachgewiesen werden kann. Zellkerne sind mit Hoechst® angefärbt (blaue Fluoreszenz). **(B, E)** Hämatoxylin & Eosin (HE)-Färbung von Gefrierschnitten. Zellkerne sind violett angefärbt, Zellmembranen fuchsiarot. Zwischen den Genotypen ist kein morphologischer Unterschied zu erkennen, wohingegen eWAT **(B)** im Vergleich zu iWAT **(E)** einen deutlich hypertrophen Zellverband aufweist. **(C, F)** Untersuchung der BK messenger RNA-Expression (mRNA), mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR), zeigt in  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ -Proben (blau) signifikant mehr BK-Kanal-Expression (normalisiert auf  $\beta$ -Aktin) in eWAT **(C)** ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$  n=5;  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  n=7) und iWAT **(F)** ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$  n=5;  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  n=4), verglichen mit  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Proben (rot). **(A, B, D, E)** Maßstabsbalken entsprechen 50  $\mu\text{m}$ . **(C, F)** Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*  $p < 0,05$ .

### 4.3.3 $\text{AdipoBK}^{\text{L2/L1}}$ Mausmutanten sind partiell vor HFD-induzierter Adipositas geschützt

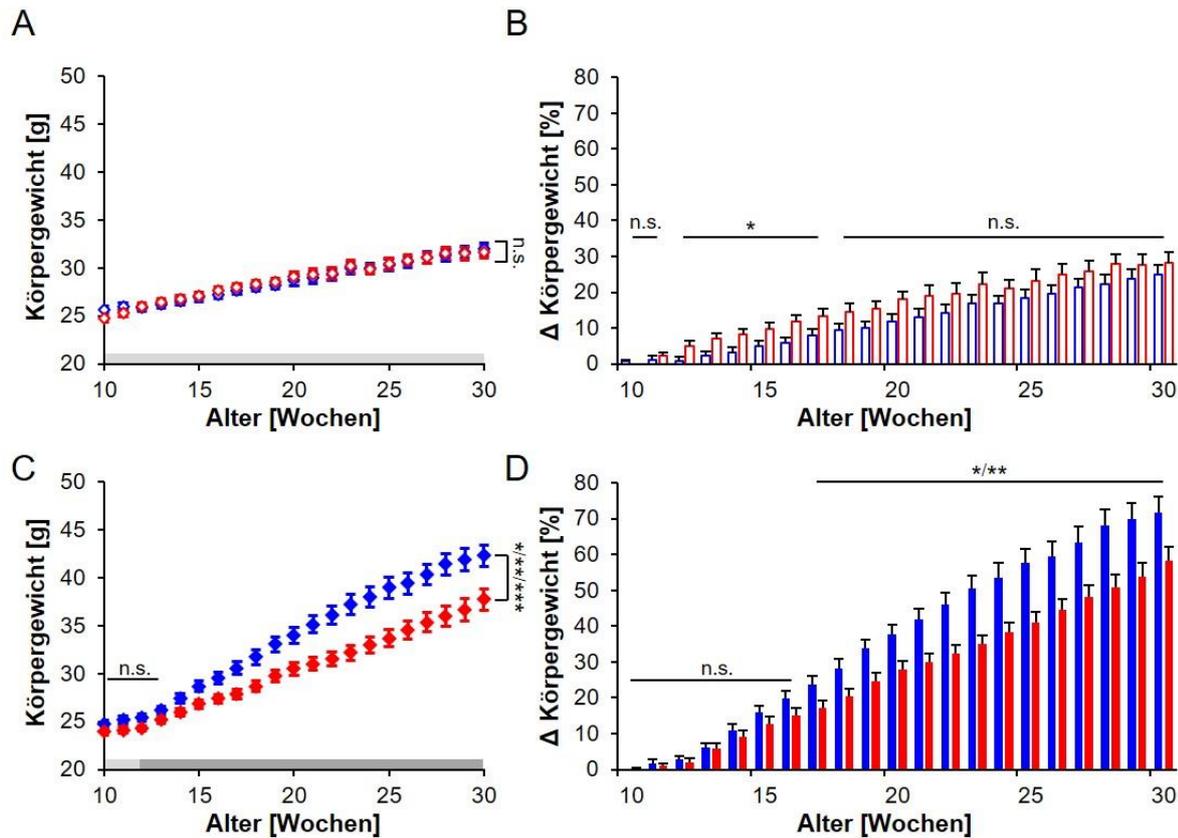
Um zu überprüfen, inwiefern der BK-Kanal in Adipozyten für den schlanken Phänotyp der globalen  $\text{BK}^{\text{L1/L1}}$ -Mäuse verantwortlich ist, wurden  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  und  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ -Tiere mit einer Kontrolldiät oder einer Hochfettdiät behandelt. Auf diese Weise sollte die Rolle der adipozytären BK-Kanäle hinsichtlich der Entwicklung des Körpergewichtes untersucht werden. Des Weiteren sollten klare Aussagen zur Funktion der BK-Kanäle in Adipozyten in Hinblick auf

die Einlagerung von Fett, die Morphologie verschiedener Fettdepots und vor allem potentielle Veränderungen in metabolischen Prozessen getroffen werden können.

Die Fütterung der adipoBK<sup>L2/L1</sup>- und adipoBK<sup>L2/+</sup>-Kohorten mit CD führte über den gesamten Versuchszeitraum zu keinen signifikanten Gewichtsunterschieden zwischen den Genotypen (s. Abb. 4.13a). Im Gegensatz zum globalen BK-Modell sind im konditionalen adipoBK-Mausmodell auch basal keine entwicklungsbedingten Gewichtsunterschieden zu verzeichnen (s. Abb. 4.13a+c), was sich auch in der identischen Tibiallänge der Tiere adipoBK<sup>L2/L1</sup> und adipoBK<sup>L2/+</sup> Mäuse widerspiegelt. Weder nach CD (adipoBK<sup>L2/+</sup> 17,87 ± 0,09 mm, adipoBK<sup>L2/L1</sup> 18,13 ± 0,13 mm) noch nach HFD-Fütterung (adipoBK<sup>L2/+</sup> 17,78 ± 0,08 mm, adipoBK<sup>L2/L1</sup> 17,62 ± 0,12 mm) konnten Unterschiede in der TL zwischen den Genotypen festgestellt werden (s. Suppl. Abb. 7b).

Interessanterweise ist die prozentuale Körpergewichtszunahme im Alter von 12-17 Wochen in den adipoBK<sup>L2/L1</sup> Mäusen sogar leicht aber signifikant erhöht (s. Abb. 4.13b). Im Verlauf der Fütterungsexperimente verschwindet dieser Unterschied jedoch gänzlich. Die verzeichneten Unterschiede in der Körpergewichtszunahme sind dennoch nur sehr schwach ausgeprägt und somit zwar signifikant aber nicht unbedingt als relevant anzusehen, da auch die absolute Gewichtszunahme über den Versuchszeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen adipoBK<sup>L2/L1</sup> (6,39 ± 0,61 g) und adipoBK<sup>L2/+</sup>-Tieren (5,50 ± 0,74 g) aufweist (s. Suppl. Abb. 7a).

Nach HFD-Fütterung zeichnet sich jedoch ein anderes Bild. Bereits im Alter von 14 Wochen und damit nach lediglich 2-wöchiger HFD-Fütterung, weisen adipoBK<sup>L2/+</sup>-Mäuse ein signifikant höheres Körpergewicht auf als ihre adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Wurfgeschwister (s. Abb. 4.13c). Dieser Effekt verstärkt sich bis zum Ende des Versuches im Alter von 30 Wochen noch weiter (s. Abb. 4.13c). Die adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tiere weisen darüber hinaus ab einem Alter von 17 Wochen auch eine signifikant verringerte prozentuale Zunahme des Körpergewichtes gegenüber ihren adipoBK<sup>L2/+</sup>-Kontrollen auf (s. Abb. 4.13d). Letztlich resultierend die Körpergewichtsunterschiede im Alter von 30 Wochen in einer hochsignifikant erhöhten totalen Körpergewichtszunahme der adipoBK<sup>L2/+</sup> Mäuse (adipoBK<sup>L2/+</sup> 18,58 ± 1,10 g versus adipoBK<sup>L2/L1</sup> 13,85 ± 0,99 g) (s. Suppl. Abb. 7a).

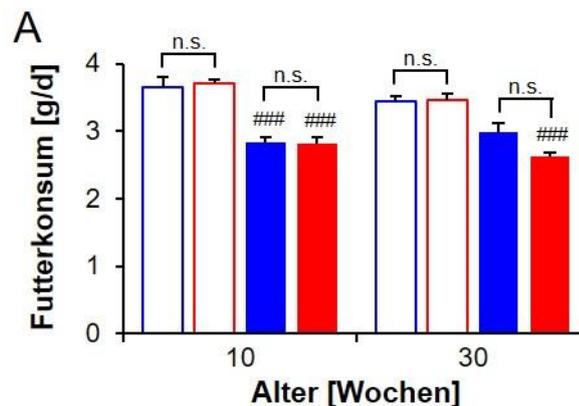


**Abb. 4.13: CD- und HFD-Fütterung der adipoBK-Tiere**

(A) Körpergewichtsentwicklung von Kontroll-Tieren (adipoBK<sup>L2/+</sup>) und Adipozyten-spezifisch BK-Kanal-defizienten Mäusen (adipoBK<sup>L2/L1</sup>) unter Kontrolldiät (CD)-Fütterung. Die Dauer der CD-Fütterung wird durch einen hellgrauen Balken dargestellt. Der Körpergewichtsverlauf der adipoBK<sup>L2/+</sup>-Tiere (blaue Rahmen, n=26) und ihrer adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Wurfgeschwistern (rote Rahmen, n=23) ist über den gesamten Versuchszeitraum identisch. (B) Die prozentuale Körpergewichtszunahme ( $\Delta$  Körpergewicht [%]) ist in adipoBK<sup>L2/L1</sup> von Woche 12 bis Woche 17 leicht, aber signifikant, erhöht. (C) Gewichtsverlauf von adipoBK<sup>L2/+</sup> (blau ausgefüllte Symbole, n=33) und adipoBK<sup>L2/L1</sup> (rot ausgefüllte Symbole, n=33) unter Fütterung von Hochfett-Diät (HFD). Der dunkelgraue Balken indiziert die Dauer der HFD-Fütterung. AdipoBK<sup>L2/+</sup>-Tiere weisen ab einem Alter von 14 Wochen ein signifikant (\*) erhöhtes Körpergewicht gegenüber ihren adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Wurfgeschwistern auf. Im Alter von 16 bis 20, sowie von 29 bis 30 Wochen ist der Gewichtsunterschied sehr signifikant (\*\*), von Woche 22 bis 28 hochsignifikant (\*\*\*). (D) Die prozentuale Körpergewichtszunahme ist hierbei in adipoBK<sup>L2/+</sup>-Mäusen ab einem Alter von 17 Woche ebenfalls signifikant erhöht (\* Woche 17-18 sowie 29-30, \*\* Woche 19-28). (A-D) Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Um mögliche Differenzen hinsichtlich der Zufuhr von Energie als Ursache für Unterschiede der Körpergewichtsentwicklung ausschließen zu können, wurde der mittlere Futterkonsum pro Tag mit Hilfe eines modifizierten metabolischen Käfig-Versuches ermittelt (s. Kapitel 3.4.2). Weder zu Beginn der Diäten, im Alter von 10 Wochen, noch am Ende der Fütterungsversuche, mit 30 Wochen, wurden zwischen den Genotypen Unterschiede hinsichtlich der konsumierten CD- oder HFD-Futtermenge festgestellt. Allerdings konsumieren sowohl adipoBK<sup>L2/+</sup> als auch adipoBK<sup>L2/L1</sup> Tiere im Alter von 10 Wochen signifikant weniger HFD als CD (s. Abb. 4.14) Die verminderte Aufnahme an HFD ist vermutlich auf die sehr hohe Kaloriendichte dieser Nahrung zurück zu führen. Auch im Alter von 30 Wochen ist der HFD-Konsum der adipoBK<sup>L2/+</sup>- und adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Mäuse im Vergleich zu den CD-gefütterten Kontrollgruppen reduziert. Dieser

Unterschied erreicht jedoch nur in der  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Kohorte das Signifikanzniveau (s. Abb. 4.14).



**Abb. 4.14: Durchschnittlicher Futterkonsum von  $\text{adipoBK}$ -Tieren bei CD- und HFD-Fütterung**

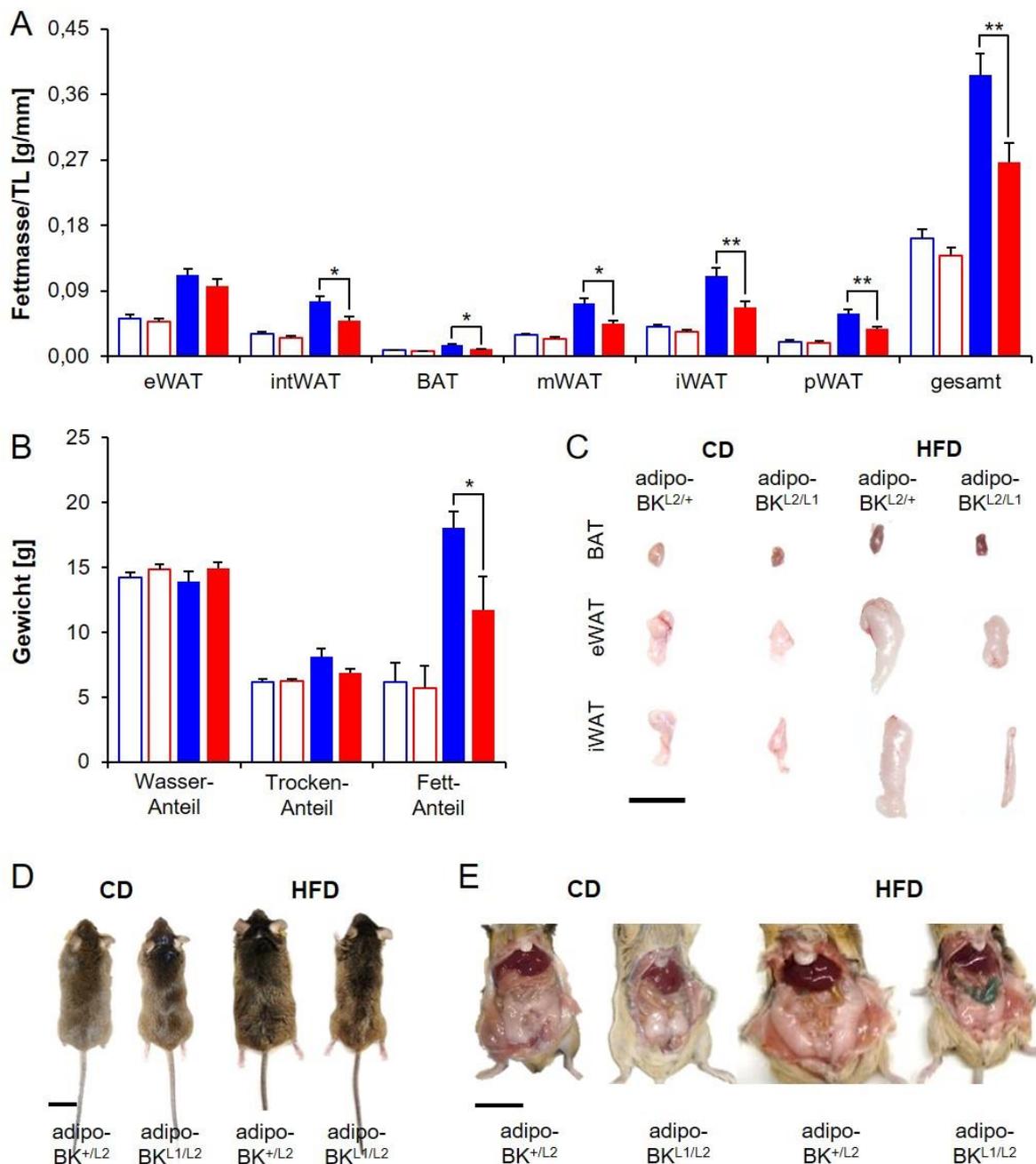
(A) Der durchschnittliche Futterkonsum, ermittelt in modifizierten metabolischen Käfigen, unterscheidet sich zwischen Kontrolltieren ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ , blau) und Adipozyten-spezifischen BK-Kanal-defizienten Tieren ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ , rot), sowohl unter Kontrolldiät-Fütterung (CD, offene Symbole) als auch unter Hochfettdiät (HFD, gefüllte Symbole), weder zu Beginn der Diäten (10 Wochen) noch am Ende der diätetischen Fütterung (30 Wochen). Zu Beginn der Fütterungsversuche ist der Konsum von HFD sowohl in  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  als auch  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$  hochsignifikant geringer als der Konsum von CD (indiziert durch #). Am Ende der jeweiligen Diät ist die tägliche Verzehrmenge der HFD in beiden Genotypen reduziert. Gegenüber der entsprechenden CD-Kohorte wird das Signifikanzniveau jedoch nur in den  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Mäusen erreicht. Die Abbildung zeigt Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). ###  $p < 0,001$ .

Um eine genauere Aussage über die Art des adipösen Phänotyps der  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ -Tiere treffen zu können wurden neben dem Gesamtkörpergewicht auch verschiedene Fettdepots hinsichtlich ihrer normierten Masse untersucht. Darüber hinaus erfolgte die Analyse der Gesamt-Körperzusammensetzung. Nach CD-Fütterung, die eine identische Körpergewichtsentwicklung der beiden Genotypen zeigte (s. Abb. 4.13a), waren keine signifikanten Unterschiede in der Masse der untersuchten Fettdepots von  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  Tieren und den korrespondierenden Wurfgeschwisterkontrollen zu verzeichnen (s. Abb. 4.15a). Auch die Analyse der Körperstruktur mittels Soxhlet-Extraktion (s. Kapitel 3.5.1) ergab zwischen  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  und  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$  keinerlei Divergenzen hinsichtlich Wassermasse ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$   $14,22 \pm 0,41$  g,  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$   $14,82 \pm 0,40$  g), Trockenanteil ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$   $6,17 \pm 0,24$  g,  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$   $6,21 \pm 0,17$  g) oder Fettgehalt ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$   $6,11 \pm 1,56$  g,  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$   $5,70 \pm 1,72$  g) der Tiere (s. Abb. 4.15b). Im Gegensatz dazu war in den HFD-gefütterten  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ -Tieren eine massive Fettakkumulation zu beobachten, wohingegen die Finalgewichte der entsprechenden Fettdepots in den gewebespezifischen  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  Mutanten signifikant geringer war. Konkret waren sowohl interscapuläres WAT ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$   $7,62 \times 10^{-2} \pm 0,68$  g/mm,  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$   $4,92 \times 10^{-2} \pm 0,52 \times 10^{-2}$  g/mm), als auch BAT ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$   $1,51 \times 10^{-2} \pm 0,14$  g/mm,  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$   $0,95 \times 10^{-2} \pm 0,09 \times 10^{-2}$  g/mm), mesenterisches WAT ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$   $7,22 \times 10^{-2} \pm 0,69$  g/mm,  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$   $4,44 \times 10^{-2} \pm 0,50 \times 10^{-2}$  g/mm), Leistenfett ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$   $11,12 \times 10^{-2} \pm 1,01$  g/mm,  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$   $6,71 \times 10^{-2} \pm 0,82 \times 10^{-2}$  g/mm) sowie pWAT ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$   $5,89 \times 10^{-2} \pm 0,63$  g/mm,  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$   $3,75 \times 10^{-2} \pm 0,37 \times 10^{-2}$  g/mm) und die Summe der untersuchten Depots ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$   $38,64 \times 10^{-2} \pm 2,99$  g/mm,  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$   $26,69 \times 10^{-2} \pm 2,64 \times 10^{-2}$  g/mm) in den  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Mäusen hinsichtlich ihrer auf die Tibialänge normierten Masse signifikant

verringert (s. Abb. 4.15a). Die Körperstrukturanalyse durch Trocknung und Soxhlet-Fettextraktion (s. Kapitel 3.5.1) ergab darüber hinaus, dass die Gewichtszunahme der *adipoBK<sup>L2/+</sup>*-Tiere unter HFD weitestgehend auf eine Zunahme an Fettmasse zurück zu führen ist. Während sich nach HFD-Fütterung weder Trockenmasse (*adipoBK<sup>L2/+</sup>*  $8,10 \pm 0,63$  g, *adipoBK<sup>L2/L1</sup>*  $6,87 \pm 0,31$  g) noch Wassergehalt (*adipoBK<sup>L2/+</sup>*  $13,90 \pm 0,76$  g, *adipoBK<sup>L2/L1</sup>*  $14,95 \pm 0,46$  g) der beiden *adipoBK*-Genotypen unterscheiden, führt die Deletion des *adipoBK*-Kanals zu einer signifikant reduzierten Fetteinlagerung in *adipoBK<sup>L2/L1</sup>*-Mäusen (*adipoBK<sup>L2/L1</sup>*  $11,72 \pm 2,58$  g versus *adipoBK<sup>L2/+</sup>*  $18,09 \pm 1,20$  g;  $p = 0,03$ ) (s. Abb. 4.15b).

Diese Befunde werden auch durch repräsentative Lichtbild-Aufnahmen ausgewählter Fettdepots nach Kontroll- oder Hochfettdiät-Fütterungsregime untermauert. Die Größenunterschiede implizieren einen klaren Anstieg der Fettmassen nach HFD-Fütterung in den *adipoBK<sup>L2/+</sup>*-Depots, wohingegen die Fettgewebe der HFD-gefütterten *adipoBK<sup>L2/L1</sup>*-Tiere, insbesondere im Vergleich zur CD-Fütterung, nur unwesentlich zugenommen haben (s. Abb. 4.15c). Auch repräsentative Gesamtaufnahmen der Tiere im Alter von 30 Wochen zeigen eine deutliche Zunahme der Körpermasse in *adipoBK<sup>L2/+</sup>* nach HFD-Fütterung, welche durch Deletion des BK-Kanals in Adipozyten wiederum verhindert werden kann (s. Abb. 4.15d).

Diese bisherigen Befunde konnten die Eingangshypothese ganz klar bestätigen und belegen, dass die Adipozyten-spezifische Deletion des BK-Kanals, einer HFD-induzierten Adipositas und massiver Fetteinlagerung entgegen wirken kann. Der adipozytäre BK-Kanal scheint somit ein potentiell Target für die Prävention von Übergewicht und Fettleibigkeit zu sein (s. Abb. 5.1).



**Abb. 4.15: Körperstrukturanalyse von adipoBK-Tieren bei CD- und HFD-Fütterung**

Untersuchung der Körperstruktur von Adipozyten-spezifisch BK-Kanal-defizienten Mäusen (adipoBK<sup>L2/L1</sup>) und Kontroll-Tieren (adipoBK<sup>L2/+</sup>) nach Kontrolldiät- (CD) und Hochfettdiät (HFD)-Fütterung **(A)** Das Gewicht verschiedener Fettdepots, normiert auf die Tibiallänge (TL), unterscheidet sich nach CD-Fütterung (offene Symbole) in adipoBK<sup>L2/L1</sup> (rot, n=16) und adipoBK<sup>L2/+</sup> (blau, n=20) in keinem der untersuchten Fettgewebe. Nach Fütterung von HFD (ausgefüllte Symbole) ist sowohl in interscapularem (intWAT), als auch in braunem Fettgewebe (BAT) und der mesenterischen Fettmasse (mWAT) eine signifikante Reduktion in adipoBK<sup>L2/L1</sup> (n=21) gegenüber adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=18) zu erkennen. Die Masse an Leistenfett (iWAT) und perirenalem Fettgewebe (pWAT), sowie die daraus resultierende Summe (gesamt) ist in adipoBK<sup>L2/L1</sup> sehr signifikant verringert. In epididymalem Fett (eWAT) ist eine tendenzielle Reduktion zu sehen. **(B)** Die Analyse der Körperstruktur mittels Soxhlet-Fettextraktion nach diätetischer Fütterung ergibt keine Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich des Wasseranteils und der Trockenmasse. Nach CD weist auch der Fettanteil von adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=5) und adipoBK<sup>L2/L1</sup> (n=5) keine Unterschied auf. Nach HFD Fütterung ist eine signifikante Erhöhung des Fettanteils in adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=18) gegenüber adipoBK<sup>L2/L1</sup> (n=21) zu verzeichnen. **(C)** Repräsentative

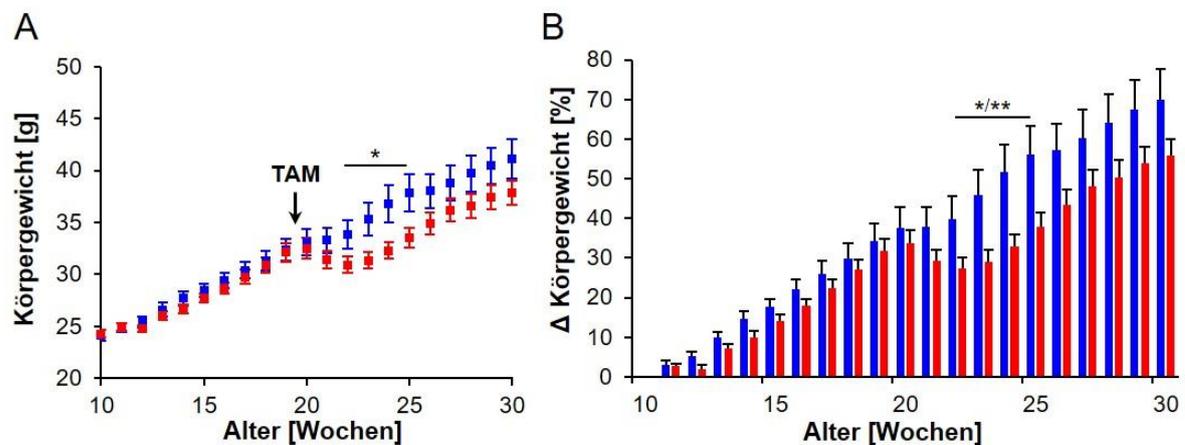
Abbildung von BAT, eWAT und iWAT nach CD- oder HFD-Fütterung. **(D)** Charakteristische Fotos von Tieren nach diätetischer Fütterung. **(E)** Repräsentative Aufnahmen der eröffneten Bauchhöhle von adipoBK<sup>L2/+</sup> und adipoBK<sup>L2/L1</sup> nach CD oder HFD im Alter von 30 Wochen. Die HFD-induzierte Zunahme der intraperitonealen Fettdepots sowie der Lebergröße scheint in den adipoBK<sup>L2/+</sup>-Mäusen besonders ausgeprägt zu sein. **(A, B)** Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . **(C-E)** Maßstabsbalken entsprechen 2 cm.

Da neben der Prävention von Adipositas vor allem auch deren Therapie im Fokus der klinischen Forschung liegt und neue therapeutische Ansätze zur Bekämpfung von Übergewicht und Fettleibigkeit dringend benötigt werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem weiteren Fütterungsregime untersucht, ob die Deletion des adipozytären BK-Kanals bei bestehendem Übergewicht grundsätzlich auch therapeutisch nutzbar ist.

Zur Induktion der Fettleibigkeit wurde wie beschrieben ein 18-wöchiges HFD-Fütterungsprotokoll in adipoBK<sup>L2/+</sup>- und adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Mäusen angewandt (s. Kapitel 3.4.1). Im Gegensatz zur Präventions-Studie wurde der BK-Kanal bei den Therapie-Kohorten erst im Alter von 19 Wochen durch konsekutive Applikation von Tamoxifen an fünf aufeinander folgenden Tagen deletiert (s. Kapitel 3.2.3). Zu diesem Zeitpunkt war die Körpergewichtszunahme in beiden Genotypen noch annähernd identisch (adipoBK<sup>L2/+</sup>  $32,35 \pm 1,05$  g, adipoBK<sup>L2/L1</sup>  $31,91 \pm 0,80$  g) Bezogen auf die Ausgangsgewichte der jeweiligen Genotypen ließ sich in diesem Alter auch kein Unterschied in der Gewichtszunahme der Tiere feststellen (adipoBK<sup>L2/+</sup>  $8,18 \pm 1,00$  g, adipoBK<sup>L2/L1</sup>  $7,71 \pm 0,76$  g) (s. Abb. 4.16).

Nach der Deletion des BK-Kanals war in der adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Kohorte eine deutliche Abnahme des Körpergewichtes zu verzeichnen, welche bei adipoBK<sup>L2/+</sup>-Tieren deutlich weniger stark ausgeprägt war. Letztlich resultierte die durch Tamoxifen-Injektion induzierte Ablation des adipozytären BK-Kanals (s. Abb. 3.2) in deutlichen Körpergewichtsunterschieden zwischen den adipoBK-Genotypen. Zwei bis fünf Wochen nach Tamoxifen-Gabe erreichten diese Körpergewichtsdifferenzen Signifikanzniveau (s. Abb. 4.16a). Dieser Befund spiegelt sich auch in der prozentualen Körpergewichtszunahme ( $\Delta$  Körpergewicht) wieder. Hier war ebenfalls eine deutliche und teilweise signifikante (2-5 Wochen nach Tamoxifen-Applikation) Reduktion der HFD-induzierten Körpergewichtssteigerung der adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tiere zu verzeichnen war (s. Abb. 4.16b). Des Weiteren resultierte das therapeutische Tamoxifen-Injektionsprotokoll in bereits HFD-gefütterten Mäusen in einer reduzierten Masse verschiedener Fettdepots. So konnten sowohl in braunem Fettgewebe, als auch in der mesenterischen Fettmasse sowie dem Leistenfettdepot signifikante Unterschiede detektiert werden. Auch in interscapularem WAT, wie auch perirenalem Fettgewebe und der Summe der untersuchten Depots war eine deutliche Tendenz zu reduzierten Fettmassen in adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren festzustellen (s. Suppl. Abb. 8a). Der finale Gewichtsunterschied der adipoBK-Genotypen fällt nach später, therapeutischer Injektion von Tamoxifen schwächer aus, als bei der frühen Deletion des adipozytären BK Kanals. Erwartungsgemäß fällt dementsprechend auch der Unterschied der prozentuale Körpergewichtszunahme der adipoBK<sup>L2/+</sup>- und adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tiere geringer aus und erreicht das Signifikanzniveau nicht (s. Suppl. Abb. 8b). Dennoch ist in der Tendenz eine reduzierte prozentuale Körpergewichtszunahme in adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren gegenüber den Kontrollen zu erkennen ( $p=0,09$ ) (s. Suppl. Abb. 8b). Wie auch bei der Präventionskohorte differieren die Körpergrößen, gemessen an der Tibialänge, zwischen den beiden Genotypen nicht (s. Suppl. Abb. 8c). Die Deletion des BK-Kanals in Adipozyten scheint im Tiermodell

insbesondere unter einer besonders fettreichen Ernährung sowohl präventiv, als auch therapeutisch positive Effekte auf die Fettakkumulation und die damit verbundene Körpergewichtszunahme zu haben.



**Abb. 4.16: Pharmakologische Blockade des BK-Kanals in Adipozyten als Therapieoption bei HFD-induzierter Adipositas**

Untersuchung der Auswirkung einer späten (Woche 19-20) Deletion des BK-Kanals in Adipozyten, durch Tamoxifen-Injektion (TAM), auf die Entwicklung des Körpergewichtes in Kontrolltieren ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ ) und Adipozyten-spezifischen BK-Knockout-Tieren ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ ) bei Hochfett-diät (HFD)-Fütterung. **(A)** Durch Deletion des BK-Kanals im Alter von 19 Wochen wird das zuvor identisch verlaufende Körpergewicht von  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Tieren (rot,  $n=23$ ) signifikant reduziert, verglichen mit Kontroll-Wurfgeschwistern (blau,  $n=17$ ). **(B)** Die prozentuale Veränderung des Körpergewichtes ( $\Delta$  Körpergewicht [%]) ist in  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  von Woche 22 bis 25 ebenfalls signifikant reduziert (\* Woche 22, 23, 25; \*\* Woche 24). **(A, B)** Die Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.3.4 Untersuchungen zu Glucosemetabolismus, Insulinausschüttung und verschiedenen Adipositas-assoziierten Biomarkern nach diätetischer Fütterung von $\text{adipoBK}$ -Mäusen

Mittels intraperitonealem Glucose-Toleranz-Test wurde der Glucose-Metabolismus von  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ - und  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Mäusen näher untersucht (s. Kapitel 3.4.4). Dabei ergaben sich für 10 Wochen alte Tier vor diätetischer Fütterung, keine Unterschiede hinsichtlich des Glucose-Metabolismus (s. Abb. 4.17a). Nach 18 wöchiger Kontrolldiät weisen hingegen beide Genotypen tendenziell erhöhte Blutglucose-Werte auf. Insbesondere  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  scheinen bei der Verstoffwechslung der Kohlenhydrat-lastigen Kontrolldiät Defizite aufzuweisen, was teilweise zu signifikant erhöhten Blutglucose-Werten gegenüber  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ -Tieren führt (s. Abb. 4.17b). Nach einer besonders fettreichen Nahrung weisen  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Mäuse jedoch signifikant geringere Blutglucose-Level als ihre Kontroll-Wurfgeschwister auf (s. Abb. 4.17c). Um neben der Glucose-Verstoffwechslung auch mögliche Insulinresistenzen erfassen zu können wurde den Tieren während des i.p. GTT zusätzlich eine geringe Menge an Blut zur Bestimmung der Plasma-Insulin-Spiegel entnommen (s. Kapitel 3.5.6.1). Während bei 10 Wochen alten  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$  und  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  Tieren kein Unterschied in der Insulinfreisetzung zu erkennen war (s. Abb. 4.17d), zeigten  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$  Mäuse nach HFD-Fütterung massiv

erhöhte Serum-Insulin-Werte gegenüber Adipozyten-spezifisch BK-Kanal-defizienten Tieren (s. Abb. 4.17e). Zusammen mit den Befunden des i.p. GTT ergeben sich somit für die Kontroll-Tiere massiv erhöhte Blutglucose-Werte bei gleichzeitig gesteigerter Insulinfreisetzung, was als deutlicher Hinweis auf eine vorliegende Insulinresistenz der Tiere gewertet werden kann. Die Ausschaltung des BK-Kanals ausschließlich in Adipozyten scheint dementsprechend auch vor einer HFD-assoziierten Insulinresistenz zu schützen.

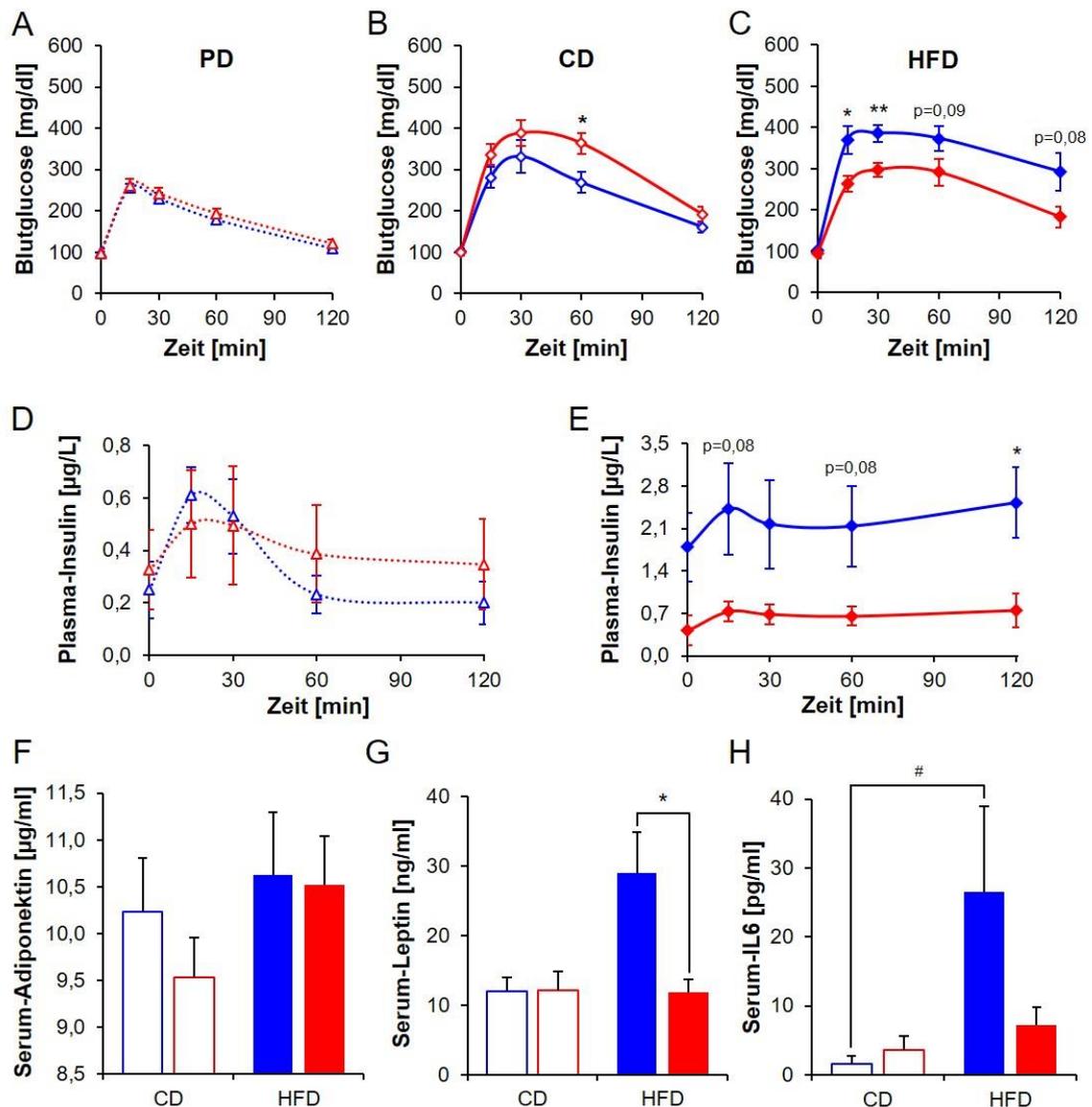
Die Fettzell- und Adipositas-Marker Adiponektin, Leptin und IL-6 sind gleichzeitig Faktoren, die positiv bzw. negativ mit der Insulinresistenz korrelieren. Als potentielle Modulatoren des metabolischen  $adipoBK^{L2/+}$  Phänotyps nach HFD-Fütterung wurden diese Marker daher mittels konventioneller ELISA-Technik untersucht (s. Kapitel 3.5.6) (s. Abb. 4.17f-h).

Die Analyse der Serum-Protein-Level ergab keine Unterschiede für die Adiponektin-Konzentrationen zwischen den beiden Genotypen und Diäten (s. Abb. 4.17f).

Während nach CD-Fütterung die Leptin-Spiegel der  $adipoBK^{L2/L1}$  und  $adipoBK^{L2/+}$ -Tiere identisch waren, lagen die Serum-Leptin-Spiegel in der Kontrollkohorte nach HFD signifikant höher (s. Abb. 4.17g). Da dies jedoch nicht zu einem gesteigerten Sättigungsgefühl oder daraus resultierend zu einer verringerten Futtermittelaufnahme der  $adipoBK^{L2/+}$ -Mäuse geführt hat (s. Abb. 4.14), impliziert dieser Befund eine Leptin-Resistenz der Tiere nach HFD-Fütterung.

Auch die IL-6-Konzentration im Serum der Kontrollkohorte war nach HFD-Fütterung signifikant höher, als nach Kontrolldiät. Des Weiteren konnte auch ein deutlicher Anstieg im IL-6-Level der  $adipoBK^{L2/+}$ -Tiere gegenüber der  $adipoBK^{L2/L1}$ -Kohorte auf HFD beobachtet werden, welcher jedoch nicht signifikant ist (s. Abb. 4.17h).

Auf Basis dieser Befunde kann festgehalten werden, dass die genetische Ablation des BK-Kanals in Adipozyten nicht nur hinsichtlich der Fetteinlagerung und der Entwicklung des Körpergewichtes sondern auch metabolisch mit einer Reihe an positiven Effekten assoziiert zu sein scheint. Sowohl eine Insulinresistenz, als auch eine Resistenz gegenüber dem Sättigungshormon Leptin können durch die gewebsspezifische BK-Kanal Ablation verhindert werden.



**Abb. 4.17: Glucose-Toleranz, Insulinausschüttung und Adipositas-assoziierte Biomarker in adipoBK-Tieren**

(A-C) Untersuchung der Glucose Toleranz in Adipozyten-spezifischen BK-Kanal-defizienten Tieren (adipoBK<sup>L2/L1</sup>) und deren Kontroll-Wurfgeschwister (adipoBK<sup>L2/+</sup>) mittels intraperitonealem Glucose-Toleranz-Test (i.p. GTT) vor diätetischer Fütterung (PD, offene Dreiecke) sowie nach Kontrolldiät (CD, offene Rauten) oder Hochfettdiät (HFD, ausgefüllte Rauten). (A) Vor diätetischer Fütterung im Alter von 10 Wochen zeigen adipoBK<sup>L2/L1</sup> (rot, n=8) und adipoBK<sup>L2/+</sup> (blau, n=7) keinen Unterschied hinsichtlich ihrer Blutglucose (BG)-Spiegel nach i.p. GTT. (B) Tendenziell erhöhte BG in adipoBK<sup>L2/L1</sup> (n=8) gegenüber adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=7) im i.p. GTT nach CD, welche bei 60 min signifikant ist. (C) Signifikant höhere BG bei 15 und 30 min nach Glucose-Injektion in adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=8), verglichen mit adipoBK<sup>L2/L1</sup> (n=6) nach HFD. (D-H) Untersuchung der Insulin-Ausschüttung durch i.p. GTT-induzierten Glucose-Stimulus und Serum-Konzentration Adipositas-assoziiierter Biomarker mittels Enzym-gekoppeltem Immun-Adsorptions-Assay (ELISA). (D) Keine Unterschiede in den Plasma-Insulin-Spiegeln der adipoBK<sup>L2/L1</sup> (n=13) und adipoBK<sup>L2/+</sup> Mäuse (n=8) nach i.p. GTT PD. (E) Plasma-Insulin-Konzentrationen in adipoBK<sup>L2/+</sup> Tieren (n=6) sind gegenüber adipoBK<sup>L2/L1</sup> Mäusen (n=5) im i.p. GTT nach HFD deutlich erhöht. Ein signifikanter Unterschied war 120 min nach Glucose-Injektion zu erkennen. (F) Identische Serum-Adiponektin-Spiegel nach CD oder HFD in adipoBK<sup>L2/L1</sup> (CD n=5, HFD n=7) und adipoBK<sup>L2/+</sup> Mäusen (CD n=7, HFD n=10). (G) Keine Unterschiede in Serum-Leptin nach CD (adipoBK<sup>L2/+</sup> n=7, adipoBK<sup>L2/L1</sup> n=5). Nach HFD-Fütterung ist der Serum-Leptin Spiegel in adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=9) gegenüber adipoBK<sup>L2/L1</sup> (n=6) signifikant erhöht. (H) Nach CD ist kein Unterschied hinsichtlich der

IL-6-Konzentration im Serum von adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=13) und adipoBK<sup>L2/L1</sup> Tieren (n=9) erkennbar. HFD-Fütterung steigert die IL-6 Serumkonzentration von adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=10) signifikant gegenüber CD (#). Im Vergleich zu adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=12) ist eine tendenzielle Erhöhung zu erkennen.

(A-H) Abbildungen zeigen Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). \*/# p < 0,05, \*\* p < 0,01.

### **4.3.5 Verringerte Fettzell-Hypertrophie in adipoBK<sup>L2/L1</sup> Mäusen nach HFD-Fütterung geht mit verminderten Entzündungsparametern und erhöhten Ucp1-Leveln einher**

Neben der Gesamt-Fettmasse spielen auch die Morphologie der Fettzellen sowie die daraus resultierende Modulation der Adipokine-Freisetzung eine zentrale Rolle für die Entstehung von metabolischen- und Entzündungs-assoziierten Folgeerkrankungen. Eine Hypertrophie von Adipozyten ist beispielsweise oftmals mit einer vermehrten Bildung von IL-6 verbunden, was im Folgenden zur Begünstigung der Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ II führen kann (Nishimura et al., 2009a; Nishimura et al., 2009b). Auch das Arteriosklerose-Risiko steigt mit zunehmender Hypertrophie von Fettzellen und dem damit verbundenen Anstieg pro-inflammatorischer Cytokine (Diez and Iglesias, 2003).

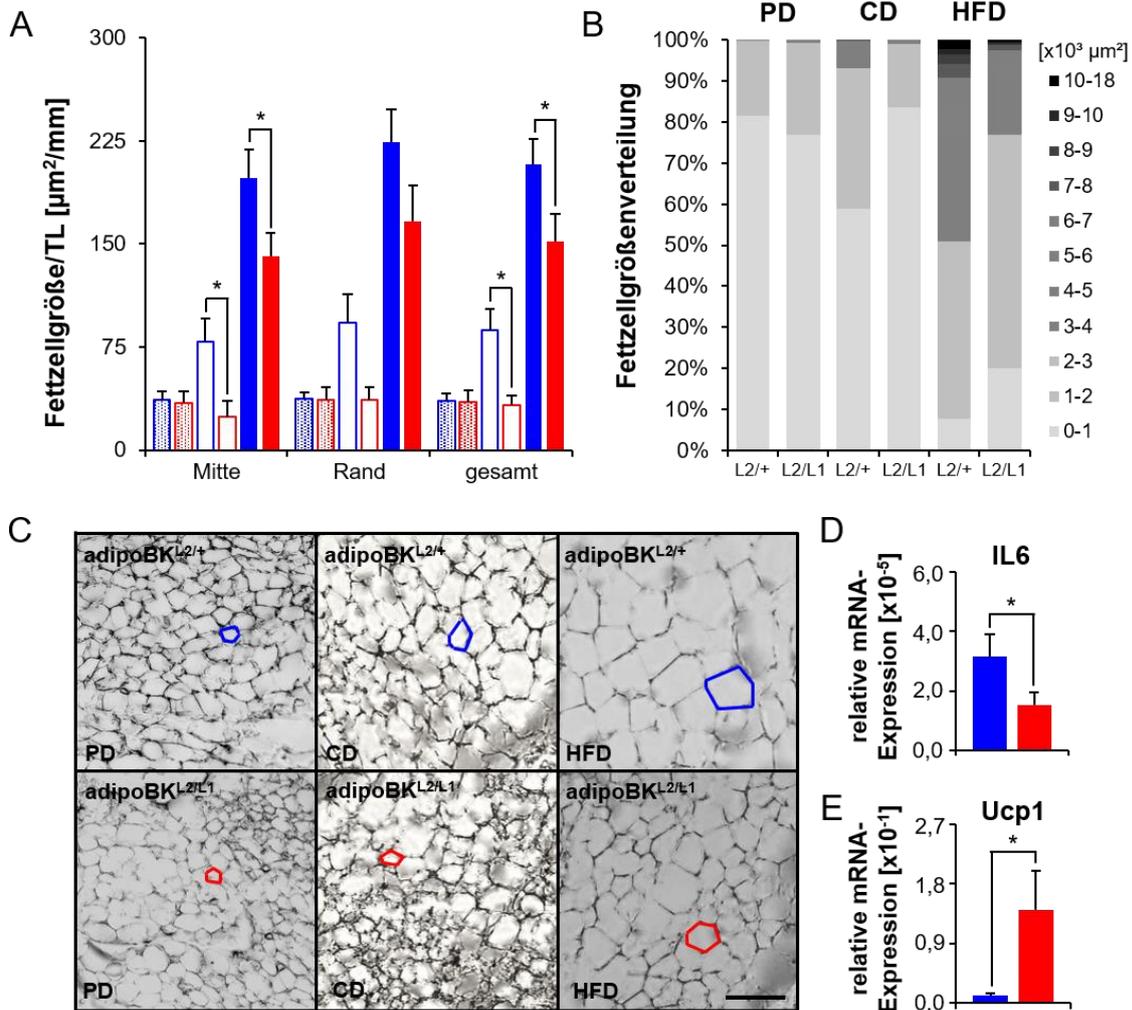
Die im Rahmen dieser Arbeit initiierte Charakterisierung des metabolischen adipoBK<sup>L2/L1</sup> Phänotypes wurde daher durch Bestimmung der Fettzellgrößen (s. Abb. 4.18a-c) sowie verschiedener Entzündungs- und Fettzellmarker fortgeführt. Der Umfang der Adipozyten wurde in lichtmikroskopischen Aufnahmen von Gefrierschnitten mittels AxioVision Software (Version 4.1, Zeiss) bestimmt (s. Kapitel 3.5.3). Im Alter von 10 Wochen, ergab sich hierbei, in Übereinstimmung mit dem Körpergewicht und der gesamten Fettdepotmasse (s. Abb. 4.13 und Abb. 4.15), zwischen den Genotypen kein Größenunterschied für die iWAT Adipozyten.

Bereits die Fütterung einer Kontrolldiät erhöhte in Kontrolltieren die Fettzellgröße jedoch signifikant, während in adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Mäusen auch im Alter von 30 Wochen nach CD-Fütterung keine Hypertrophie der Fettzellen zu beobachten war. Die massive HFD-induzierte Gewichtszunahme (s. Abb. 4.13) führte erwartungsgemäß in beiden Genotypen zu einem klaren Anstieg der mittleren Adipozyten-Querschnittsfläche. Dieser Wachstumseffekt war in den adipoBK-defizienten Tieren gegenüber Wurfgeschwisterkontrollmäusen signifikant verringert (s. Abb. 4.18a). Auch die Ermittlung der Fettzellgrößenverteilung durch Klassifizierung der Adipozyten anhand ihrer Größe ergab nach besonders fettreicher Ernährung eine deutliche Verschiebung hin zu hypertrophen Zellen in adipoBK<sup>L2/+</sup> Mäusen. Nach CD-Fütterung, sowie im Alter von 10 Wochen waren die meisten Fettzellen ≤ 3.000 µm<sup>2</sup> (s. Abb. 4.18b). Erwartungsgemäß unterscheidet sich dementsprechend auch die Fettzellgrößenverteilung der CD-gefütterten adipoBK<sup>L2/+</sup> und adipoBK<sup>L2/L1</sup> Tiere kaum von jener der Kohorten PD (s. Abb. 4.18b). Die repräsentative Darstellung von Ausschnitten lichtmikroskopischer Aufnahmen der iWAT-Gefrierschnitte veranschaulicht diese Befunde zusätzlich (s. Abb. 4.18c).

Die Analyse der IL-6-mRNA-Expression mittels qRT-PCR (s. Kapitel 3.5.5) zeigte darüber hinaus auch eine signifikante Steigerung der lokalen IL-6-Spiegel in iWAT von adipoBK<sup>L2/+</sup>-Tieren (s. Abb. 4.18d) auf, was die Schlussfolgerung einer Hypertrophie-bedingten Zytokin-Bildung im iWAT weiter unterstützt. Des Weiteren impliziert dieser Befund, dass der adipozytäre BK-Kanal auch eine Ursache für den Anstieg der Serum-IL-6 Level in den HFD-

gefütterten  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ -Tieren ist (s. Abb. 4.17h). Die lokal erhöhten IL-6-mRNA-Level scheinen jedoch nicht auszureichen, um auch global eine signifikante Erhöhung der Zytokin-Spiegel im Blut zu erreichen (s. Abb. 4.17h). Dennoch führt die genetische Deletion des BK-Kanals offensichtlich zu einer verminderten HFD-induzierten Hypertrophie der Fettzellen sowie geringeren Entzündungswerten im iWAT (s. Abb. 4.17h + Abb. 4.18d), was eine mögliche Erklärung für die verbesserte Glucosetoleranz (s. Abb. 4.17c) sowie die verringerte Insulinresistenz sein könnte (s. Abb. 4.17c+e).

Das beschriebene Auftreten besonders kleinzelliger Fettzellen stellt möglicherweise auch einen Hinweis für ein vermehrtes *Browning*, also die Entstehung brauner Fettzellen innerhalb eines weißen Fettdepots dar, da BAT-Zellen im Vergleich zu weißen Fettzellen eine deutlich hypotrophe Morphologie aufweisen. *Browning* von Fettgewebe führt zur Entkopplung der Atmungskette in Mitochondrien und daraus resultierend, wie in der Literatur mehrfach beschrieben, zur vermehrten Thermogenese (Cannon and Nedergaard, 2004; Ukropec et al., 2006; Fedorenko et al., 2012). Die Bildung von Wärme stellt neben dem Verbrauch von Energie zur Erzeugung von Muskelkraft und der Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen einen der wichtigsten Prozesse zum Verbrauch von Energie im Körper dar. Dementsprechend wäre ein vermehrtes *Browning* von  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Gewebe ein potentieller Erklärungsansatz für den schlanken Phänotyp der BK-defizienten Tiere. Die Expression des braunen Fettzellmarkers *Uncoupling Protein 1* (Ucp1), gilt hierbei als Maß für das *Browning* von weißem Fettgewebe. Untersuchungen zur Ucp1 mRNA-Expression im iWAT mittels qRT-PCR zeigten eine signifikante Steigerung der Ucp1-Expression in  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Gewebe gegenüber Kontrollproben (s. Abb. 4.18e). Dies unterstützt die Hypothese, dass ein vermehrtes *Browning* und daraus resultierend eine vermehrte Thermogenese eine partielle Erklärung für den schlanken Phänotyp der  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Tiere darstellen könnte. Weitere Befunde Ucp1 betreffend werden unter Kapitel 4.3.8 und 4.3.9 behandelt.



**Abb. 4.18: Fettzellgröße und Adipozytenmarker in iWAT von adipoBK-Tieren**

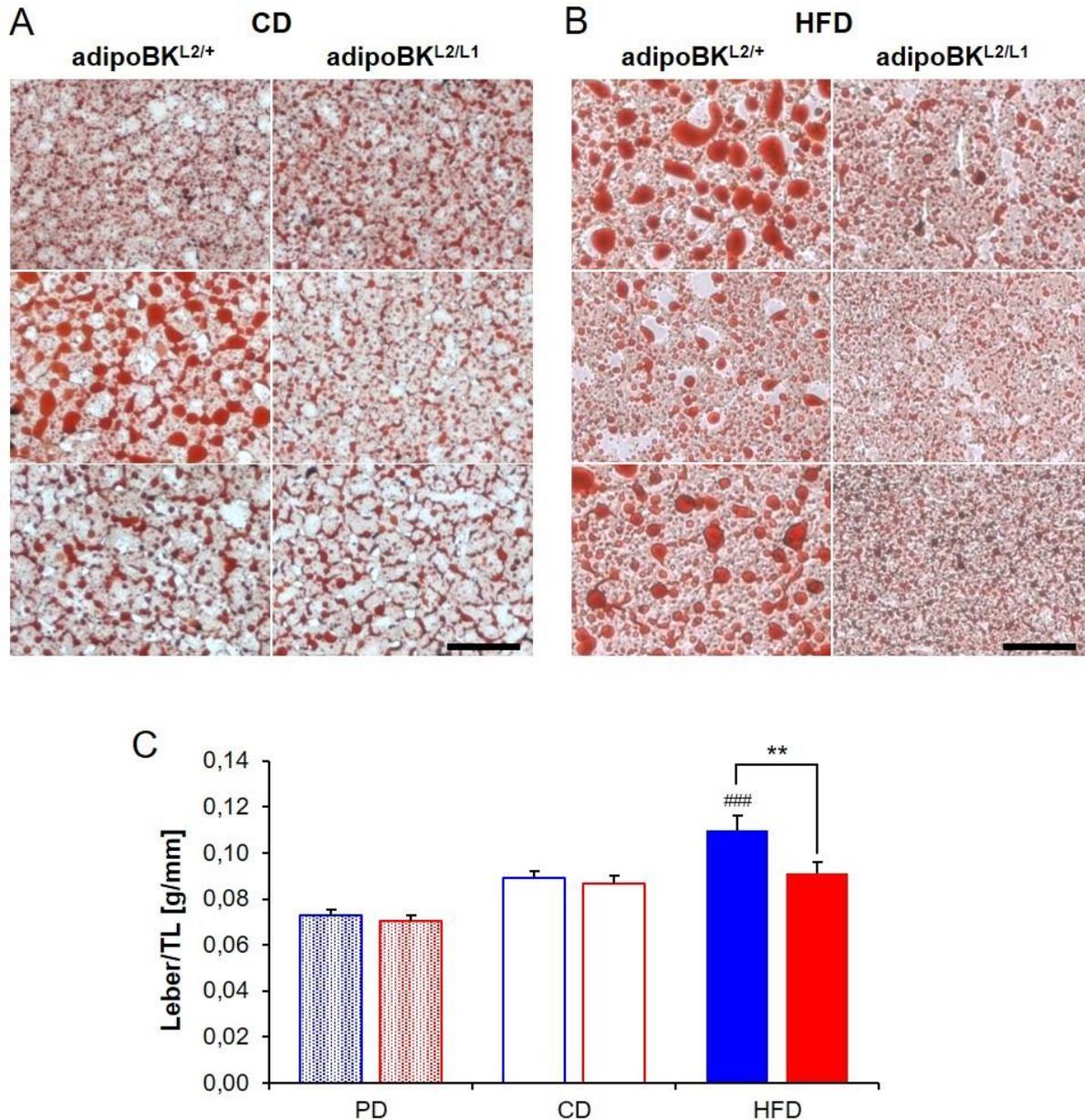
Untersuchung der Fettzellgröße und Fettzellgrößenverteilung durch Vermessung von Adipozyten in 5-10 repräsentativen Lichtmikroskopischen Aufnahmen von 14- $\mu\text{m}$  Gefrierschnitten des Leistenfettes (iWAT) aus Adipozyten-spezifischen BK-Kanal Knockout-Tieren (adipoBK<sup>L2/L1</sup>) und deren Kontroll-Wurfgeschwistern (adipoBK<sup>L2/+</sup>). Die Analyse erfolgte mit Hilfe der AxioVision Software (Zeiss). Bei der Auswertung wurde zwischen zentralen Bereichen (Mitte) und Randbereichen (Rand) der Gewebequerschnitte differenziert. **(A)** Fettzellgrößen in 10 Wochen alten (PD, gepunktete Füllung) ist identisch in adipoBK<sup>L2/+</sup> (blau, n=5) und adipoBK<sup>L2/L1</sup> (rot, n=5) Tieren waren identisch. Nach Kontrolldiät (CD, ohne Füllung) sind die adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=5) iWAT-Zellen in zentral gelegenen Geweberegionen sowie im Mittel signifikant hypertropher als iWAT-Zellen der adipoBK<sup>L2/L1</sup> Mäuse (n=4). Nach Hochfettdiät (HFD, ausgefüllte Symbole) sind adipoBK<sup>L2/+</sup>-Adipozyten (n=6) ebenfalls signifikant hypertroph gegenüber adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Zellen (n=6). **(B)** Klassifizierung der Fettzellgrößen zeigt deutlich größere Anteile an kleinen Fettzellen PD und nach CD gegenüber HFD. AdipoBK<sup>L2/+</sup>-Gewebe enthält tendenziell mehr große Fettzellen als adipoBK<sup>L2/L1</sup> nach CD und HFD. **(C)** Repräsentative Ausschnitte aus ungefärbten Gefrierschnitten von adipoBK<sup>L2/+</sup> und adipoBK<sup>L2/L1</sup> PD sowie nach CD und HFD. **(D, E)** Untersuchung der relativen messenger RNA (mRNA)-Expression in iWAT, bezogen auf  $\beta$ -Aktin, mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR). **(D)** Interleukin 6 (IL-6) Expression ist signifikant geringer in adipoBK<sup>L2/L1</sup>- (n=8) gegenüber adipoBK<sup>L2/+</sup>-iWAT (n=8). **(E)** Signifikant erhöhte Expression von *Uncoupling Protein 1* (Ucp1) in adipoBK<sup>L2/L1</sup>- (n=8) gegenüber adipoBK<sup>L2/+</sup>-iWAT (n=8). **(A, D, E)** Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \* p < 0,05. **(C)** Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

### 4.3.6 Auswirkung der Adipozyten-spezifischen BK-Kanal-Deletion auf Lebergewicht und Fetteinlagerung in der Leber

Auch eine massive Verfettung der Leber, eine sogenannte NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*) stellt eine häufige und schwerwiegende Folgeerkrankung von Übergewicht dar und ist oft Vorläufer für weitaus schwerwiegendere Lebererkrankungen wie Lebersteatosen oder im schlimmsten Fall Hepatocarcinome.

Wie im Zuge dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte kann eine globale Deletion des BK-Kanals vor übermäßiger Fetteinlagerung in die Leber und einer daraus resultierenden NAFLD schützen (s. Abb. 4.5). Ob auch die Adipozyten-spezifische BK-Kanal-Exzision diesen Schutz bieten kann, oder ob hierfür neuronale BK-Kanäle oder beispielsweise BK-Kanäle in den Hepatozyten selbst verantwortlich sind ist bislang unklar wurde und wurde im Zuge dieser Arbeit mit Hilfe des adipoBK-Modells näher untersucht.

Interessanterweise ergab die Ölrot-Färbung von hepatischen Gefrierschnitten bereits nach CD-Fütterung einen partiellen Schutz vor hepatischen Fetteinlagerungen in den schlanken adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Mäusen (s. Abb. 4.19a). Nach HFD-Fütterung war das Ausmaß dieser Protektion sogar noch deutlicher (s. Abb. 4.19b). Dies spiegelt sich auch in den erhobenen Lebergewichten, normiert auf die Tibialänge, wieder. Während im Alter von 10 Wochen sowie nach CD-Fütterung hinsichtlich der normierten Lebermasse kein Unterschied zwischen den beiden adipoBK-Genotypen festzustellen war, führte die HFD-Fütterung in den adipoBK<sup>L2/+</sup>-Tieren zu einer hochsignifikanten Zunahme des Lebergewichtes. Diese war auch gegenüber adipoBK<sup>L2/L1</sup> nach HFD-Fütterung signifikant erhöht (s. Abb. 4.19c). Die Deletion des BK-Kanals in Adipozyten scheint demnach, ähnlich wie die globale BK-Ausschaltung, zuverlässig vor einer massiven Verfettung der Leber und der daraus resultierenden NAFLD und möglicherweise weiteren Folgeerkrankungen zu schützen.



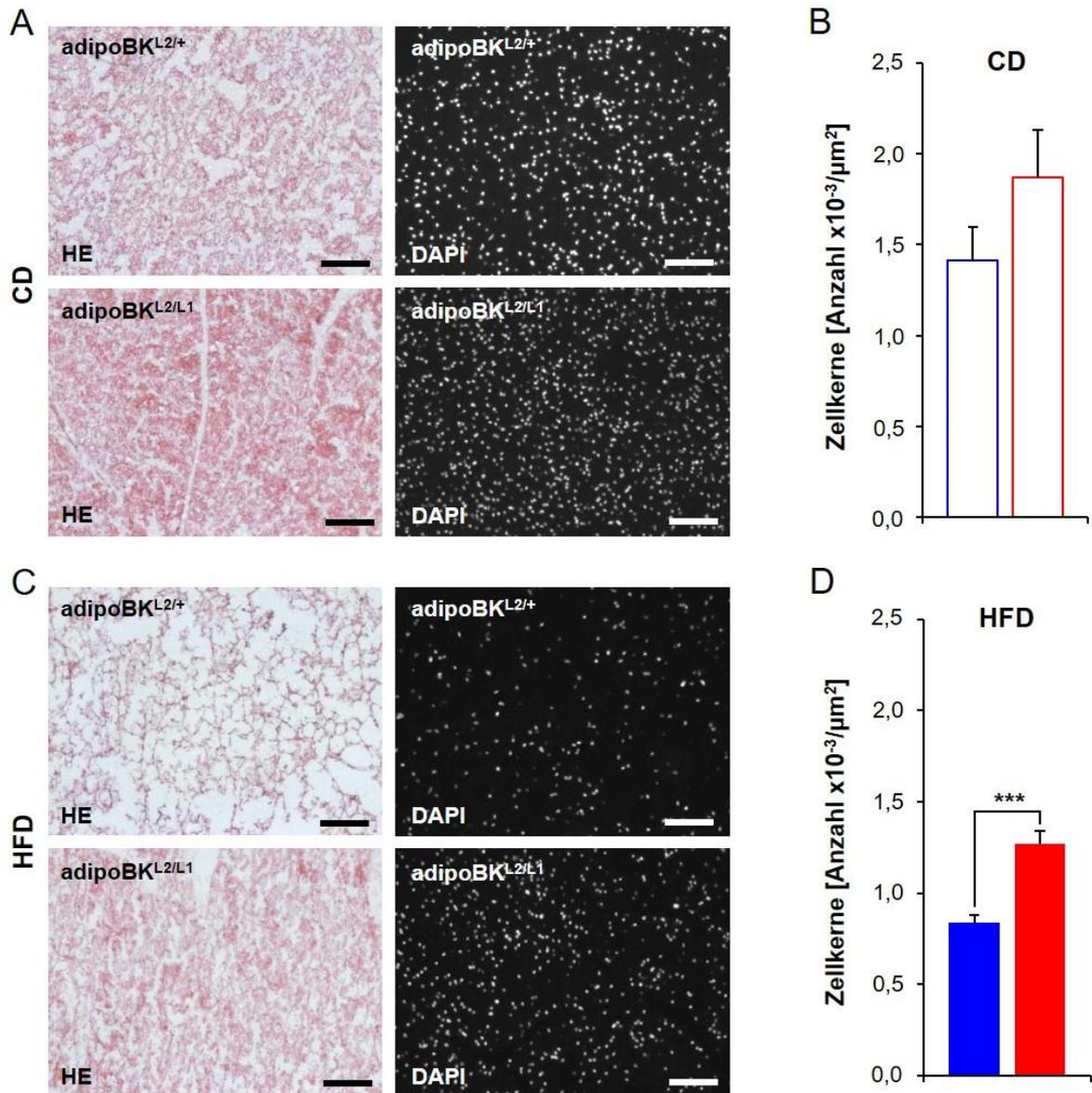
**Abb. 4.19: Analyse der Leber von adipoBK-Mäusen**

Repräsentative Darstellung von Ölrot-gefärbten, 8 µm dicken Gefrierschnitten aus Lebern von Kontrollmäusen (adipoBK<sup>L2/+</sup>, n=3) und Tieren mit BK-Kanal-Knockout in Adipozyten (adipoBK<sup>L2/L1</sup>, n=3) Tieren nach Kontrolldiät (CD)- **(A)** oder Hochfettdiät (HFD)-Fütterung **(B)**. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Gewebeausschnitt pro Tier. Fetteinlagerungen sind als rot angefärbte Tropfen zu erkennen. AdipoBK<sup>L2/L1</sup>-Gewebe weist hierbei im Vergleich zu adipoBK<sup>L2/+</sup>-Leber sowohl nach CD als auch insbesondere nach HFD deutlich geringere Abschnitte an Ölrot-gefärbten Fetteinlagerungen auf. **(C)** Die Lebermasse, normiert auf die Tibialänge (TL), ist vor diätetischer Fütterung (PD) in adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren (rot, n=12) und adipoBK<sup>L2/+</sup>-Tieren (blau, n=9) nicht unterschiedlich. Auch nach CD-Fütterung sind keine Unterschiede im normierten Lebergewicht vorhanden (adipoBK<sup>L2/L1</sup> n=16, adipoBK<sup>L2/+</sup> n=20), die Leber/TL-Verhältnisse der über 18 Wochen CD-gefütterten Mäuse liegen jedoch insgesamt etwas höher. Nach HFD zeigen adipoBK<sup>L2/+</sup> Mäuse (n=18) signifikant erhöhte Lebermassen gegenüber adipoBK<sup>L2/L1</sup>- (n=21) sowie gegenüber adipoBK<sup>L2/+</sup>-Mäusen nach CD (#).

### 4.3.7 Untersuchung der BAT-Morphologie im adipoBK-Mausmodell nach Fütterung verschiedener Diäten

Die Untersuchung der Ucp1 mRNA-Expression in iWAT von adipoBK-Tieren ergab nach HFD eine signifikante Erhöhung in der adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Kohorte, gegenüber den Kontrollen (s. Abb. 4.18d). Auf Grund dieses Hinweises auf ein vermehrtes *Browning* im iWAT wurde im Zuge dieser Arbeit auch die Morphologie des braunen Fettgewebes näher untersucht. Hierfür wurden Gefrierschnitte von BAT nach CD- oder HFD-Fütterung angefertigt (s. Kapitel 3.5.2.2). Hämatoxylin & Eosin Färbung der Schnitte (s. Kapitel 3.5.2.3) ergab bereits nach CD eine Hypertrophie der BAT-Zellen in adipoBK<sup>L2/+</sup>, welche in adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Schnitten nicht nachweisbar war (s. Abb. 4.20a, links). Auch die Fluoreszenzfärbung der Kerne mittels Hoechst® (s. Kapitel 3.5.2.5) ergab in Übersichtsaufnahmen eine höhere Kerndichte in den adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Schnitten (s. Abb. 4.20a, rechts). Die Quantifizierung der angefärbten Zellkerne mittels semiautomatisierter Methode (s. Kapitel 3.5.4) bestätigte nach CD-Fütterung eine tendenziell erhöhte Anzahl an Zellkernen pro  $\mu\text{m}^2$  in BK-defizientem Fettgewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe (s. Abb. 4.20b).

Nach Hochfett-Diät konnte in HE-gefärbtem Kontrollgewebe eine stark ausgeprägte Hypertrophie der BAT-Zellen beobachtet werden, wohingegen adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Gewebe auch hier noch immer geschützt zu sein scheint (s. Abb. 4.20c, links). Repräsentative Bilder der Schnitte nach Kernfärbung zeigen erneut eine deutlich erhöhte Zellkerndichte im adipoBK<sup>L2/L1</sup> BAT (s. Abb. 4.20c, rechts), welche durch die semiautomatisierte Quantifizierung der Zellkerne bestätigt werden konnte. Die Deletion des BK-Kanals in Adipozyten resultiere demnach in einer hochsignifikanten Erhöhung der Zellkerndichte nach HFD-Fütterung gegenüber adipoBK-Kontrollen (s. Abb. 4.20d). Die verringerte Hypertrophie des adipoBK<sup>L2/L1</sup> BATs kann als Hinweis auf eine Verbesserung der BAT-Aktivität nach BK-Kanal-Ablation gewertet werden. In Übereinstimmung mit dieser Schlussfolgerung ist auch der BMI bekanntermaßen negativ mit der BAT-Aktivität korreliert (van Marken Lichtenbelt et al., 2009).



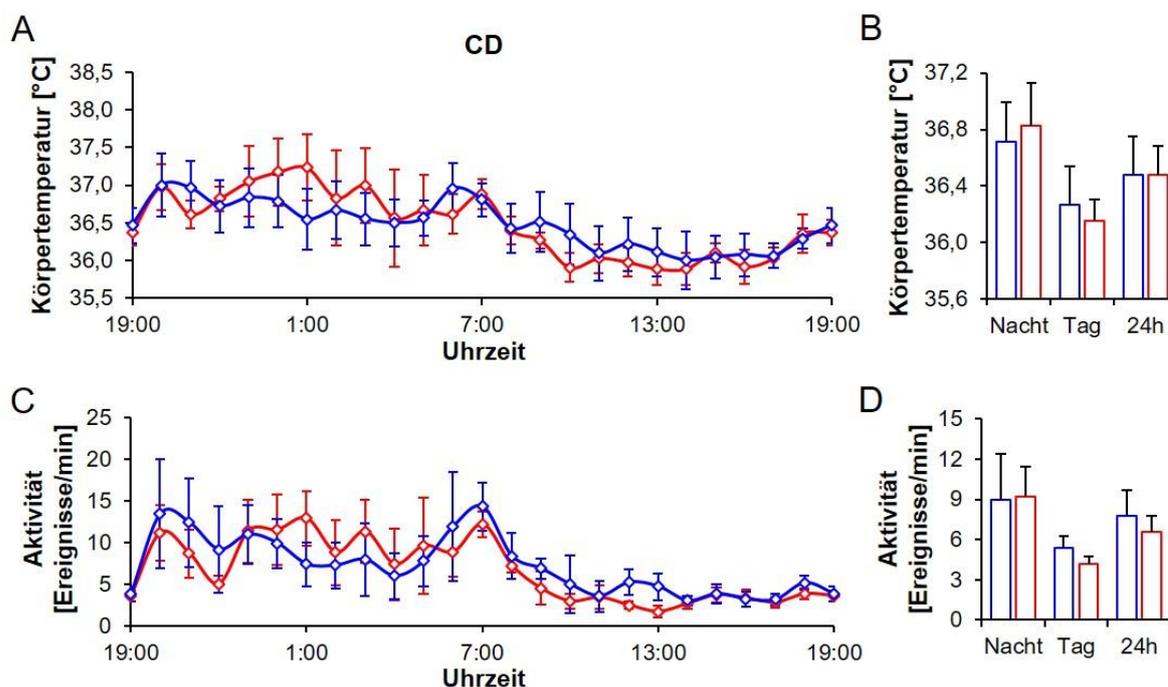
**Abb. 4.20: Verminderte BAT-Hypertrophie in adipoBK<sup>L2/L1</sup> nach HFD**

**(A)** Repräsentative Darstellung von Hämatoxylin & Eosin (HE)-gefärbten 8- $\mu\text{m}$  Gefrierschnitten aus braunem Fettgewebe (BAT) von Tieren mit Adipozyten-spezifischer BK-Kanal Deletion (adipoBK<sup>L2/L1</sup>) und Wildtyp-Wurfgeschwistern (adipoBK<sup>L2/+</sup>) nach Kontrolldiät (CD)-Fütterung (linke Spalte) zeigen leicht verminderte Hypertrophie in adipoBK<sup>L2/L1</sup>. Gefrierschnitte mit Kernfärbung mittels Hoechst® (DAPI) sind in der rechten Spalte dargestellt. **(B)** Auszählung der Zellkerne aus 5-10 repräsentativen Aufnahmen der Fluoreszenzfärbung, mittels FIJI-Software, zeigt eine tendenziell höhere Zellkerndichte in adipoBK<sup>L2/L1</sup> (n=5) gegenüber adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=5). **(C)** Deutlich reduzierte Hypertrophie in HE-gefärbten Gefrierschnitten von BAT aus adipoBK<sup>L2/L1</sup> gegenüber adipoBK<sup>L2/+</sup> (linke Spalte). Kernfärbung mittels Hoechst® von BAT-Gewebe ist in der rechten Spalte dargestellt. **(D)** Ermittlung der Zellkerndichte zeigt hochsignifikant mehr Zellkerne pro Fläche in adipoBK<sup>L2/L1</sup> (n=5) verglichen mit adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=5). **(A, C)** Maßstabsbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$ . **(B, D)** Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 4.3.8 Erhöhte Körpertemperatur und Aktivität in $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ nach HFD-Fütterung

Da sich sowohl durch den Befund der erhöhten *Ucp1* mRNA-Spiegel im iWAT nach HFD (s. Abb. 4.18e), als auch die durch verminderte Hypertrophie des BATs in  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  (s. Abb. 4.20a-d) Hinweise auf eine potentielle Beteiligung des BAT/*Browning* Systems auf den Phänotyp der  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Tiere ergeben, sollte in weiteren Versuchen die Auswirkung einer vermehrten BAT-Aktivität und/oder eines vermehrten *Brownings* von WAT untersucht werden. Da beides in einem Anstieg der zitterfreien Thermogenese resultiert wurde hierzu die Körperkerntemperatur der  $\text{adipoBK}$ -Tiere mit Hilfe eines Telemetrie-basierten Detektionssystems aufgenommen und anschließend im Tagesprofil ausgewertet. Um Gewichts- oder Temperatur-modulierende Effekte durch potentiell veränderte lokomotorische Aktivität ausschließen zu können wurde auch diese im telemetrischen Setup erfasst.

Nach Kontrolldiät ergab sich hierbei jedoch für die ermittelte Körpertemperatur weder im Tagesprofil (s. Abb. 4.21a), noch hinsichtlich der gemittelten Werte der Hell- oder Dunkelphase (s. Abb. 4.21b) ein Unterschied zwischen den  $\text{adipoBK}$  Genotypen, der auf eine vermehrte Thermogenese hingewiesen hätte. Auch die Aktivität der Tiere ergab keinerlei Divergenz zwischen den Genotypen (s. Abb. 4.21c-d). Ebenso war zu Beginn der Diät weder unter Kontrolldiät (s. Suppl. Abb. 9a-d) noch unter Hochfettdiät (s. Suppl. Abb. 9e-h) ein Unterschied in der Körpertemperatur oder der lokomotorischen Aktivität zu verzeichnen.



**Abb. 4.21: Telemetrische Erfassung von Körpertemperatur und Aktivität in  $\text{adipoBK}$  Mäusen während der CD-Fütterung**

Mittels telemetrischer Messung erfasste Körpertemperatur und lokomotorische Aktivität von 30 Wochen alten Adipozyten-spezifischen BK-Kanal-Knockout Mäusen ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ ) und deren Kontroll-Wurfgeschwister ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ ) unter Kontrolldiät (CD). Die Haltung der Tiere erfolgt innerhalb eines 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (7h-19h). **(A)** Darstellung der Körpertemperatur im Tagesprofil zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$  (blau, n=4) und  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  (rot, n=4). **(B)** Die gemittelte Körpertemperatur über Nacht (19h-7h), Tag (7h-19h) oder 24h (7h-7h) ist nicht signifikant

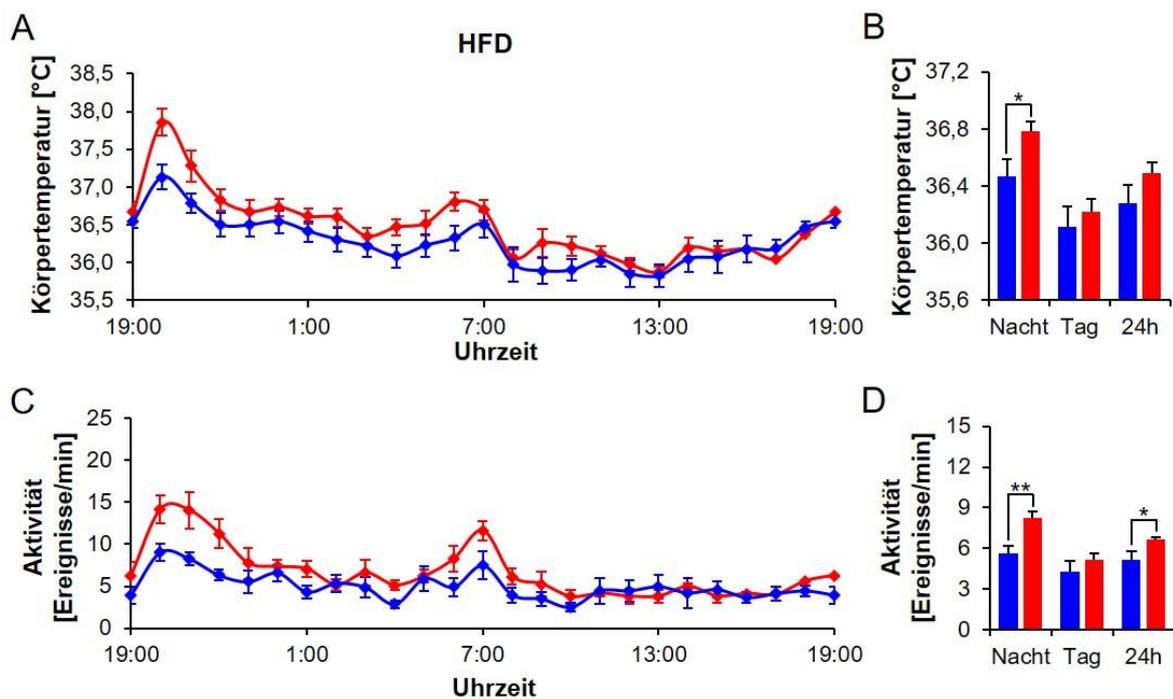
unterschiedlich zwischen den beiden Genotypen. **(C)** Die Aktivität der Tiere im Tagesverlauf unterscheidet sich zwischen  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  und  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$  nicht. **(D)** Die gemittelte Aktivität während der Nacht, dem Tag oder innerhalb 24h zeigte ebenfalls keine Genotyp-bedingten Unterschiede. **(A-D)** Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM).

Im Gegensatz zu diesen Befunden auf CD, konnte im Tagesprofil während der aktiven Dunkelphase nach Hochfettdiät-Fütterung eine deutlich höhere Körpertemperatur in  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Tieren detektiert werden (s. Abb. 4.22a). Dies resultierte auch im 12-Stunden Mittel in einer signifikant erhöhten Temperatur von etwa  $0,3\text{ °C}$  ( $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$   $36,78 \pm 0,07\text{ °C}$  versus  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$   $36,46 \pm 0,12\text{ °C}$ ). Auch Während der Tag-Phase sowie im 24-Stunden Mittel war die Körpertemperatur der Knockout-Tiere leicht erhöht (s. Abb. 4.22b), was Hinweis auf eine vermehrte Ucp1-abhängige Thermogenese der  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Tiere sein könnte.

Die Ermittlung der lokomotorischen Aktivität ergab jedoch auch eine verminderte Aktivität in  $\text{adipoBK}$ -Kontrolltieren nach 18-wöchiger HFD-Gabe (s. Abb. 4.22c). Sowohl im Mittel der Nacht-Phase wie auch im 24-Stunden Mittel war eine signifikante Reduktion der Aktivität der  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ -Mäuse zu erkennen (s. Abb. 4.22d). Diese verringerte lokomotorische Aktivität ist möglicherweise auf das erhöhte Körpergewicht und -volumen der Tiere sowie die damit assoziierte Bewegungseinschränkung zurück zu führen.

In den schlankeren  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Mäusen ließ sich eine entsprechend erhöhte Aktivität der Tiere feststellen (s. Abb. 4.22c+d). Dass hier auch die Aktivitäts-induzierte Thermogenese zu einem Anstieg der Körpertemperatur beiträgt kann demensprechend nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Dennoch legen die bisherigen Befunde zur Ucp1-Expression im iWAT (s. Abb. 4.18e) und den morphologischen Unterschiede im BAT (s. Abb. 4.20) auch eine Beteiligung von braunem Fettgewebe und vor allem auch von *Browning* weißer Fettdepots an der erhöhten Körpertemperatur der  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Tiere nahe.



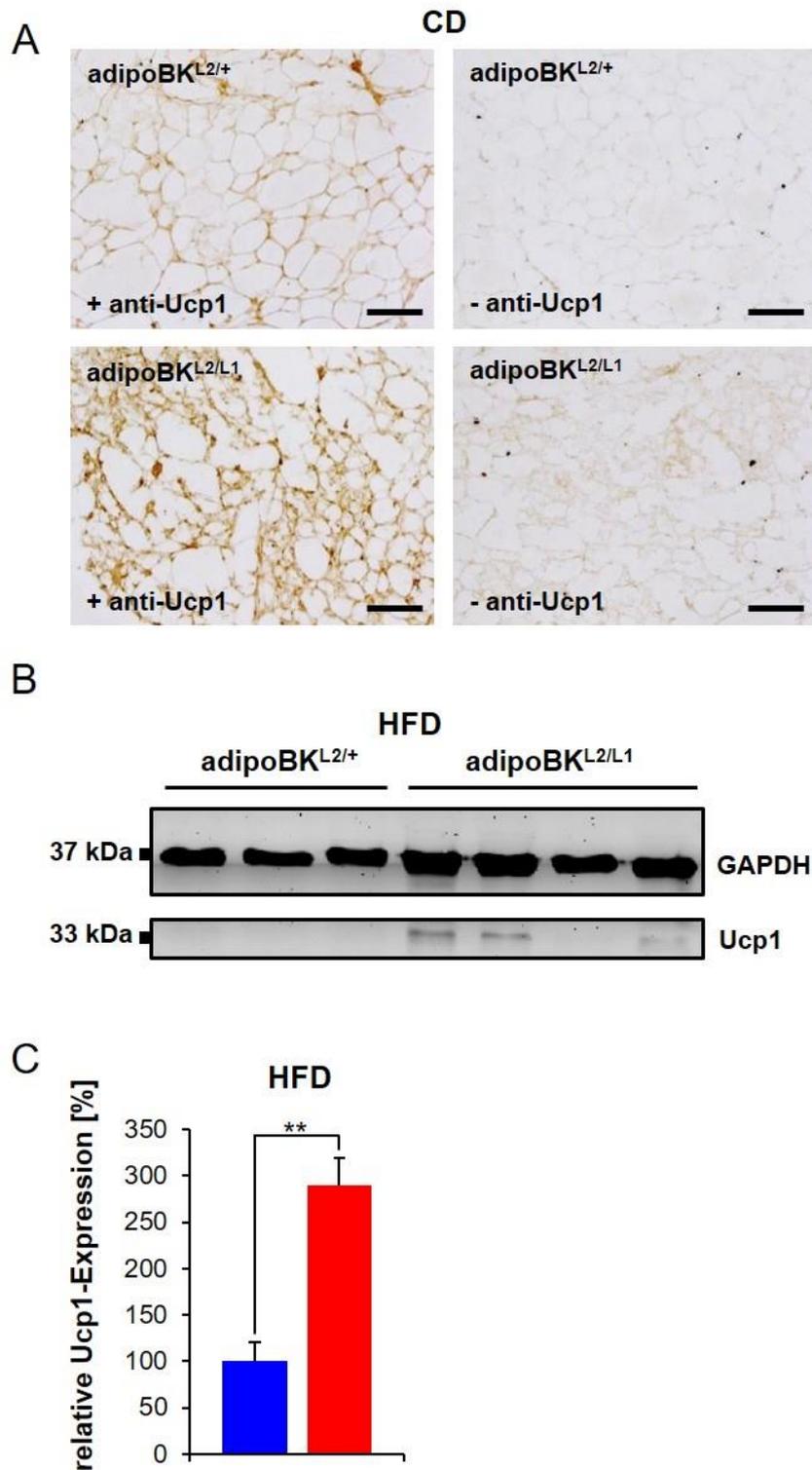
#### Abb. 4.22: Telemetrische Erfassung von Körpertemperatur und Aktivität in adipoBK Mäusen während der HFD-Fütterung

Mittels telemetrischer Messung erfasste Körpertemperatur und lokomotorische Aktivität von 30 Wochen alten Adipozyten-spezifischen BK-Kanal-Knockout Mäusen (adipoBK<sup>L2/L1</sup>) und deren Kontroll-Wurfgeschwister (adipoBK<sup>L2/+</sup>) unter Hochfett-diät (HFD). Die Haltung der Tiere erfolgt innerhalb eines 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (7h-19h). **(A)** Darstellung der Körpertemperatur im Tagesprofil zeigt eine Erhöhung der Körpertemperatur in adipoBK<sup>L2/L1</sup> (rot, n=6) gegenüber adipoBK<sup>L2/+</sup> (blau, n=6) während der aktiven Phase der Tiere (Nacht). **(B)** Die mittlere Körpertemperatur der adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tiere ist während der aktiven Phase (19h-7h) gegenüber der adipoBK<sup>L2/+</sup>-Körperkerntemperatur signifikant erhöht. Während des Tages (7h-19h) sowie im 24h-Mittel (7h-7h) ist kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu sehen. **(C)** Die Aktivität der Tiere im 24-Stundenverlauf scheint, während der Nacht-Phase, in den adipoBK<sup>L2/L1</sup> Tieren leicht erhöht. **(D)** Die gemittelte nächtliche Aktivität der adipoBK<sup>L2/L1</sup> Mäuse, sowie der 24h-Mittelwert sind gegenüber adipoBK<sup>L2/+</sup> Wurfgeschwisterkontrollen signifikant erhöht in **(A-D)** Abbildungen zeigen Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

#### 4.3.9 Hinweise auf vermehrtes *Browning* im iWAT von adipoBK<sup>L2/L1</sup> Tieren nach CD- und HFD-Fütterung

Um diese Hypothese bezüglich der Beteiligung des adipozytären BK-Kanals an *Browning*-Prozessen weiter nachzugehen wurde auch iWAT von adipoBK-Tieren hinsichtlich der Ucp1-Expression untersucht. Die immunhistochemische Färbung des Proteins mittels DAB-Methode (s. Kapitel 3.5.2.4) ergab in Gefrierschnitten aus iWAT nach Kontroll-diät eine deutliche Braunfärbung in adipoBK<sup>L2/L1</sup>, wohingegen weder in adipoBK<sup>L2/+</sup>-Geweben noch in den Negativkontrollen (ohne Primärantikörper) eine erkennbare Ucp1-indizierende Braunfärbung zu detektieren war. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Zellgrößen-Analyse in den adipoBKs nach CD-Fütterung (s. Abb. 4.18a+b), welche in den adipoBK-defizienten Tieren einen > 80%-igen Anteil an sehr kleinen Fettzellen mit einer Querschnittsfläche von weniger als 1000 µm<sup>2</sup> offenbarte. Dieser kleinzellige Zellverband, welcher auch in den repräsentativen lichtmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen ist (s. Abb. 4.18c, mittig), weist morphologisch eine hohe Ähnlichkeit mit dem braunem Fettgewebe auf (s. Abb. 4.20a+c).

Auch nach HFD-Fütterung war mittels Western Blot Analyse (s. Kapitel 3.5.7.4) eine deutlich erhöhte Menge an Ucp1-Protein in den adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Proben detektierbar. (s. Abb. 4.23b). Nach Normierung der quantifizierten Immunoblots ergab sich für das BK-Kanal negative iWAT HFD-gefütterter adipoBK<sup>L2/L1</sup> Mäuse eine signifikant erhöhte relative Ucp1-Expression (s. Abb. 4.23c).



**Abb. 4.23: Untersuchung der Ucp1-Expression im iWAT von adipoBK Tieren**

**(A)** Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten des Leistenfettes (iWAT) mittels DAB-Methode. Die Visualisierung der Expression von *Uncoupling* Protein 1 (Ucp1) wird durch braune Färbung des mit Primärantikörper (anti-Ucp1) behandelten Gewebes ermöglicht. Gewebe aus Adipozyten-spezifischen BK-Kanal-defizienten Tieren (adipoBK<sup>L2/L1</sup>) weisen eine deutlich stärkere Braunfärbung als Gewebe aus Kontroll-Tieren (adipoBK<sup>L2/+</sup>) auf. Negativ-Kontrollen (ohne Primärantikörper) zeigen die Spezifität des anti-Ucp1-Antikörpers. **(B)** Untersuchung der Ucp1-Expression in iWAT mittels Western Blot nach Hochfettdiät (HFD) zeigt vermehrtes Vorkommen von

Ucp1 in adipoBK<sup>L2/L1</sup> Geweben. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) dient als Ladungskontrolle **(C)** Quantifizierung des Western Blots zeigt eine signifikant erhöhte Expression von Ucp1, normiert auf GAPDH, in adipoBK<sup>L2/L1</sup> (n=4) bezogen auf adipoBK<sup>L2/+</sup>-Gewebe (n=3). **(A)** Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. **(C)** Abbildung zeigt Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). \*\* p < 0,01.

Zusammengefasst belegen die Befunde zur Ucp1-Expression (s. Abb. 4.18e und Abb. 4.23b+c) sowie die erhöhten Körperkerntemperaturen (s. Abb. 4.22) die Hypothese, dass der adipozytäre BK-Kanal direkt in die Regulation des *Brownings* und/oder der BAT-Aktivität involviert ist. Die Deletion des Kanals scheint mit einer Zunahme der Ucp1-assoziierten Thermogenese assoziiert, was wiederum als eine wichtige Komponente des schlanken Phänotyps der adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tiere zu verstehen ist. Körpergewichtsvorteile sowie eine gesündere Körperstruktur mit geringem Fettanteil (s. Abb. 4.15) führen, wahrscheinlich sekundär, auch zu Veränderungen im Aktivitätsprofil der Tiere (s. Abb. 4.22). Hierbei präsentieren sich die adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tiere mit einer Aktivitätserhöhung, was wiederum zu einem vermehrten Arbeitsumsatz und damit Aktivitäts-induzierter Thermogenese und Einem Anstieg der Körperkerntemperatur führen kann.

## 5 Diskussion

Adipositas und insbesondere auch die damit assoziierten Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I und II (Colditz et al., 1990; Harris et al., 1998; Hypponen et al., 2000; Kanaya et al., 2004), Hypertonie und vaskuläre Erkrankungen (Mahajan et al., 2015), vaskuläre Demenz (Gustafson et al., 2003; Kanaya et al., 2004), obstruktive Atemwegsbeschwerden und Gelenkschmerzen sowie Arthrose und rheumatoide Arthritis (Pedersen et al., 2006; Crowson et al., 2013; Wesley et al., 2013; Daien and Sellam, 2015) stellen in der heutigen Zeit ein immer größer werdendes Gesundheitsrisiko dar, welches mittlerweile weltweit pandemische Ausmaße annimmt. Neben den gesundheitlichen und soziopsychologischen Aspekten der Erkrankung stellen auch die damit einhergehenden massiven Kosten für das Gesundheitssystem ein immer größer werdendes Problem dar. Obwohl sich die Adipositas-Forschung besonders in den letzten Jahren enorm weiterentwickelt hat und viele neue Erkenntnisse hinsichtlich der Pathogenese der Erkrankung beschrieben wurden, ist es bislang nicht gelungen, effektive und erfolgsversprechende Therapiemethoden gegen diese Volkskrankheit zu entwickeln. Nicht zuletzt ist dies auf die Vielzahl der Pathogenitätsfaktoren zurück zu führen. Um eine weitere Ausbreitung verhindern zu können, werden aus diesem Grund dringend neue Therapieansätze benötigt. In mehreren Arbeiten konnte in den letzten Jahren ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von Adipositas in Mensch und Tier und dem BK-Kanal aufgedeckt werden (Hu et al., 2009; Jiao et al., 2011; Zhang et al., 2012), welcher durch aktuelle Befunde der Arbeitsgruppen Prof. Ruth und JProf. Lukowski (B. Mohammad, unveröffentlichte Dissertation, Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen, 2014) und die hier vorliegende Dissertation ganz klar bestätigt und weiter untermauert werden konnten.

Konkret wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss des BK-Kanals auf die Entstehung von Übergewicht und Adipositas untersucht. Insbesondere die peripheren Effekte des adipozytären BK-Kanals in Hinblick auf Neubildung von Fettzellen sowie deren Proliferation standen dabei im Fokus dieser Arbeit. Die *in vitro* Experimente wurden durch Untersuchungen in Mausmodellen mit globaler und *fettzellspezifischer BK-Kanal Ablation ergänzt*. Ziel dieser Versuche war es, die Suszeptibilität der Mäuse mit BK-Kanal-Ablation im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zu analysieren. Zusammengenommen deuten die Entwicklung des Körpergewichts sowie Analysen zur Körperzusammensetzung und Thermogenese nach CD- und HFD-Fütterung in den BK-defizienten Mausmodellen daraufhin, dass der (adipozytäre) BK-Kanal effektiv vor DIO, sowie exzessiver Fetteinlagerung und weiteren metabolischen Veränderungen schützt.

Neben offensichtlichen und naheliegenden Faktoren wie dem Ausmaß der Nahrungszufuhr und dem diesem gegenüberstehenden Verbrauch von Energie durch körperliche Aktivität wurde in den letzten Jahren immer mehr deutlich, dass die Entwicklung von Körpergewicht und Körperstruktur und damit einhergehend auch die Entstehung von Erkrankungen wie Adipositas oder dem metabolischen Syndrom durch ein komplexes Netzwerk vieler Faktoren beeinflusst wird. Das Darmmikrobiom (Backhed et al., 2005; Turnbaugh et al., 2006; Chen et al., 2014; Barlow et al., 2015), ebenso wie genetische Faktoren (Farooqi et al., 2003; Roth et al., 2004; Lee and Cui, 2009; Ahmad et al., 2013), spielen eine zentrale Rolle bei der

Regulation der Energiehomöostase des Körpers. Ionenkanäle sind auf Grund ihrer weiten Expression sowie ihrer essentiellen Funktion in erregbaren und nicht-erregbaren Zellen für nahezu alle physiologischen Prozesse im Körper von besonderer Bedeutung. Sie sind beispielsweise in der Lage, die fein justierten neuronalen Prozesse der Regulation von Hunger und Sättigungsgefühl zu steuern und somit die Nahrungsaufnahme zu regulieren (Fadool et al., 2011; Straub et al., 2011; Chen et al., 2016). Auch der Glucose-Metabolismus und die Energiehomöostase können direkt durch Ionenkanäle reguliert und moduliert werden, was bereits in Kapitel 1.5 näher ausgeführt wurde.

Der BK-Kanal ist hierbei neben anderen Kaliumkanälen immer wieder in den Fokus verschiedener Forschergruppen gerückt. Seine Identifikation in murinen 3T3-L1-Prädipozyten (Zhang et al., 2012) sowie in humanen Prädipozyten (Hu et al., 2009) und insbesondere seine zentrale Funktion bei der Zellzyklusprogression (Hu et al., 2009) legen bereits einen hohen Stellenwert bei der Steuerung der Fettzellreifung und sowie der Proliferation der Prädipozyten nahe. Eine erst kürzlich veröffentlichte genomweite Assoziationsstudie belegt die Existenz des BK-Kanals in subkutanem abdominellem Fettgewebe und isolierten humanen Fettzellen von Patienten und stellt darüber hinaus einen klaren Zusammenhang zwischen einer massiven Überexpression des BK-Kanals und schwerer Adipositas her (Jiao et al., 2011). Diese Befunde implizieren, dass der BK-Kanal ein wichtiges neues Target zur Steuerung der Körpergewichtsentwicklung und somit im Endeffekt auch einen Angriffspunkt zur Therapie und Prävention von Adipositas darstellt.

## **5.1 Adipozytäre BK-Kanal-Deletion schützt effektiv vor exzessiver Gewichtszunahme und Adipositas**

Durch Analyse verschiedener BK-Kanal-defizienter Mauslinien konnten wir zeigen, dass der adipozytäre BK-Kanal bei der Entstehung und Manifestation von Adipositas und Diabetes eine Rolle spielt. In Übereinstimmung mit den GWAS-Befunden der Gruppe um H. Jiao (Jiao et al., 2011) ergab die Analyse von Mäusen mit globaler Deletion des BK-Kanals eine massiv reduzierte Zunahme des Körpergewichtes unter HFD-Fütterung, ein Befund der insbesondere mit einer Reduktion des Körperfettanteils in Zusammenhang steht (s. Abb. 4.3). Die aufgenommene Nahrungsmenge der beiden Genotypen unterschied sich hierbei nicht (s. Suppl. Abb. 2e), was wiederum den Schluss nahelegt, dass die BK-Kanal Deletion Einfluss auf die Nahrungsverwertung und/oder die Energiehomöostase zu haben scheint, nicht jedoch auf das Sättigungsgefühl oder die Quantität der Nahrungsaufnahme. Ebenso wie bei einer extrem fettreichen Nahrung scheinen BK-defiziente Tiere auch vor exzessiver Gewichtszunahme durch die Gabe einer Kohlenhydrat-reichen Diät geschützt zu sein (s. Suppl. Abb. 3). Dies legt die Vermutung nahe, dass die protektiven Effekte der BK-Kanal Ablation in einer Nährstoff-unabhängigen Weise wirken und/oder der BK-Kanal sowohl Stoffwechselwege der Kohlenhydrat- als auch der Fett-Verwertung beeinflusst.

Darüber hinaus führte die globale Deletion des BK-Kanals auch in dem etablierten ob/ob Adipositas-Modell zu einer hochsignifikanten Reduktion des Körpergewichtes und der Körperfettmasse (s. Abb. 4.10a-f), was den BK-Kanal auch zu einem potentiellen Target für die Therapie schwer adipöser humaner Probanden macht. Besonders der positive Einfluss auf die Körperfettmasse stellt hierbei ein vielversprechendes Resultat dar, da weniger das

Körpergewicht als vielmehr der Fettanteil mit schwerwiegenden metabolischen und anderen pathologischen Effekten verbunden ist (Pouliot et al., 1992; Pouliot et al., 1994; Fontana et al., 2007; Nishimura et al., 2009a).

Wie vorausgegangene Arbeiten zeigen konnten (B. Mohammed, unveröffentlichte Dissertation, Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen, 2014), ist die verringerte Körpergewichtszunahme der globalen BK<sup>L1/L1</sup> Tiere teilweise auf die Deletion neuronaler BK-Kanäle, insbesondere im Bereich der hypothalamischen Bahnen, zurück zu führen. Die zentrale Deletion des BK-Kanals mittels Nestin-Cre Mausmodell konnte die Effekte des globalen BK-Knockouts jedoch nur partiell erklären, was wiederum auch eine Beteiligung peripherer BK-Kanäle an der Regulation von Körpergewicht und Adipogenese nahelegt. Unterstützt wird diese Vermutung durch die bereits beschriebenen Befunde von Jiao et al., welche eine Überexpression des BK-Kanals im Fettgewebe und in isolierten Adipozyten schwer adipöser Patienten beschreiben (Jiao et al., 2011).

Im Zuge dieser Arbeit gelang erstmalig auch der Nachweis der BK-Kanal-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene in verschiedenen BK<sup>+/+</sup> und adipoBK<sup>L2/+</sup> Fettdepots. Als *Spezifitätskontrollen dienten dabei die* Fettdepots der entsprechenden globalen bzw. gewebespezifischen Knockout-Tiere (s. Abb. 4.1, s. Abb. 4.12).

Elektrophysiologische Untersuchungen in Kooperation mit Prof. Mike Shipston (University of Edinburgh, UK) zeigten darüber hinaus sowohl in 3T3-L1-Prädipozyten wie auch in murinen Primärzellkulturen Evidenz für Paxillin-sensitive Ströme (s. Suppl. Abb. 5c + nicht gezeigte Daten). Der Anstieg an BK-Protein nach Fettzellreifung (s. Suppl. Abb. 5b) steht in Einklang mit dem Befund eines tendenziell höheren BK-mRNA Levels nach Induktion der Prädipozyten (s. Abb. 4.7h, s. Suppl. Abb. 5a). Es scheint möglich, dass der BK-Kanal nicht nur die Proliferation von Prädipozyten moduliert (Hu et al., 2009) sondern auch in reifen Fettzellen eine wichtige Funktion innehat. So könnte der BK-Kanal beispielsweise durch Modulation der intrazellulären Calciumionen-Konzentration direkt Einfluss auf die Calcineurin-vermittelte Steuerung der Differenzierung nehmen (Neal and Clipstone, 2002; Szabo et al., 2008). Aber auch eine Interaktion mit verschiedenen, in Fettzellen exprimierten, TRP-Kanälen scheint denkbar. Ein solches Zusammenspiel zwischen BK- und TRP-Kanälen konnte beispielsweise bereits in nephralen Geweben, Chondrozyten oder bronchialem Epithel gezeigt werden (Fernandez-Fernandez et al., 2008; Hdud et al., 2014b; Li et al., 2016). Die genauen zu Grunde liegenden Mechanismen werden zu einem späteren Zeitpunkt näher diskutiert (Abb. 5.1). Auch die im Zuge dieser Arbeit etablierten und durchgeführten Zellkultur-Experimente ergaben, dass der BK-Kanal offensichtlich auch in Fettzellen, Einfluss auf metabolische und/oder Proliferations- und Reifungs-Prozesse hat. Differenzierungs- und Wachstumsuntersuchungen an epididymalen Prädipozyten zeigten signifikante Unterschiede in der Generierung reifer Fettzellen zwischen BK<sup>+/+</sup> und BK<sup>L1/L1</sup>-Zellen. Auf Grund des schlankeren Phänotypes der BK-defizienten Mäuse und der Beobachtung Proliferations-hemmender Effekte durch BK-Blockade mittels Paxillin in 3T3L1-Zellen *in vitro* (Hu et al., 2009), war der Reifungsphänotyp der entsprechenden Prädipozyten zunächst unerwartet: In den BK-defizienten Prädipozytenkulturen waren mehr adhärente Zellen (s. Abb. 4.7d+e) und auch eine signifikant stärkere Ölrot-Färbung (s. Abb. 4.7a-c) zu beobachten. Dies lässt auf eine vermehrte Proliferation oder Differenzierung BK-defizienter Prädipozyten und Fettzellen

schließen, was als Hyperplasie im Sinne einer vermehrten Entstehung von kleinen Fettzellen zu verstehen ist (Mitschke et al., 2013). Kleine Fettzellen, welche wenig gefüllte Triglycerid-Vakuolen aufweisen, scheinen im Gegensatz zu hypertrophen Adipozyten nicht im Zusammenhang mit der vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Cytokine und der Entstehung von Insulinresistenz zu stehen. Damit ist ihre Bildung im Hinblick auf Adipositas und Diabetes eher günstig zu bewerten. Auch eine vermehrte Bildung brauner Fettzellen in dieser weißen Fettzellkultur könnte eine mögliche Erklärung für die vermehrte Entstehung reifer Adipozyten in BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen darstellen. Die qRT-PCR-Analyse klassischer *Browning*-Marker wie Ucp1, Prdm16, PGC1 $\alpha$  und PPAR $\gamma$  konnte diese Hypothese *in vitro* jedoch nicht bestätigen. Auf Grund der eher geringen Ausbeute an reifen Adipozyten in den eWAT-Kulturen (<20%) und dem gleichzeitig recht hohen Anteil an Fibroblasten sowie anderen Zelltypen der stromavaskulären Fraktion scheint die Vermutung naheliegend, dass insbesondere schwächer ausgeprägte Regulationen der *Browning*-Marker in diesem Versuchsansatz maskiert wurden. Darüber hinaus weisen eWAT-Kulturen eine geringere *Browning*-Kapazität auf, als subkutane iWAT-Depots (Mitschke et al., 2013). Möglicherweise müssen diese Analysen nach geeigneter Aufreinigung der Kulturen, beispielsweise nach Trypsinierung, wiederholt werden. Auf diese Weise wäre vermutlich eine deutliche Reduktion des Anteils der stromavaskulären Fraktion möglich. Hinsichtlich der Fettzellgröße ergaben sich bei der Analyse von eWAT-Depots aus BK<sup>+/+</sup> und BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren sowohl für die absolute Fettzellgröße, also auch nach deren Normierung auf die entsprechende Tibialänge signifikant geringere Werte für die BK-defizienten Tiere (Daten nicht gezeigt), was die These der Expansion von gesunden, kleinen Adipozyten zu untermauern scheint. Interessanterweise scheint dieser Effekt auf das eWAT beschränkt zu sein, denn iWAT-Zellen zeigten in Kultur keine signifikanten Genotyp-bedingten Unterschiede hinsichtlich des finalen Ölrot-Gehaltes. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen legen jedoch den Schluss nahe, dass auch in den Kulturen aus subkutanem Leistenfett BK-defiziente Zellen eine kleinzelligere Morphologie aufweisen als die korrespondierenden Wildtypzellen. Zusammenfassend liefern diese Befunde klare Hinweise auf eine Beteiligung des adipozytären BK-Kanals an der Fettzellreifung und/oder Proliferation der Zellen. Dementsprechend ist die genetische Deletion des Kanals direkt mit dem schlanken Phänotyp der BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere assoziiert. Die globale Deletion des BK-Kanals ist darüber hinaus jedoch auch mit einer Reihe negativer pathologischer Veränderungen wie Ataxie (Sausbier et al., 2004), Reizblasensymptomatik (Sprossmann et al., 2009), erektiler Dysfunktion (Werner et al., 2005; Werner et al., 2008) und Hypertonie (Patterson et al., 2002; Sausbier et al., 2005) assoziiert, was hinsichtlich eines systemischen Ansatzes zur Hemmung BK-Kanals bei Adipositas als nachteilig zu bewerten wäre.

Um selektiv die Rolle des BK-Kanals in Adipozyten untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe einer Adipozyten-spezifischen Cre-Mauslinie (Sassmann et al., 2010) eine Fettzell-spezifische BK-KO Mauslinie generiert. Die Effizienz der erst kürzlich generierten adipoCre-Linie wurde durch Verpaarung mit Doppel-Fluoreszenz Reporter-Tieren überprüft und ergab nach Tamoxifen-Injektion eine hocheffiziente, nahezu vollständige Aktivierung der Cre-Rekombinase sowohl im eWAT als auch im iWAT der untersuchten Tiere (s. Abb. 4.11a+b). In braunem Fettgewebe gestaltete sich die Quantifizierung der Cre-vermittelten Rekombinationseffizienz mit diesem Reporteransatz auf Grund der grünen Autofluoreszenz

des BAT schwieriger. Hier lässt sich auf Grund der Abnahme der roten Fluoreszenz nach Applikation von Tamoxifen dennoch eine partielle Aktivierung der Cre-Rekombinase bestätigen (s. Abb. 4.11c). Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein, in denen nach Tamoxifen-Injektion im WAT eine mehr als 90%-ige und im BAT eine etwa 10%-ige Cre-vermittelte Rekombinationsaktivität beobachtet wurde (Sassmann et al., 2010). Der Nachweis der Cre-Spezifität mittels DNA-PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese ergab eine für Fettgewebe (eWAT, iWAT, BAT) spezifische Rekombination, während alle weiteren untersuchten Gewebe wie beispielsweise Gehirn, Pankreas, Darm oder Muskel keine Gendeletion nach Aktivierung der Cre-Rekombinase mittels Tamoxifen aufwiesen. Die Bestätigung der Adipozyten-Spezifität war von großer Bedeutung um sicherzustellen, dass der ermittelte Phänotyp ausschließlich auf adipozytäre BK-Kanäle und nicht etwa auf BK-Effekte aus anderen Organen und Zelltypen zurück zu führen ist. Insbesondere für neuronale Strukturen (Beisan Mohammed, unveröffentlichte Dissertation, Pharmazeutisches Institut Universität Tübingen, 2014) sowie pankreatische  $\beta$ -Zellen (Dufer et al., 2011) konnte bereits gezeigt werden, dass der BK-Kanal eng mit der Körpergewichtsentwicklung und metabolischen Prozessen wie der Insulinfreisetzung verknüpft ist. Auch die Kontraktilität des Darms unterliegt dem Einfluss neuronaler BK-Kanäle im enterischen Nervensystem, obgleich die gastrointestinale Passagezeit hiervon nicht beeinflusst wurde (unveröffentlichte Diplomarbeit, J. Illison, Pharmazeutisches Institut Universität Tübingen, 2010).

Die Befunde zur Adipozyten-Spezifität konnten auf mRNA und Protein-Ebene mittels qRT-PCR bzw. Immunfluoreszenz-Färbungen bestätigt werden (s. Abb. 4.12). Die bei der qRT-PCR auftretenden BK-Signale in eWAT und iWAT der adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tiere sind vermutlich zum einen auf unspezifische Signale des hochsensitiven Systems (vgl. Suppl. Abb. 5a) als auch auf BK-Kanäle innerhalb der stromavaskulären Fraktion des Fettgewebes sowie die enthaltenen Neuronen zurückzuführen. Dies wird insbesondere bei Betrachtung der Immunfluoreszenz-Färbungen deutlich (s. Abb. 4.12a+d). Während bei adipoBK<sup>L2/+</sup>-Tieren mittels rot fluoreszierender Antikörper eine deutliche Färbung in Einklang mit der Morphologie der jeweiligen Fettzellen auftritt (vgl. Abb. 4.12b+e), konnten bei adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren lediglich sehr kleine Zellen mit rotem Fluoreszenzfarbstoff detektiert werden. Auf Grund der morphologischen Untersuchungen verschiedener weißer Fettgewebe wird deutlich, dass sich die rot markierten Zellen morphologisch deutlich von Fettzellen abheben. Um die genaue Identität der vermeintlichen stromavaskulären Fraktion sicherzustellen müssten jedoch weitere Untersuchungen, wie beispielsweise Fibroblasten-spezifische Co-Färbungen durchgeführt werden.

Zusammengenommen bestätigen der genetisch codierte Cre-Reporter sowie die Untersuchungen zur BK-Kanalexpression in der adipoBK<sup>L2/L1</sup> Mauslinie erstmals die hocheffiziente sowie fettzellspezifische Ausschaltung des BK-Kanals in verschiedenen Fettzelldepots. Dieses Adipozyten-spezifische BK-Kanal Knockout-Modell ermöglichte es, im Zuge dieser Arbeit erstmals, die Rolle des Fettzell-BK-Kanals bei der Entwicklung des Körpergewicht sowie exzessiver Fetteinlagerung und auch metabolischen Veränderungen im Körper zu untersuchen. Auf Grund der Gewebs-Selektivität des adipoBK Mausmodells war eine differenzierte Betrachtung der *in vivo* Funktion des BK-Kanals im Fettgewebe möglich. So konnten adipozytäre BK-Effekte ohne Einfluss durch primäre Veränderungen neuronaler

Regelkreise, beispielsweise des Hunger- oder Sättigungsgefühls, zentral regulierte Komponenten der Energiehomöostase sowie neuronaler Effekte in der Peripherie, beispielsweise durch Veränderungen  $\beta$ -adrenergen Innervierung brauner Fettdepots, untersucht werden. Auch beschriebene Effekte des BK-Kanals in anderen peripheren Organen, wie beispielsweise dem Pankreas (Dufer et al., 2011), konnten in diesem Modell ausgeblendet werden. Die beschriebene Ataxie, sowie der Tremor global BK-defizienter BK-Tiere (Sausbier et al., 2004), welche in einer vermehrten Kontraktion der Muskulatur resultieren und somit die Energiehomöostase positiv beeinflussen konnten durch die adipozytäre Exzision des BK-Kanals ebenfalls umgangen werden.

Unsere Untersuchungen an Adipozyten-spezifischen BK-Kanaldefizienten Tieren (s. Abb. 4.11 + Abb. 4.12) ergaben in der Tat auch hier eine klare Reduktion der Körpergewichtszunahme gegenüber Kontrolltieren (s. Abb. 4.13). Diese ist im Adipozyten-spezifischen Modell (adipoBK<sup>L2/+</sup> 18,58  $\pm$  1,1 g; adipoBK<sup>L2/L1</sup> 13,85  $\pm$  0,99 g;  $\Delta$  ca. 4,7 g) nicht so stark ausgeprägt wie in Mäusen mit globaler BK-Deletion (BK<sup>+/+</sup> 16,44  $\pm$  0,83 g; BK<sup>L1/L1</sup> 8,37  $\pm$  0,56 g;  $\Delta$  ca. 8,1 g). Dennoch lässt sich ein erheblicher Teil (ca. 60%) des schlanken Phänotypes der Tiere über die Ausschaltung des adipozytären BK-Kanals erklären. In globalen BK<sup>L1/L1</sup> Mäusen konnte eine reduzierte Tibialänge gegenüber Wildtyptieren festgestellt werden (s. Suppl. Abb. 2c + Suppl. Abb. 3c), was mit einer reduzierten Gesamtkörpergröße und -masse einhergeht und in Einklang mit früheren Befunden zur Anus-Nasen-Länge der Tiere steht (Sausbier et al., 2004). Außerdem spiegelt sich dieser Befund im reduzierten Startgewicht der Mäuse zu Beginn der Fütterungsversuche (s. Abb. 4.3a+c + Suppl. Abb. 3a), sowie unter Fütterung mit CD und HFD wieder (s. Abb. 4.3a,b,g) und erschwerte hierdurch einen direkten Vergleich der Körpergewichtsentwicklung der Tiere. AdipoBK-Tiere wiesen hingegen keinerlei signifikanten Genotyp-spezifischen Entwicklungsunterschiede, Differenzen der Tibialänge (s. Suppl. Abb. 6b) oder basale Unterschiede hinsichtlich des Körpergewichtes auf (s. Abb. 4.13a, c), was einen direkten Vergleich der Körpergewichtszunahmen und Fetteinlagerung der Kohorten ermöglicht. Da auch der untersuchte tägliche Futterkonsum sowohl zu Beginn, als auch am Ende der Fütterungsversuche keinerlei signifikante Unterschiede zwischen adipoBK<sup>L2/+</sup> und adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren aufwies (s. Abb. 4.14), konnte auch ein Einfluss der zugeführten Nahrungsaufnahme auf die unter HFD-Fütterung beobachtete Reduktion der Körpergewichtszunahme ausgeschlossen werden. Außerdem macht dieser Befund deutlich, dass der adipozytäre BK-Kanal keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat, wohingegen in globalen BK-KO Tieren tendenziell leicht verringerte absolute und auf das metabolische Gewicht bezogene Futteraufnahmen detektiert werden konnten (unveröff. Dissertation, Beisan Mohammad, Pharmazeutisches Institut Universität Tübingen und A. Schürmann, Deutsches Zentrum für Diabetesforschung, Potsdam-Rehbrücke). Auch weitere Kaliumkanäle sind mit der Regulation der Nahrungsaufnahme assoziiert. So konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung der Kir6.2 Untereinheit des K<sub>ATP</sub>-Kanals die orektische Wirkung von Ghrelin in vagalen Ganglien unterbinden kann (Grabauskas et al., 2015). Adipozytär sezerniertes Leptin kann darüber hinaus K<sub>ATP</sub>-Kanäle in hypothalamischen Regionen modulieren und hat somit direkte Auswirkungen auf Hunger- und Sättigungsgefühl in Ratten (Spanswick et al., 1997). Im Gegensatz dazu scheint der adipozytäre BK-Kanal keine orexigenen oder anorexigene Effekte auf den Organismus auszuüben.

Die beobachteten Effekte hinsichtlich der Körpergewichtsentwicklung der adipoBK-Tiere scheinen ausschließlich auf periphere BK-abhängige Effekte bezüglich der Energieverwertung und/oder dem Metabolismus zurückzuführen zu sein und keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme der Tiere zu haben. Da adipoBK-Tiere des Weiteren, im Gegensatz zu BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen, keine cerebelläre Ataxie oder damit assoziiertes Muskelzittern und Tremor aufwiesen (Sausbier et al., 2004), konnten auch diese zentral vermittelten BK-Effekte, welche für einen nicht unwesentlichen Energieverbrauch verantwortlich sein könnten, als Ursache des schlanken Phänotypes der adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tiere ausgeschlossen werden. Stattdessen legen die bisherigen Befunde den Schluss nahe, dass sowohl im Tiermodell, als auch beim Menschen (Jiao et al., 2011) ein kausaler Zusammenhang zwischen adipozytären BK-Kanälen und der Entwicklung des Körpergewichtes besteht. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass bei den Probanden der GWAS-Studie auch Veränderungen der zentralen BK-Kanal-Expression nicht ausgeschlossen werden können, da im Zuge der von Jiao et al. beschriebenen Untersuchungen lediglich das Fettgewebe der Individuen, nicht jedoch Biopsien weiterer Gewebe analysiert wurden. Im Mausmodell hingegen konnte im Zuge dieser Arbeit sowohl die hohe Effizienz der adipoCre-Rekombinase (s. Abb. 4.11a-c) als auch die Adipozyten-Spezifität dieses Rekombinationssystems nachgewiesen werden (s. Abb. 4.11d), so dass ein Einfluss von BK-Kanälen in Muskeln, Pankreas, Duodenum oder Neuronen in verschiedenen Regionen des Gehirns sowie der Peripherie (wie beispielsweise des enterischen Nervensystems) bei adipoBK-Tieren ausgeschlossen werden konnte. Wie Fütterungsversuche mit Kontrolldiät zeigen konnten, scheint der BK-Kanal keinen direkten Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichtes bei physiologisch ausgewogener Nahrungsaufnahme zu haben (s. Abb. 4.13a+b). Im Gegensatz dazu scheint er jedoch sehr wohl an der Entstehung von exzessiver Gewichtszunahme und Fetteinlagerung unter hochkalorischen Bedingungen beteiligt zu sein (s. Abb. 4.13c+d). Dies steht wiederum in Einklang mit den Befunden der Arbeitsgruppe um Hong Jiao, die keinen direkten Zusammenhang zwischen dem KCNMA1-SNP rs2118630 und dem BMI der Probanden feststellen konnten und stattdessen zu dem Schluss kamen, dass der BK-Kanal lediglich für die extrem ausgeprägte Fetteinlagerungen bei Adipositas, nicht jedoch für moderate Anstiege der Körperfettmasse verantwortlich ist (Jiao et al., 2011). Ähnliche Befunde konnten außerdem für K<sub>v</sub>1.3-defiziente Tiere ermittelt werden, welche ähnlich wie BK-KO Mäuse ein deutlich reduziertes Körpergewicht unter normalem Chow-Futter aufweisen und darüber hinaus ebenfalls vor HFD-induzierter Adipositas geschützt sind (Xu et al., 2003c; Fadool et al., 2011). Der Phänotyp dieses Tiermodelles scheint jedoch in vollem Umfang auf K<sub>v</sub>1.3-Kanäle im olfaktorischen Bulb zurück zu führen zu sein, wie erst jüngst eine Arbeit zur olfaktorische Bulbektomie an K<sub>v</sub>1.3<sup>-/-</sup> und Wildtyptieren aufzeigen konnte (Tucker et al., 2012).

Über präventive Erfolge hinaus konnte im Zuge dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass die genetische Deletion des adipozytären BK-Kanals zur Gewichtsreduktion bei bereits bestehender Adipositas beiträgt (s. Abb. 4.16a+b). Während das Körpergewicht der adipoBK<sup>L2/+</sup>-Kohorte auch bei später Deletion des BK-Kanals weitestgehend unbeeinflusst blieb, führte die Exzision des Kanals in adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren in den ersten zwei Wochen nach Tamoxifen-Injektion sogar zu einer Abnahme des Körpergewichtes und im weiteren Verlauf zu einer deutlich reduzierten Körpergewichtszunahme ( $t_{20-30}$  adipoBK<sup>L2/+</sup> 7,40 ± 1,03 g und

adipoBK<sup>L2/L1</sup>  $5,33 \pm 0,56$  g;  $p = 0,06$ ). Die im Gegensatz zur Präventionskohorte nicht durchweg signifikanten Unterschiede zwischen den beiden adipoBK-Genotypen sind möglicherweise auf interindividuelle Schwankungen der Körpergewichte innerhalb der adipoBK<sup>L2/+</sup>-Gruppen zurück zu führen. Dies wird bei Berücksichtigung des Endgewichtes der Kohorten im Alter von 30 Wochen deutlich. Hier präsentieren sich adipoBK<sup>L2/+</sup>-Tiere mit früher Tamoxifen-Applikation mit einem Körpergewicht von  $42,30 \pm 1,16$  g, wohingegen die Kontrolltiere der späten Cre-Rekombinase-Aktivierung lediglich ein Gewicht von  $41,09 \pm 1,90$  g aufweisen. Zwischen den adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Kohorten mit präventiver, früher BK-Deletion und therapeutischer, später Gen-Exzision, ist hingegen kein Unterschied zu verzeichnen (frühe Deletion  $37,74 \pm 1,12$  g;  $t_{20}$   $37,68 \pm 1,12$  g). Während das verringerte Körpergewicht in globalen BK<sup>L1/L1</sup> Tieren nicht ausschließlich auf die veränderten Fettmassen sondern, möglicherweise auch durch die Größenunterschiede bedingt, auf verringerte Trocken- und Wasseranteile der Tiere zurück zu führen waren (s. Abb. 4.3f) ist sowohl hinsichtlich des Wasseranteils als auch mit Blick auf den Trockenanteil der Tiere kein Unterschied zwischen adipoBK<sup>L2/L1</sup> und adipoBK<sup>L2/+</sup> Mäusen zu erkennen. Dementsprechend scheint der HFD-bedingte Anstieg des Körpergewichtes in adipoBK<sup>L2/+</sup> Tieren, verglichen mit Tieren auf CD, einzig und allein auf einen Anstieg der Körperfettmasse zurück zu führen zu sein (s. Abb. 4.15b). Dies spiegelt sich auch in der Analyse verschiedener Fettdepots (s. Abb. 4.15a), sowie makroskopisch erkennbar an der Größe ausgewählter Fettgewebe wieder (s. Abb. 4.15c-e). Da die Fettmasse sowohl durch die Anzahl an Adipozyten als auch deren Größe beeinflusst wird und insbesondere die Hypertrophie von Fettzellen mit einem Anstieg pro-inflammatorischer Parameter und Insulinresistenz assoziiert ist (Vozarova et al., 2001; Trujillo et al., 2004; Klover et al., 2005; Fontana et al., 2007; Eder et al., 2009), wurden im Rahmen dieser Dissertation verschiedene Fettgewebe auch auf zellulärer Ebene untersucht. Eine auf die Tibialänge normierte Analyse der Fettzellgröße in adipoBK-Tieren nach HFD-Fütterung ergab eine deutliche Hyperplasie von iWAT-Zellen in adipoBK<sup>L2/L1</sup> sowohl nach CD als auch nach HFD-Fütterung (s. Abb. 4.18a-c). Dies steht wiederum in Einklang mit den im globalen BK Mausmodell erhobenen Befunden. In diesen Tieren war ebenfalls eine reduzierte Fettzellgrößen im eWAT aus BK<sup>L1/L1</sup> gegenüber Wildtyptieren nach HFD erkennbar (Daten nicht gezeigt). In iWAT-Prädipozyten Kulturen konnte im Gegensatz zu eWAT-Kulturen jedoch kein Unterschied im Gesamt-Ölrot-Gehalt festgestellt werden, dennoch gab es morphologische Hinweise auf Unterschiede in der Fettzellgröße und dem Ausmaß der eingelagerten Fettvakuolen, wie bereits beschreiben. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen der eWAT-Zellkulturexperimente (s. Abb. 4.7a-e). Zusammengefasst unterstützen sie die Hypothese, dass der Mangel an BK-Kanal möglicherweise eine hypertrophe Expansion von Fettgewebe verhindert und stattdessen, beispielweise über vermehrte Proliferation von Prädipozyten, die Vermehrung metabolisch gesunder kleinzelliger Fettzellen im Zuge einer Hyperplasie fördert. Die Bestimmung des Ölrot-Gehaltes als Maß für die Triglycerid-Einlagerung der ausgereiften Fettzellen stellt in diesem Zusammenhang möglicherweise keine optimale Methode für diese Art der Fettzellanalyse dar, da lediglich eine Aussage über die gesamte Menge an eingelagerten Triglyceriden, nicht jedoch über die Größe und Qualität der Fettzellen gemacht werden kann. Statt dessen sollte über die Ölrot-Quantifizierung hinaus auch die Anzahl der reifen Fettzellen und/oder deren Größe analysiert werden um aufzuklären, ob die Deletion des

BK-Kanals tatsächlich auch *in vitro* mit der Expansion kleiner, gesunder Fettzellen in iWAT von adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren assoziiert ist. Gestützt wird diese Hypothese des Weiteren durch Ergebnisse der Untersuchungen zur IL-6 Expression in iWAT nach HFD-Fütterung. Diese zeigen auf, dass die verringerte Fettzellgröße der adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tiere *in vivo* auch mit signifikant erniedrigten IL-6 mRNA-Leveln assoziiert ist (s. Abb. 4.18d). Neben lokalen IL-6 Differenzen ergaben Serum-Untersuchungen auch global tendenziell erniedrigte Spiegel des pro-inflammatorischen Proteins (P = 0,11) in BK-Kanal-defizienten Tieren gegenüber Kontrollen, welche verglichen mit der IL-6-Konzentration nach CD sogar deutlich und signifikant erhöht waren (s. Abb. 4.17h). Dies lässt darauf schließen, dass die lokal erhöhte Expression von IL-6 in iWAT möglicherweise auch systemisch zu (nicht signifikant) erhöhten Interleukin-Serumspiegeln führt. Da dauerhaft erhöhte IL-6-Level Indikator für chronisch entzündliche Prozesse sind, welche wiederum direkt den Metabolismus, insbesondere die Insulinsensitivität beeinflussen können (Pickup et al., 1997; Pradhan et al., 2001; Vozarova et al., 2001; Klover et al., 2005), wurden im Zuge dieser Arbeit auch metabolische Prozesse wie Insulinfreisetzung und Glucose-Toleranz näher untersucht.

## **5.2 Schutz vor metabolischen und inflammatorischen Veränderungen durch adipozytäre BK-Kanal-Deletion**

Wie am hiesigen Institut bereits gezeigt werden konnte, scheint der BK-Kanal auch in die Glucose Homöostase und die  $\beta$ -Zell-Viabilität involviert zu sein (Dufer et al., 2011). Wie Düfer et al. zeigen konnten, hat die globale Deletion des BK-Kanals in Mäusen mit genetischem Hybrid-Hintergrund (C57Bl6/SV129) keinen Einfluss auf die Nüchtern-BG-Konzentration, resultiert jedoch in einer signifikant verschlechterten Glucosetoleranz der Tiere. Die basale Glucose-induzierte Insulin-Freisetzung durch Glucose-Konzentrationen von weniger als 10 mMol/l *in vitro* ergab keinerlei Unterschiede zwischen isolierten Pankreaszellen der verschiedenen BK-Genotypen. Bei höheren Glucosekonzentrationen (10-30 mMol/l) war die Insulinfreisetzung der BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere jedoch signifikant verringert. Da im Insulingehalt der  $\beta$ -Zellen keinerlei Unterschiede zwischen den Genotypen detektiert werden konnten, kamen die Autoren zu dem Schluss, dass der verminderten Glucose-Toleranz der BK<sup>L1/L1</sup>-Mäuse nicht eine verminderte Insulinbildung per se, sondern vielmehr eine Störung in der Insulinfreisetzung zu Grunde liegen muss (Dufer et al., 2011). Auch die mehr als verdoppelte Apoptose-Rate BK-defizienter Pankreaszellen spielt hierbei möglicherweise eine zentrale Rolle und weist darauf hin, dass der BK-Kanal nicht nur die elektrophysiologische Steuerung der  $\beta$ -Zellfunktion beeinflusst, sondern auch an Signalkaskaden zur Regulation des apoptotischen Zelltodes der Inselzellen beteiligt ist (Dufer et al., 2011). Unsere aktuellen Untersuchungen konnten die vorbenannten Befunde auch in BK-defizienten Tieren auf C57Bl6-Hintergrund verifizieren. Während nüchtern (vor Applikation des Glucose-Bolus) keine Unterschiede in der Blutglucose-Konzentration zu verzeichnen waren, zeigte sich sowohl im Alter von 10 Wochen, vor diätetischer Fütterung, als auch nach 18-wöchiger CD in BK<sup>L1/L1</sup>-Mäuse schwere Defizite im Glucose-Metabolismus (s. Abb. 4.1a+b). Die hierbei beobachtete signifikant reduzierte Insulinfreisetzung der BK-Mutanten lässt ebenfalls eine Störung der Insulinfreisetzung vermuten (s. Abb. 4.4d). Dass es sich hierbei in der Tat um eine aus der  $\beta$ -Zell-spezifischen Ablation des BK-Kanals resultierende Störung handelt, wird bei Betrachtung der adipoBK

Mauslinie deutlich. Im Gegensatz zum globalen Modell sind im Alter von 10 Wochen zwischen  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  und den entsprechenden Kontrollen zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der Blutglucose-Konzentration zu verzeichnen (s. Abb. 4.17a) und auch die Insulinfreisetzung scheint von der BK-Deletion in Adipozyten nicht beeinflusst zu werden (s. Abb. 4.17d). Nach 18-wöchiger Kontrolldiät weisen die  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$  Mäuse, trotz ihres gegenüber  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$ -Tieren unveränderten finalen Körpergewichtes, tendenziell erhöhte Blutglucose-Konzentrationen gegenüber den entsprechenden Kontrollen auf, welche 1 Stunde nach Applikation der Glucoselösung das Signifikanzniveau erreichten. Nach 120 min sind die Blutzucker-Werte annähernd wieder auf ein basales Niveau abgesunken, was deutlich macht, dass die  $\text{adipoBK}^{\text{L2/+}}$  und insbesondere  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Tiere im Gegensatz zu  $\text{BK}^{\text{L1/L1}}$ -Mäusen selbst hohe Glucose-Stimuli physiologisch gut verwerten können. Da eine Deletion des BK-Kanals im Pankreas Adipozyten-spezifischer Knockout-Tiere ausgeschlossen wurde (s. Abb. 4.11d), könnte eine mögliche Erklärung hierfür sein, dass die im globalen Mausmodell beobachteten Defekte in der Insulin-Freisetzung aus  $\beta$ -Zellen nicht ausschließlich auf den BK-Kanal der Inselzellen zurück zu führen ist. Beispielsweise kommuniziert das Fettgewebe über sezernierte *Hormone* wie Adiponektin und Omentin (de Souza Batista et al., 2007; Romacho et al., 2013; Knights et al., 2014; Proenca et al., 2014), sowie PEDF und PGRN (Famulla et al., 2011; Li et al., 2014) mit der  $\beta$ -Zelle, ein Mechanismus über den auch die periphere Deletion des BK-Kanals in Adipozyten die Insulin-Freisetzung gewichtsunabhängig modulieren kann. Um hier gesicherte Schlüsse ziehen zu können ist eine Analyse der Insulinspiegel dieser Tiere während des GTT erforderlich. Die parallel durchgeführten Untersuchungen zur Glucose-Toleranz der BK- und  $\text{adipoBK}$ -Tiere nach 18-wöchiger Hochfett-Diät, machen die vom Fütterungszustand und Körpergewicht abhängige Rolle des BK-Kanals auf die Glucose-Homöostase deutlich.  $\text{AdipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Mäuse zeigen nach Applikation des Glucose-Bolus eine signifikant verbesserte Aufnahme der Glucose in Gewebe, was durch die signifikant verringerten Blutglucose-Konzentrationen deutlich wird (s. Abb. 4.17c). Da diese gleichermaßen mit deutlich reduzierten Plasma-Insulin-Konzentrationen einhergehen (s. Abb. 4.17e), kann davon ausgegangen werden, dass die BK-Kanal Deletion in Adipozyten neben einem generellen Schutz vor exzessiver Gewichtszunahme und Fetteinlagerung auch metabolische Prozesse wie die Insulinsensitivität der Tiere verbessert.  $\text{AdipoBK}^{\text{L2/+}}$ -Mäuse sind hingegen trotz deutlich gesteigerter Insulinfreisetzung in Folge des Glucose-Stimulus offensichtlich nicht in der Lage, die entstehenden Blutglucose-Spitzen abzufangen. Aus diesem Grund kann bei den Kontrolltieren im Zusammenhang mit den vorherigen Befunden zu Körpergewicht und Fettmasse vom Vorliegen eines metabolischen Syndroms ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu scheinen  $\text{adipoBK}^{\text{L2/L1}}$ -Tiere neben ihrer verminderten Fett- und Körpergewichtszunahme auch vor der Ausbildung einer solchen Insulinresistenz geschützt zu sein. Interessanterweise ist nach Hochfett-Diät zwischen den globalen  $\text{BK}^{\text{+/+}}$  und  $\text{BK}^{\text{-/-}}$  Mäusen hinsichtlich der Glucose-Toleranz kein Unterschied mehr zu erkennen (s. Abb. 4.4c). Dies resultiert vermutlich aus der Überlagerung der zuvor beschriebenen Befunde zum Körpergewicht und zur Insulinfreisetzung in den entsprechenden Genotypen. Während beispielsweise  $\text{BK}^{\text{+/+}}$ -Tiere im Gegensatz zu ihren KO-Wurfgeschwistern von einer funktionalen Insulin-Freisetzung profitieren, entwickelt sich in den Kontrolltieren nach HFD-Fütterung ein krankhaftes Übergewicht. Die unter diesen Bedingungen beobachtete

übersteigerte Insulin-Freisetzung kann demnach als eine Reaktion der  $\beta$ -Zelle auf die zunehmende Insulinresistenz verstanden werden. Da sich die HFD-gefütterten BK<sup>+/+</sup>-Tiere nach der 18-wöchigen Überernährung mit einer generell schlechteren Glucose-Toleranz präsentieren, ist der physiologisch sinnvolle Kompensationsmechanismus bereits insuffizient. Die Insulinüberproduktion scheint aber noch auszureichen, um die negativen Körper- und Fettgewichtseffekte auf den Blutzucker-Spiegel auszugleichen. Letztlich schneiden BK<sup>+/+</sup>-Tiere und die schlankeren BK-defizienten Mäuse im GTT gleich ab, was sicherlich auch durch die Ablation des BK-Kanals in den  $\beta$ -Zellen der globalen BK-Mausmutanten begünstigt wird. Eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Glucosetoleranz der adipoBK-Tiere auf CD oder HFD, könnte auch in der Beteiligung des BK-Kanals hinsichtlich der Verstoffwechslung verschiedener Nährstoffe wie Kohlenhydraten, Proteinen oder Fetten begründet liegen. Möglicherweise ist der BK-Kanal vor allem in die Verstoffwechslung von Fetten, nicht jedoch die der Kohlenhydrate involviert, was erklären würde, weshalb bei Fett-reicher Diät ausgeprägte Unterschiede im GTT auftreten, während dies unter einer Diät mit geringem Fett- und höherem Kohlenhydratanteil nicht der Fall ist. Um eine potentielle Beteiligung des BK-Kanals an verschiedenen Stoffwechselwegen aufzuklären, wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits kollaborative Metabolom-Untersuchungen in Zusammenarbeit mit der Abteilung für analytische Chemie (Prof. M. Lämmerhofer, Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen) begonnen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stehen derzeit noch aus.

Neben metabolischen Eigenschaften wie der Insulinsensitivität und der Glucosetoleranz stellen auch entzündliche Prozesse Prädiktionsparameter für die metabolische Gesundheit sowie potentielle Veränderungen derselben dar. Interleukin 6 wird neben seiner Generierung als Myokinin auch von Fettzellen gebildet und steht als lokal pro-inflammatorisches Zytokin in direktem Zusammenhang mit Insulinresistenz und Adipositas-assoziierten inflammatorischen Prozessen (Nishimura et al., 2009a; Nishimura et al., 2009b). Global erhöhte IL-6-Spiegel führen im Gegensatz dazu zu einer gesteigerten Glucagon-Freisetzung, was im Zusammenhang mit körperlicher Betätigung eine positive Wirkung auf die Entwicklung des Körpergewichtes sowie der Prävention einer Fettleber (NAFLD) zu haben scheint (Matthews et al., 2010b; Ma et al., 2015). Das pro-inflammatorische Signalmolekül IL-6 hat dementsprechend weitreichenden Einfluss auf die Glucosetoleranz und Insulinsensitivität von Probanden (Klover et al., 2005; Fontana et al., 2007; Matthews et al., 2010b). Inwiefern der BK-Kanal in diesen Prozess involviert ist bedarf in diesem Zusammenhang weiterer mechanistischer Aufklärung. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Befunde sprechen jedoch für einen klaren Zusammenhang zwischen den erhöhten lokalen (und systemischen) Entzündungsmarkern und der BK-vermittelten Insulinresistenz der Tiere. Interessant wäre auch eine Untersuchung der ob/ob BK-Tiere hinsichtlich der lokalen und systemischen Interleukin-Konzentrationen, da bekanntermaßen die genetisch bedingte Adipositas der ob/ob-Mäuse auch mit hohen Plasma-IL-6 Konzentrationen (Harkins et al., 2004; Brun et al., 2007) sowie einem erhöhten IL-6 mRNA-Level in Fettgeweben, nicht jedoch in Leber und Milz, assoziiert ist (Harkins et al., 2004). Der BK-Kanal könnte somit sowohl die genetisch, als auch die Diät-vermittelte Entstehung von Adipositas über IL-6-abhängige Signalwege modulieren. Um einen gesicherten Zusammenhang herstellen zu können, wäre es naheliegend, neben der lokalen Deletion des BK-Kanals auch IL-6 durch geeignete genetische Variation oder mit Hilfe

gezielter Antikörper zu inaktivieren und somit die Folgen eines IL-6 Defizites im Zusammenhang mit dem Fehlen des BK-Kanals auf die Insulinsensitivität untersuchen zu können. Allerdings ist der globale Knockout von IL-6 im Tiermodell mit der Entstehung von Adipositas, systemischer Insulinresistenz und massiven Entzündungsreaktionen assoziiert (Wallenius et al., 2002; Matthews et al., 2010b). Dies steht in Einklang mit Befunden, welche neben den pro-inflammatorischen Wirkungen von IL-6 auch dessen anti-inflammatorische Effekte über anti-entzündliche Signalmoleküle wie IL-10, IL-1 und IL-1ra beschreiben (Tilg et al., 1994; Starkie et al., 2003; Ma et al., 2015). Auch im Zusammenhang mit Adipositas scheint IL-6 in Muskeln, im Gegensatz zu seiner Funktion in Fettgeweben, die Insulinsensitivität zu verbessern. Die Steigerung der IL-6 Sekretion des Skelettmuskels durch körperliche Betätigung und Training führte dementsprechend zu einem mehr als 100-fachen Anstieg der IL-6 Level und resultierte in einer deutlich verbesserten Insulin-Sensitivität (Ostrowski et al., 2000; Helge et al., 2003). Darüber hinaus konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass die Überexpression von IL-6 im Tiermodell HFD-induzierte Gewichtszunahmen und Lebersteatosen aufheben konnte (Ma et al., 2015). Die Effekte von IL-6 hinsichtlich des Metabolismus scheinen dementsprechend sehr vielfältig und stark vom jeweiligen Gewebe abhängig zu sein, was in diesem Zusammenhang möglicherweise eine Gewebe-spezifische IL-6 Deletion erfordert.

Neben IL-6 wird auch Adiponektin (APN) eine wichtige Funktion hinsichtlich der Insulinsensitivität zugeschrieben. APN ist ein Peptidhormon, welches in den Glucose-Stoffwechsel und den Abbau von Fettsäuren involviert ist. Es wird von Adipozyten in Abhängigkeit von deren Füllungszustand ausgeschüttet. Weisen Fettzellen einen geringen Lipidgehalt auf, wird die Adiponektin-Freisetzung, ebenso wie während kalorischer Restriktion, gesteigert. Bei adipösen Personen können oftmals verringerte Adiponektin-Level nachgewiesen werden. Auf Grund der daraus resultierenden schlechten Verwertung von Zucker und Fett kann dies zu Diabetes mellitus Typ II und damit assoziierten Nerven- und Gefäßschädigungen (Diez and Iglesias, 2003) sowie zu NAFLD (Renaldi et al., 2009) und Artherosklerose (Diez and Iglesias, 2003) führen. Erhöhte Level des Adipokins sind in der Regel mit einer verbesserten Insulinsensitivität assoziiert, wohingegen die meist im Zusammenhang mit Adipositas auftretenden reduzierten APN-Konzentrationen mit Diabetes mellitus Typ 2 und Insulinresistenz in Zusammenhang zu stehen scheinen (Hotta et al., 2001; Weyer et al., 2001; Yang et al., 2001; Nedvidkova et al., 2005). Dennoch ergaben die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Serum-Adiponektin-Konzentrationen weder unter CD noch unter HFD signifikante Unterschiede zwischen den adipoBK-Genotypen (s. Abb. 4.17f). Auch eine Reduktion der APN-Serum-Level in Folge massiver Zunahme des Körpergewichtes und der Fettmassen konnten im Gegensatz zu Befunden in der Literatur nicht beobachtet werden (s. Abb. 4.17f). Die hohen Varianzen der APN-Level sind möglicherweise darauf zurück zu führen, dass die Serumentnahme der Tiere versuchsbedingt nicht nüchtern, sondern vom Fütterungszustand unabhängig erfolgen musste. Dementsprechend wäre möglicherweise eine Wiederholung des Versuches unter nüchternen Umständen der Tiere sinnvoll.

Neben APN steht mit Leptin ein weiteres Adipokin in engem Zusammenhang mit metabolischen Prozessen und spielt insbesondere im Fettstoffwechsel und der Regulation der

Energiehomöostase eine wichtige Rolle. Bei Leptin handelt es sich ebenfalls um ein Hormon, welches von Adipozyten sezerniert wird und durch seine duale Wirkung auf den Hypothalamus eine zentrale Rolle bei der Regulation des Hungergefühls spielt (s. Kapitel 3.2.2). In adipösen Individuen ist oftmals eine Leptin-Resistenz infolge dauerhaft erhöhter Leptin-Spiegel im Blut zu beobachten. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Applikation von Adiponektin und Leptin in der Lage war, eine bestehende Insulinresistenz gänzlich aufzuheben (Yamauchi et al., 2001). Das Hormon scheint vor allem anti-adipöse Effekte zu haben, da die genetische Deletion von Leptin, wie in ob/ob Tieren, bekannter Weise zu massiver Adipositas, Insulinresistenz, Hyperphagie und einer Vielzahl an assoziierten Störungen des Metabolismus führt (Igel et al., 1997; Howard et al., 1999; Igel et al., 2002; Priestman et al., 2008). Es dient außerdem als eine Art Fettmassen-Detektor und kann auf Grund seines negativen Feedback-Mechanismus über hypothalamische Bahnen das Sättigungsgefühl aktivieren (Friedman, 2014). So ist in schlanken Personen die Menge an zirkulierendem Leptin meist gering, wohingegen adipöse Individuen hohe Leptin-Spiegel aufweisen (Mendoza-Nunez et al., 2002). Diese positive Korrelation von Leptin und Körpergewicht konnte im Zuge dieser Arbeit auch in adipoBK<sup>L2/+</sup>-Tieren beobachtet werden, welche nach HFD Fütterung deutlich gesteigerte und gegenüber adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren signifikant erhöhte Leptin-Level aufwiesen (s. Abb. 4.17g). Dass jedoch auch erhöhte Leptin-Level in adipösen Individuen nicht in der Lage sind, das Körpergewicht zu reduzieren ist auf die Entstehung von Leptin-Resistenzen in Folge dauerhaft erhöhter Serum-Spiegel zurück zu führen (Balland and Cowley, 2015). Diese ist sowohl einer Reduktion des Leptin-Transportes ins Gehirn als auch einer verminderten Antwort neuronaler Strukturen auf Leptin geschuldet (Balland and Cowley, 2015). Nichtsdestotrotz ist die akute, kurzfristige Applikation von Leptin in ob/ob Tieren durchaus in der Lage einer bestehenden Hyperphagie wie auch dem erhöhten Körpergewicht der Tiere entgegenzuwirken (Campfield et al., 1995; Maffei et al., 1995).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der BK-Kanal essentiell für eine Reihe physiologischer Prozesse im Zusammenhang mit Adipositas und Diabetes ist, was unter anderem im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Neben Einflüssen auf die Fettzellproliferation und -reifung scheint er wie beschrieben auch direkt in die Insulinfreisetzung und Glucose-Homöostase involviert zu sein. Doch auch in weiteren metabolisch wichtigen Geweben wie der Leber, konnten im Rahmen dieser Dissertation BK-Effekte festgestellt werden.

Im Zuge der weitreichenden phänotypischen Untersuchungen der BK-Kanal-defizienten Tiere konnten auch Unterschiede im Lebergewicht von BK<sup>+/+</sup>- und BK<sup>L1/L1</sup>-Mäusen beobachtet werden. Bereits im Alter von 10 Wochen war das, auf die Tibialänge normierte, Lebergewicht der BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere gegenüber den entsprechenden Kontrollen signifikant reduziert, ein Effekt welcher mit steigendem Körpergewicht der Kontrolltiere nach CD- und insbesondere HFD-Fütterung noch wesentlich stärker ausgeprägt war (s. Abb. 4.5c). Diese Zunahme der relativen Lebermasse ging mit einer massiven Fetteinlagerung in hepatisches Gewebe von Kontrolltieren einher, was mittels Ölrot-Färbung visualisiert werden konnte (s. Abb. 4.5a+b). Während Knockout-Tiere auch unter HFD-Fütterung nahezu vollständig vor dieser hepatischen Fetteinlagerung geschützt waren, zeigten Kontrolltiere massive Veränderung der morphologischen Strukturen und Exzessive Fettakkumulationen. In Kooperation mit der

Arbeitsgruppe von Prof. Simon am Institut für Pharmakologie der Universität Bern, konnte außerdem eine deutliche Reduktion von Autophagie-Markern, insbesondere des LC3-II/LC3-I Verhältnisses in BK-defizienten Tieren beobachten werden (s. Abb. 4.5d). Ursache für die Abnahme der Autophagie ist vermutlich die verminderte hepatische Fetteinlagerung in den BK<sup>L1/L1</sup> Mäusen. In adipoBK-Mäusen waren im Alter von 10 Wochen sowie nach CD-Fütterung keine Unterschiede hinsichtlich der relativen Lebermasse zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigten die globalen BK-WT Mäuse bereits unter CD-gefütterten eine vermehrte hepatische Triglycerid-Einlagerung, verglichen mit ihren KO-Wurfgeschwistern. In Folge der HFD-Fütterung kam es in adipoBK<sup>L2/+</sup>, wie auch in globalen BK-WT Tieren, zu einem deutlichen Anstieg des relativen Lebergewichtes sowie einer massiven Fetteinlagerungen in das hepatische Gewebe (s. Abb. 4.19a-c). Diese Befunde legen nahe, dass die globale oder Adipozyten-spezifische Deletion des BK-Kanals vor der Entstehung einer Nicht-Alkohol-induzierten Fettleber (NAFLD) durch exzessive Fetteinlagerung ins hepatische Gewebe und somit einer weiteren schwerwiegenden Folgeerkrankung von Adipositas schützt.

### **5.3 Hinweise auf vermehrtes Browning und zitterfreie Thermogenese in adipoBK-defizienten Tieren**

Ein Ungleichgewicht des fein justierten Systems aus Energiezufuhr und Energieverbrauch kann grundlegend als Ursache der Entstehung von Adipositas angesehen werden. Somit spielt nicht nur eine erhöhte Aufnahme an Energie in Form von Nahrung sondern auch der oftmals deutlich verringerte Verbrauch an Energie in Folge zu wenig körperlicher Betätigung eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Pathogenese der Volkskrankheit. So sind in den letzten Jahren neben den klassischen Therapieoptionen wie ausgewogener und gesunder Ernährung, der Restriktion von Nahrungszufuhr und Nahrungsverwertung sowie einem ausreichenden Maß an Sport und körperlicher Betätigung auch die Steigerung weiterer, Energie-verbrauchender Mechanismen im Körper als potentielle Therapie- und Präventionsoptionen immer mehr in den Fokus der Forschung getreten ist. Neben der körperlichen, muskulären Aktivität und der Energiebereitstellung durch Mitochondrien in Form von ATP ist die zitterfreie Thermogenese, welche in braunen und beigen Fettzellen zur Generierung von Wärme ohne Muskelkraft befähigt ist, ein wichtiger Energieverbrauchender Prozess. Er kann in erwachsenen Menschen einen Energieumsatz bedingen, welcher der Energie von bis zu 4 kg reinem Fett pro Jahr entspricht (Virtanen et al., 2009). Erst in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass entgegen aller bisherigen Annahmen braunes Fettgewebe nicht nur in Säuglingen und adulten Mäusen vorkommt, sondern auch in erwachsenen menschlichen Individuen vorhanden ist (Nedergaard et al., 2007; Cypess et al., 2009; Saito et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009) und somit massiv in die Regulation des energetischen Gleichgewichtes eingreifen kann (Cypess et al., 2009; Saito et al., 2009; Virtanen et al., 2009). Neuere Untersuchungen legen in diesem Zusammenhang nahe, dass es sich bei diesen, vor allem in tieferen Gewebsschichten vorkommenden, metabolisch aktiven Fettdepots jedoch eher um einen induzierbaren, beigen Intermediärtyp handelt (Wu et al., 2012; Wu et al., 2013). *Browning*, sowie die Aktivierung braunen Fettgewebes, werden physiologisch in erster Linie durch Kälteexposition ausgelöst, indem möglicherweise Kälte-sensitive TRPM8-Kanäle aktiviert werden und im Folgenden die Ucp1-abhängige Thermogenese triggern (Ma et al.,

2012). Doch auch cyclische Nukleotide wie cAMP und cGMP können *Browning*-Prozesse mediieren (Zhang et al., 2010b; Mitschke et al., 2013; Pfeifer and Hoffmann, 2014) (s. Kapitel 1.4.4). Die cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP spielen bekanntermaßen unter anderem eine wichtige Rolle beim Browning weißer Fettzellen, wie auch bei lipolytischen Prozessen (Carmen and Victor, 2006; Bordicchia et al., 2012; Pfeifer and Hoffmann, 2014) und stehen somit in engem Zusammenhang mit der Regulation der Körpertemperatur, sowie den damit verbundenen Auswirkungen auf die Energiebalance und das Körpergewicht. Interessanterweise wird auch die Leitfähigkeit des BK-Kanals über eine cAMP- und cGMP-abhängige *Phosphorylierung* des BK-Kanal C-Terminus reguliert (Zhou et al., 2001; Zhou et al., 2010).

Untersuchungen der Rektaltemperatur von BK<sup>+/+</sup> und BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren im Alter von 30 Wochen nach HFD-Fütterung ergaben eine signifikant erhöhte Körpertemperatur der weiblichen BK-defizienten Tiere (BK<sup>+/+</sup> = 35,4 ± 0,1 °C, BK<sup>L1/L1</sup> = 35,9 ± 0,1 °C), sowie tendenziell höhere Rektaltemperaturen in männlichen Tieren, welche jedoch keine Signifikanz aufwies (BK<sup>+/+</sup> = 35,1 ± 0,1 °C, BK<sup>L1/L1</sup> = 35,4 ± 0,2 °C) (nicht publizierte Daten von Prof. Schürmann, Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke). Die lokomotorische Aktivität der beiden globalen BK-Genotypen wies bei männlichen Tieren keine Unterschiede auf, bei weiblichen BK-defizienten Tieren konnte sogar eine tendenziell leicht reduzierte Aktivität gegenüber den entsprechenden Kontrollen verzeichnet werden (nicht publizierte Daten von Prof. Schürmann). Dementsprechend konnte eine vermehrte körperliche Aktivität als Ursache der erhöhten Körpertemperatur in global BK-defizienten Tieren ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu könnte jedoch eine vermehrte zitterfreie Thermogenese für die erhöhte Körpertemperatur der Tiere verantwortlich sein. In Einklang mit dieser Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Ucp1-Expression, welche als Maß für vorliegendes *Browning* angesehen werden kann, in global BK-defizienten Tieren annähernd 5-fach stärker ausgeprägt ist als in den entsprechenden Kontrollen (s. Abb. 4.6c+d). Morphologische Untersuchungen und die indirekte Bestimmung der Fettzellgröße durch Quantifizierung der Zellkerne pro Fläche, welche in Zusammenarbeit mit Tanja Burke im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt wurden, ergaben darüber hinaus, dass auch braunes Fettgewebe selbst durch die Deletion des BK-Kanals vor einer übermäßigen Hypertrophie und somit potentiell auch vor einer Abnahme der BAT-Funktion geschützt zu sein scheint (s. Abb. 4.6a+b). Möglicherweise geht die Hypertrophie in braunen Fettzellen ebenso wie in weißen Adipozyten (Pouliot et al., 1992; Feng et al., 2013; Pellegrinelli et al., 2016) mit pathologischen Veränderungen wie beispielsweise einem Funktionsverlust hinsichtlich der thermogenetischen Aktivität einher. Bereits nachgewiesen werden konnte ein direkter negativer Zusammenhang von BMI und der BAT-Menge (van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Enerback, 2010). Um eine mögliche Reduktion der BAT-Aktivität in diesem Zusammenhang zu verifizieren, müssten jedoch weitere, funktionale Untersuchungen zur BAT-Aktivität in diesen Tieren, beispielsweise in Form von FDG-PET-Scans durchgeführt werden. Dennoch unterstützen auch die Befunde aus verschiedenen Zellkulturexperimenten *in vitro* die These einer Beteiligung des BK-Kanals sowohl am Prozess des *Brownings* als auch bei der Aktivierung von BAT. Während in iWAT-Kulturen unter normalen Stimulationsbedingungen keine signifikanten Unterschiede zwischen BK<sup>+/+</sup> und BK<sup>L1/L1</sup>-Zellen detektiert werden konnten (s. Abb. 4.8a-c), ergab die

Supplementierung der Zellkulturansätze mit cGMP eine signifikante Zunahme an reifen Fettzellen, was durch den Anstieg an ORO-Inkorporation detektiert werden konnte (s. Suppl. Abb. 5e-g). Während auch hier zwischen den Genotypen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des relativen Ölrot-Gehaltes verzeichnet werden konnte ( $p = 0,12$ ) zeigen die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Kulturen (s. Suppl. Abb. 5e+f), ähnlich wie unter basalen Induktionsbedingungen (s. Abb. 4.8a+b), eine deutliche Anreicherung kleiner, multivakuolärer Fettzellen in BK<sup>L1/L1</sup>, verglichen mit Kontrollkulturen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der BK-Kanal in die cGMP-vermittelte Induktion des *Brownings* weißer Fettzelldepots, insbesondere des hierfür besonders prädestinierten iWATs (Seale et al., 2008; Seale et al., 2011) involviert zu sein scheint. Obwohl *in vitro* im eWAT keine Unterschiede hinsichtlich der basalen Expression klassischer *Browning*-spezifischer Fettzellmarker nachweisbar waren, konnten dennoch Unterschiede in der ADD1-Expression festgestellt werden. Bei ADD1 handelt es sich um ein Protein, welches als Transkriptionsfaktor nachweislich eine wichtige Rolle bei der Differenzierung brauner Fettzellen spielt (s. Suppl. Abb. 5d). Ein vermehrtes *Browning* durch BK-Kanal-Deletion könnte auch eine Erklärung für die in iWAT-Kulturen beobachtete Entstehung tendenziell kleinzelliger Fettzellen sein, da braune Fettzellen eine deutlich kleinere Morphologie aufweisen als weiße Adipozyten (s. Abb. 4.8a). Die Vermehrte Bildung brauner, beziehungsweise beiger Fettzellen im Sinne eines *Brownings* des weißen Fettdepots ginge mit der Entstehung kleiner Fettzellen einher, was wiederum durch eine Analyse von *Browning*-Markern verifiziert werden könnte. Die Analysen der BAT-Kulturen implizieren, dass der BK-Kanal ein wichtiger potentieller Effektor der cAMP- und cGMP-bedingten Effekte auf die Fettzellreifung und Proliferation ist. Dementsprechend führte die pharmakologische Blockade des BK-Kanals durch Paxillin zu einem signifikanten Anstieg der finalen Ölrot-Akkumulation (s. Abb. 4.9b). Diese scheint bei Betrachtung der lichtmikroskopischen Aufnahmen vor allem in einer vermehrten Proliferation oder Reifungsinduktion der Zellen begründet zu sein, da nicht die Größe der reifen Fettzellen sondern vielmehr deren Quantität erhöht zu sein scheint. Die deutliche Zunahme der cAMP- und cGMP-vermittelten braunen Fettzellreifung in Wildtyp-Zellen konnte durch gleichzeitige Gabe von Paxillin nochmals deutlich gesteigert werden, was eine hemmende Komponente des BK-Kanals in diesen, durch cyclische Nukleotide vermittelten, Prozessen nahelegt. Die fehlende Signifikanz der BK-Kanal Effekte in diesem Zusammenhang (cAMP  $p = 0,10$ , cGMP  $p = 0,08$ ) ist möglicherweise darauf zurück zu führen, dass die Kulturgefäße bereits durch Zugabe der cyclischen Nukleotide maximalen Bewuchs aufweisen und die Effekte von Paxillin somit Versuchs-bedingt limitiert sind. Das Ausbringen einer geringeren Zellzahl zu Beginn der Experimente hat jedoch ein massiv verzögertes Anwachsen und stark reduzierte Ausbeute an reifen Fettzellen zur Folge, was eine sinnvolle Analyse mit geringerer Zellzahl äußerst ungünstig gestaltet.

Die BAT-Aktivität unterliegt einer engmaschigen Regulation durch sympathische Innervierung (Tovar et al., 2013). Der BK-Kanal, welcher insbesondere in neuronalen Strukturen eine extrem hohe Expression aufweist (Sausbier et al., 2006), könnte dementsprechend durch eine Expression in erregbaren Geweben in die Regulation von *Browning* und BAT-Aktivierung involviert sein. Dies könnte eine Erklärung für die beschriebenen Effekte der BK-Kanal-Expression bzw. Deletion auf *Browning*, BAT-Reifung und die Auswirkung auf die BAT-

Morphologie *in vivo* verantwortlich sein. Dennoch legen weitere Befunde im Rahmen dieser Arbeit die Vermutung nahe, dass auch die BK-Expression in Fettgeweben selbst einen essentiellen Beitrag an diesen Prozessen zu haben scheint. Die Analyse der Nuclei-Dichte in Gefrierschnitten aus BAT von adipoBK<sup>L2/+</sup> und adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Mäusen nach diätetischer Fütterung ergab bereits unter CD tendenziell kleinere braune adipoBK<sup>L2/L1</sup> Fettzellen bei *in vivo* (s. Abb. 4.20a+b), was wie beschrieben möglicherweise mit einer verbesserten BAT-Funktionalität einhergeht. Unter HFD-Fütterung war dieser Schutz vor einer BAT-Hypertrophie sogar hochsignifikant ausgeprägt (s. Abb. 4.20c+d). Darüber hinaus konnte im iWAT sowohl bei Tieren unter Kontrolldiät als auch unter Hochfett-Diät eine deutlich vermehrte Expression von Ucp1 und somit eine klare Zunahme des *Brownings* durch Deletion des BK-Kanals in Adipozyten gezeigt werden (s. Abb. 4.23). Auch dieser Befund steht im Einklang mit der Literatur, welche eine negative Korrelation der Ucp1-Expression mit der WAT-Größe beschreibt (Akagiri et al., 2008) und über eine ebenfalls negative Korrelation der BAT-Menge mit dem BMI berichtet (van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Enerback, 2010).

Auf Grund all dieser Ucp1-Expressions-Befunde eher unerwartet, ergaben sich für die globalen BK-Tiere weder nach CD- noch nach HFD-Fütterung signifikante Unterschiede hinsichtlich der Körperkerntemperatur im 24-Stunden Profil (s. Suppl. Abb. 4a,b,e,f). Dies steht jedoch im Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchungen an männlichen BK-Tieren, welche von der Arbeitsgruppe um Prof. Schürmann durchgeführt wurden und welche ebenfalls keine signifikanten rektalen Temperaturunterschiede zwischen BK-defizienten Tieren und ihren Wildtypwurfgeschwistern ergaben (Prof. Schürmann, Deutsches Zentrum für Diabetesforschung, Potsdam-Rehbrücke). Durch ein komplexes Ineinandergreifen verschiedener phänotypischer Auswirkungen der BK-Kanal Deletion in allen Geweben kommt es im globalen BK-Modell möglicherweise zu einer Aufhebung von Temperaturregulatorischen Effekten. So ist es möglich, dass einem potentiellen Anstieg der Körpertemperatur in Folge vermehrter Thermogenese des BAT beispielsweise Effekte der neuronalen BK-Deletion entgegen wirken. Darüber hinaus hat vermutlich auch die Deletion neuronaler BK-Kanäle im Hypothalamus (Sausbier et al., 2006), welcher auch das Thermoregulationszentrum beinhaltet, einen Einfluss auf die Regulation der Körpertemperatur. Zwar führt vermutlich auch der durch den Tremor der BK-defizienten Tiere (Sausbier et al., 2004) bedingte Anstieg der Muskelarbeit zu einer erhöhten Körpertemperatur, die globalen BK<sup>L1/L1</sup>-Tiere weisen neben ihrem deutlich reduzierten Körpergewicht jedoch auch einen extrem geringen Körperfettanteil ( $2,73 \pm 0,41$  g nach HFD,  $2,93 \pm 0,71$  g nach CD) auf. Dieser ist auch gegenüber den Gewebe-spezifischen adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren drastisch reduziert ( $11,72 \pm 2,56$  g nach HFD,  $6,21 \pm 0,17$  g nach CD). Dies führt unweigerlich auch zu einem nahezu vollständigen Verlust subkutaner Fettdepots, welche in ihrer Funktion als Isolationsschicht essentiell für die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur sind. Auf diese Weise könnte eine potentiell erhöhte Körpertemperatur von BK<sup>L1/L1</sup>-Tieren möglicherweise durch den ausgeprägten Wärmeverlust in Folge der reduzierten thermischen Isolation maskiert oder kompensiert werden. Dies steht im Einklang mit Befunden aus Kälteexpositions-Versuchen an globalen BK-Tieren, welche im Rahmen einer Masterarbeit in Zusammenarbeit mit Tanja Burke erhoben wurden. Die Versuche zeigten drastische Defizite der BK<sup>L1/L1</sup> Mäuse bei der Aufrechterhaltung physiologischer Körpertemperaturen unter Kälteeinwirkung.

Im Gegensatz zum hochkomplexen Zusammenspiel der BK-Effekte im globalen BK-Mausmodell konnte im Adipozyten-spezifischen Modell konkret die Auswirkung der adipozytären BK-Kanal Deletion auf die Körperkerntemperatur untersucht und beschrieben werden. Zwischen den adipoBK-Genotypen waren weder im Alter von 10 Wochen, noch nach CD-Fütterung Unterschiede hinsichtlich Körpertemperatur oder Aktivität zu verzeichnen (s. Abb. 4.21 + Suppl. Abb. 9). Im Gegensatz hierzu konnte jedoch nach HFD-Gabe eine um 0,3 °C signifikant erhöhte Körpertemperatur in adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren gegenüber den entsprechenden Vergleichskohorten detektiert werden. Da keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Nahrungsaufnahme zwischen den adipoBK-Kohorten zu verzeichnen waren, ist es unwahrscheinlich, dass die Temperaturdifferenzen auf Unterschiede in der Diät-induzierten Thermogenese zurück zu führen sind. Allerdings konnten mittels telemetrischer Untersuchungen auch Einflüsse auf die Aktivität der adipoBK-Tiere detektiert werden (s. Abb. 4.22c+d), welche möglicherweise auch zum Teil für den Anstieg der Körpertemperatur verantwortlich sein könnten. Dennoch legen die weiteren Befunde hinsichtlich Ucp1-Expression und BAT-Morphologie ganz klar auch eine Beteiligung der zitterfreien Thermogenese am Anstieg der Körpertemperatur in adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren nahe.

Um konkretere Aussagen zu mechanistischen Zusammenhängen der (adipozytären) BK-Kanal-Deletion und Veränderungen der BAT-assoziierten Thermogenese machen zu können, wäre neben der Bestimmung der Körperkerntemperatur beispielsweise auch die Messung der BAT-Aktivität eine interessante Methode um aussagekräftige Befunde zum Ausmaß der Thermogenese der verschiedenen Genotypen erheben zu können.

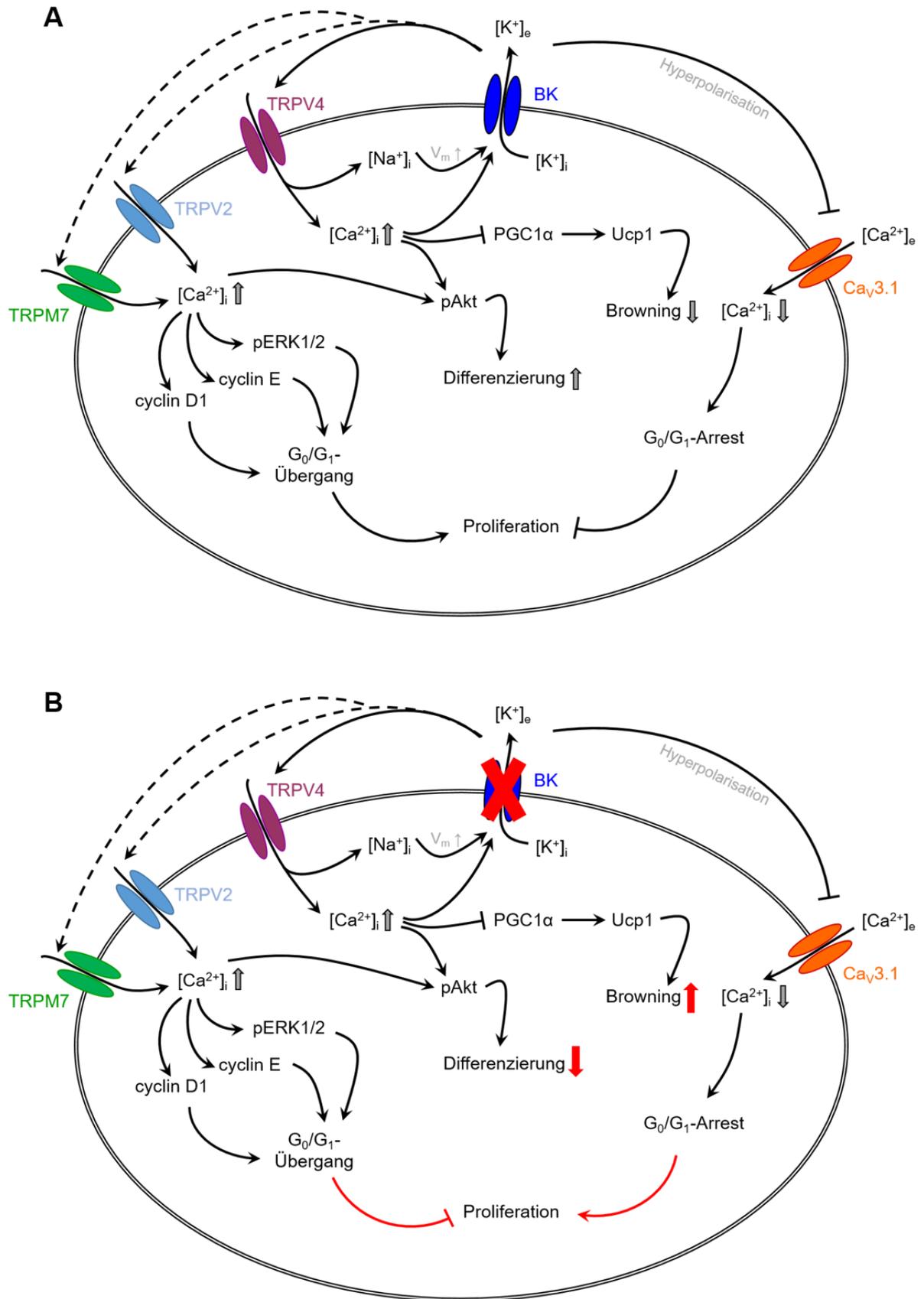
## **5.4 Potentielle Interaktion von BK-Kanälen mit anderen (TRP-) Ionenkanälen als Ursache für Fetteinlagerung und Körpergewichtszunahme**

Zusammenfassend lassen die bisherigen Untersuchungen und Ergebnisse dieser Arbeit darauf schließen, dass der adipozytäre BK-Kanal weitreichende Einflüsse auf physiologische und pathophysiologische Prozesse hinsichtlich der BAT-Reifung, Proliferation und Hypertrophie wie auch der zitterfreien Thermogenese zu haben scheint. Diese Effekte scheinen bereits bei gesunden, nicht übergewichtigen Tieren zum Tragen zu kommen, insbesondere aber auch einen Schutz vor der Entstehung von Adipositas darzustellen. Welche Mechanismen diesen Effekten und Befunden zu Grunde liegen, muss jedoch im Zuge weiterer Untersuchungen noch genauer analysiert und aufgeklärt werden.

Es kann an dieser Stelle jedoch festgehalten werden, dass der BK-Kanal auf Grund seiner Funktion als Kaliumkanal und seinem hieraus resultierenden Einfluss auf das Membranpotential vor allem über die Regulation der Offenwahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Calcium-Kanäle und damit einhergehend, der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$ , Auswirkungen auf eine Vielzahl an physiologischen Prozessen, wie beispielsweise die Calcium-abhängige Insulinfreisetzung hat (Findlay et al., 1985; Wolf et al., 1988; Gribkoff et al., 2001). Doch auch der BK-Kanals selbst unterliegt in seiner Eigenschaft als Spannungs- und vor allem  $Ca^{2+}$ -abhängiger Kanal regulatorischen Effekten durch Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  (Cui et al., 1997; Herrera and Nelson, 2002; Cui et al., 2009).

Der Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  steht in engem Zusammenhang mit der Fettzellreifung und der Entstehung lipid-gefüllter Fettzellen (Shi et al., 2000). Der  $Ca_v3.1$ -Kanal ist beispielsweise in der Lage, die Proliferation von 3T3-L1 Präadipozyten zu regulieren (Oguri et al., 2010), und auch hohe extrazelluläre Calciumspiegel weisen stark attenuierende Effekte auf die Adipogenese von 3T3-L1 Präadipozyten auf (Jensen et al., 2004). Dieser Effekt deckt sich mit den Befunden dieser Arbeit, da die Aktivierung des BK-Kanals auf Grund des resultierenden  $K^+$ -Ausstroms zu einer Hyperpolarisation führt, welche wiederum die Offenwahrscheinlichkeit von  $Ca_v3.1$ -Kanälen reduziert. In Folge dessen sinkt die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration, was einen G0/G1-Arrest und somit eine Blockade der Präadipozyten-Proliferation zur Folge hat (Oguri et al., 2010). Durch Deletion oder pharmakologische Blockade der BK-Kanäle würde es somit zur vermehrten Proliferation der Fettvorläuferzellen kommen, was in Einklang mit den Befunden dieser Arbeit steht (s. Abb. 4.7a-e). Ein starker Anstieg intrazellulärer Calciumkonzentrationen konnte darüber hinaus sowohl in humanen Präadipozyten als auch in 3T3-L1-Zellen mit einer potenten Inhibition der Fettzellreifung in Zusammenhang gebracht werden (Miller et al., 1996; Ntambi and Takova, 1996; Shi et al., 2000), ein Prozess der möglicherweise über Calcineurin vermittelt wird (Neal and Clipstone, 2002).

Die Expression von BK-Kanälen in 3T3-L1-Präadipozyten (Zhang et al., 2012) sowie humanen Fettvorläuferzellen (Hu et al., 2009) konnte, ebenso wie dessen zentrale Rolle bei der Zellzyklusprogression bereits gezeigt werden (Zhang et al., 2012). Darüber hinaus legen die Befunde dieser Arbeit auch eine Beteiligung der BK-Kanäle am Wachstum muriner Fettzellen nahe. Wie bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden konnte, besteht ein enges Zusammenspiel zwischen dem BK-Kanal und anderen, in Fettzellen und Präadipozyten exprimierten  $Ca^{2+}$ -Ionenkanälen, wie beispielsweise Spannungs-abhängigen T-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen (z.B.  $Ca_v3.1$ ) (Oguri et al., 2010) und L-Typ-Calciumkanälen (Shi et al., 2000; Neal and Clipstone, 2002). In Zellen wie Chondrozyten, sowie verschiedenen Bereichen des nephralen Gewebes und Bronchialepithel konnten außerdem eine Interaktion des BK-Kanals mit verschiedenen TRP-Kanälen (*transient receptor potential channels*) nachgewiesen werden (Fernandez-Fernandez et al., 2008; Hdud et al., 2014b, a; Li et al., 2016).



**Abb. 5.1: Hypothesenmodell zum Einfluss des adipozytären BK-Kanals auf Fettzellreifung, Differenzierung und Browning**

Der Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  über den Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen, beispielsweise über L-Typ-Calciumkanäle, kann die Lipolyse in Fettzellen unterdrücken. Dies resultiert

in einer massiven Hypertrophie der Zellen. Darüber hinaus kann dieser Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  jedoch auch zu einer vermehrten Expression von Peroxisom-Proliferator aktiviertem Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) führen. Dieser fördert wiederum die Bildung der Fettsäure-Synthase (FAS), was zu vermehrter Lipogenese und Triglycerideinlagerung in Fettzellen führt und somit wiederum deren Hypertrophie begünstigt. Die Steigerung verschiedener Differenzierungsfaktoren wie Stearyl-CoA-Desaturase 1 (SCD-1), Adipozyten Protein 2 (aP2), Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Adipozyten Determinierungs- und Differenzierungsfaktor 1 (ADD1) wird über PPAR $\gamma$  ebenfalls verstärkt. Außerdem hat die Capsaicin-vermittelte Aktivierung des TRP-Vanilloid 1 Kanals (TRPV1) ebenfalls PPAR $\gamma$ -assoziierte Effekte auf die Fettzellendifferenzierung und führt über die vermehrte Expression von PPAR $\gamma$ -Co-Aktivatoren 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) zu einem vermehrten *Browning* weißer Fettzellen. Gleichzeitig wird durch TRPV1-vermittelte Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  die Adipogenese unterdrückt. TRP Melastin 8-Kanäle (TRPM8) können nach Aktivierung über Kältereize oder Menthol zu einer Aktivierung des *Brownings* via Proteinkinase A (PKA) führen. Daneben sind auch Ionenkanäle in die Modulation von Adipogenese und Fettzellproliferation involviert, welche nachweislich mit BK-Kanälen interagieren können: **(A)** Ein Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  durch  $Ca^{2+}$ -Einstrom mittels TRP Vanilloid 4-Rezeptoren (TRPV4) führt zur Verminderung der PPAR $\gamma$ -Co-Aktivatoren 1 $\alpha$ -Expression (PGC1 $\alpha$ ) und unterdrückt in Mäusen somit die Ucp1-Bildung und das hieraus resultierende *Browning*. Über Aktivierung der Proteinkinase B (pAkt) kommt es zur vermehrten Differenzierung von Fettzellen. Beide Prozesse fördern die Entstehung von Adipositas. Die TRPV4-assoziierten Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  können ebenso wie die ansteigenden intrazellulären Natriumionenkonzentration  $[Na^+]_i$  die Liganden- bzw. Spannungs-anhängige Aktivierung des BK-Kanals auslösen. Dieser ist wiederum in der Lage, die Triebkraft für eine TRPV4-Aktivierung und damit auch die TRPV4-Offenwahrscheinlichkeit zu erhöhen und ist somit essentiell für die Funktion des TRP-Kanals. Möglicherweise moduliert der BK-Kanal auch die in Fettzellen und Präadipozyten exprimierte TRPV2- und TRP Melastin 7-Kanäle (TRPM7) in ähnlicher Weise. Diese können über eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zum einen die pAkt-vermittelte Differenzierung fördern und außerdem über verschiedene Cycline (cyclin D1, cyclin E) sowie die Aktivierung von pERK1/2 den  $G_0/G_1$ -Übergang der Zellen fördern. Dies führt zu einer gesteigerten Proliferation der entsprechenden Zellen. Die Hyperpolarisation der Zellmembran durch BK-assoziierte Kaliumströme könnte jedoch auch die Offenwahrscheinlichkeit von Spannungs-abhängigen Calciumkanälen (z.B. Cav3.1) reduzieren und somit über einen  $G_0/G_1$ -Arrest die Zellproliferation hemmen. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Verstärkung der Zellproliferation in BK-defizienten eWAT-Kulturen darstellen. **(B)** Die Blockade oder genetische Deletion des BK-Kanals würde dementsprechend in einer TRPV4-Inaktivierung und somit einem vermehrten *Browning* resultieren. Darüber hinaus würde die Cav3.1-vermittelte Proliferation ansteigen und gleichzeitig die TRPV4-assoziierte Differenzierung zu reifen Fettzellen vermindert werden, was möglicherweise die Bildung kleiner, gesunder weißer Fettzellen begünstigt.

Dass verschiedene Vertreter der TRP-Familie auch in Präadipozyten und Fettzellen von Mensch und Maus exprimiert werden, konnte erst kürzlich in einer Reihe von Arbeiten aufgezeigt werden (Zhang et al., 2007; Motter and Ahern, 2008; Ma et al., 2012; Ye et al., 2012; Bishnoi et al., 2013; Palmer and Lunn, 2013; Che et al., 2014; Sanchez et al., 2016). Insbesondere TRPV4-, sowie TRPV2- und TRPM7-Kanäle spielen offensichtlich für Proliferation und Differenzierung von Präadipozyten eine zentrale Rolle (Ye et al., 2012). Interessanterweise weisen TRPV4-defiziente Mäuse einen Phänotyp auf, welcher dem der adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tiere sehr ähnlich ist. Die Deletion oder Blockade des TRPV4-Kanals geht ebenso wie die adipozytäre Ausschaltung des BK-Kanals mit protektiven Effekten hinsichtlich DIO und proinflammatorischen Prozessen einher (Ye et al., 2012). Darüber hinaus führt die Deletion des TRPV4 ebenfalls zu einer erhöhten Ucp1-Expression und führt in TRPV4-defizienten Tieren zu massiven Veränderungen des thermogenetischen Programms (Ye et al., 2012). Der TRPV4-vermittelte Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  scheint in Präadipozyten eine Aktivierung der pAKT-Kinase und daraus resultierend eine vermehrte Differenzierung der Fettzellen zu

mediieren. Außerdem ist der Kanal negativ mit der Expression von PGC1 $\alpha$  und Ucp1 und somit letztendlich auch dem Browning von weißen Fettzellen assoziiert (Ye et al., 2012).

Interessanterweise zeigte eine erst kürzlich erschienene Publikation der Arbeitsgruppe um Yue Li in nephralem Gewebe ein enges Zusammenspiel zwischen dem BK-Kanal und TRPV4-Kanälen. So kann der BK-Kanal durch TRPV4-vermittelte Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  aktiviert werden. Darüber hinaus führt auch der vermehrte Einstrom von Natriumionen über TRPV4, einem unspezifischen Kationenkanal, zur Membrandepolarisation, wodurch die Offenwahrscheinlichkeit des BK-Kanals drastisch ansteigt (Li et al., 2016). Des Weiteren kann die BK-Kanal Aktivierung als wichtige Schaltstelle zwischen einem  $[Ca^{2+}]_i$  Anstieg und der Änderung des Membranpotentials auch den  $Ca^{2+}$ -Influx über TRPV4-Kanäle modulieren (Li et al., 2016). Da beide Kanäle nachweislich auch in Fettzellen und Präadipozyten exprimiert werden, besteht auch hier möglicherweise eine ähnliche Interaktion der beiden Kanäle. Dementsprechend wäre der BK-Kanal essentiell für die Funktionalität der TRPV4 Kanäle in Fettzellen und Präadipozyten und somit für TRP-abhängige Effekte auf Differenzierung, Proliferation und Browning. Dies wäre wiederum eine mögliche Erklärung für die überraschend ähnlichen Phänotypen der TRPV4<sup>-/-</sup>- und adipoBK-defizienten Tiere und den Einfluss des BK-Kanals auf Differenzierungs-, Reifungs- und Browning-Prozesse.

Mit TRPM7- und TRPV2-Kanälen werden weitere Vertreter der TRP-Familie in Präadipozyten exprimiert und spielen als Kationenkanäle über ihre Regulation des intrazellulären Calciumhaushaltes eine zentrale Rolle hinsichtlich Proliferation und Differenzierung der Zellen (Che et al., 2014). Möglicherweise besteht auch zwischen diesen Kanälen und dem BK-Kanal eine enge funktionale Kopplung. Dies könnte, neben einer möglicherweise BK-vermittelten Blockade spannungsabhängiger Calciumkanäle (wie dem  $Ca_v3.1$ ) (Oguri et al., 2010) den G0/G1-Übergang der Zellen im Zellzyklus beeinflussen und so letztlich einen sehr komplexen Einfluss auf die Proliferation der Fettzellen haben. Darüber hinaus konnten auch weitere Mitglieder der TRP-Familie, wie beispielsweise TRPM8 und TRPV1, mit einem Schutz vor DIO sowie vermehrtem Browning in Zusammenhang gebracht werden. Die Aktivierung von TRPM8, einem TRP-Kanal welcher funktional in murinem BAT sowie Präadipozyten und weißen Fettzellen exprimiert wird (Ma et al., 2012; Bishnoi et al., 2013), führt über PKA-Aktivierung zur vermehrten Expression von Ucp1 und resultiert sowohl in einer erhöhten Körperkerntemperatur und lokomotorischen Aktivität der Tiere, wie auch einem effektiven Schutz vor DIO (Ma et al., 2012). Auch TRPV1-Kanäle werden sowohl in 3T3L1-Präadipozyten (Zhang et al., 2007; Bishnoi et al., 2013), als auch humanen und murinen viszeralen Fettzellen exprimiert (Zhang et al., 2007; Motter and Ahern, 2008; Bishnoi et al., 2013; Palmer and Lunn, 2013). Ihre Rolle hinsichtlich Adipogenese und Übergewicht ist bislang jedoch umstritten. Während Motter et al. aufzeigen, dass TRPV1-defiziente Mäuse vor Adipositas geschützt zu sein scheinen (Motter and Ahern, 2008) konnten verschiedene andere Arbeiten zeigen, dass die Aktivierung von TRPV1 mittels Capsaicin zu einem vermehrten Browning von WAT (Baskaran et al., 2016), sowie einer reduzierten Adipogenese führt (Zhang et al., 2007) und somit einen effektiven Schutz vor Adipositas darstellt (Zhang et al., 2007; Palmer and Lunn, 2013; Baskaran et al., 2016).

Diese Erkenntnisse sowie die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse machen deutlich, dass der adipozytäre BK-Kanal, beispielsweise über Interaktion mit weiteren (TRP-)

Ionen-Kanälen, ein wichtiges und Erfolg-verheißendes Target für die Prävention und Therapie von Adipositas darstellt. Hierfür ist es jedoch unabdingbar, die molekularen Mechanismen der BK-Kanal-Funktion sowie die genauen Details der Interaktion mit anderen Ionenkanälen, wie beispielsweise den TRP-Kanälen, weiter zu untersuchen und aufzuklären, um seine Rolle hinsichtlich der Entstehung von Adipositas und seinen Folgeerkrankungen zu verstehen und gegebenenfalls als sinnvolles Arzneistoff-Target nutzen zu können. Der Fokus sollte hierbei insbesondere auf der Rolle des adipozytären BK-Kanals bei der Differenzierung von Fettzellen, sowie dem *Browning* und der Thermogenese liegen. Zusammenfassend scheint es jedoch naheliegend, dass der BK-Kanal die Fettzellreifung über verschiedene Calcium-abhängige Signalkaskaden beeinflussen und modulieren kann.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Erste klinische Studien haben einen direkten Zusammenhang zwischen schwerer Adipositas und einer massiven Überexpression des BK-Kanals aufgezeigt (Jiao et al., 2011), was den BK-Kanal zu einem attraktiven Target zukünftiger Adipositas-Therapien macht.

Wie vorangegangene Arbeiten am hiesigen Lehrstuhl an Mäusen auf einem Hybrid-Hintergrund zeigten (Beisan Mohammed, unveröffentlichte Dissertation 2014, Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen), kann die globale Deletion des BK-Kanals interessanterweise vor einer exzessiven Gewichtszunahme schützen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten diese initialen Befunde nun auf globale BK-Knockout-Mausmutanten des kongenen C57/BL6 Mausstamms, sowie auf ein etabliertes Adipositas-Mausmodell (sogenannte ob/ob-Mäuse) ausgeweitet werden. In beiden Mausmodellen führte die Deletion des BK-Kanals zu einem hochsignifikanten Schutz vor exzessiver Gewichtszunahme und Fetteinlagerung.

Auf Grund der Tatsache, dass die globale Deletion des BK-Kanals neben positiven Einflüssen auf Körpergewicht und Fetteinlagerung jedoch mit der Manifestation einer Reihe von schwerwiegenden Erkrankungen wie cerebellarer Ataxie (Sausbier et al., 2004), Hypertonie (Sausbier et al., 2005), Reizblasensymptomatik und Inkontinenz (Sprossmann et al., 2009) sowie erektiler Dysfunktion (Werner et al., 2005) assoziiert ist, ist eine globale Deletion oder systemische Blocke des Kanals als sinnvolle Strategie zur Therapie von Adipositas dennoch vermutlich ungeeignet. Im Zuge dieser Arbeit wurde daher eine gezielte Deletion des adipozytären BK-Kanals mittels Cre/loxP Rekombinationssystem verfolgt. Von der effizienten Ausschaltung des adipozytären BK-Kanals ging ein hochpotenter Schutz vor übermäßiger Fetteinlagerung und Gewichtszunahme unter Hochfett-diät-Fütterung aus. Des Weiteren war nach BK-Kanal-Deletion im Sinne eines therapeutischen Ansatzes auch ein positiver Einfluss auf Körpergewicht und Körperstruktur in bereits adipösen Subjekten zu beobachten. Diese Effekte scheinen weder auf Größenunterschiede der Tiere, noch auf Varianzen der Nahrungsaufnahme zurück zu führen zu sein, sondern haben allem Anschein nach primär metabolische Ursachen.

Wie weitreichend die Einflüsse des adipozytären BK-Kanals auf den Metabolismus der Tiere sind, wurde bei genauerer Analyse des Phänotypes deutlich: Neben direktem Einfluss auf das Körpergewicht und den Körperfettanteil sind auch die Adipozyten selbst in ihrer Morphologie verändert. Die Fettzellgröße in iWAT von adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tieren ist gegenüber Kontrolltieren ebenso signifikant verringert, wie auch die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in diesen Geweben. Dies wiederum legt die Expansion gesunder, kleiner und entzündungsfreier Fettzellen (Mitschke et al., 2013) bei Abwesenheit des adipozytären BK-Kanals nahe. Darüber hinaus konnte durch genetische Ausschaltung des Kanals auch einer verschlechterten Glucosetoleranz sowie der Entstehung einer Insulinresistenz vorgebeugt werden. So scheint die Deletion des adipozytären BK-Kanals effektiv vor der Entstehung eines metabolischen Syndroms unter hochkalorischen Bedingungen zu schützen. Darüber hinaus profitierte auch die Leber als ein weiteres metabolisch aktives Gewebe von der BK-Kanal-Deletion: Die Entstehung einer NAFLD konnte genauso effektiv verhindert werden, wie eine übermäßige Autophagie in Hepatozyten.

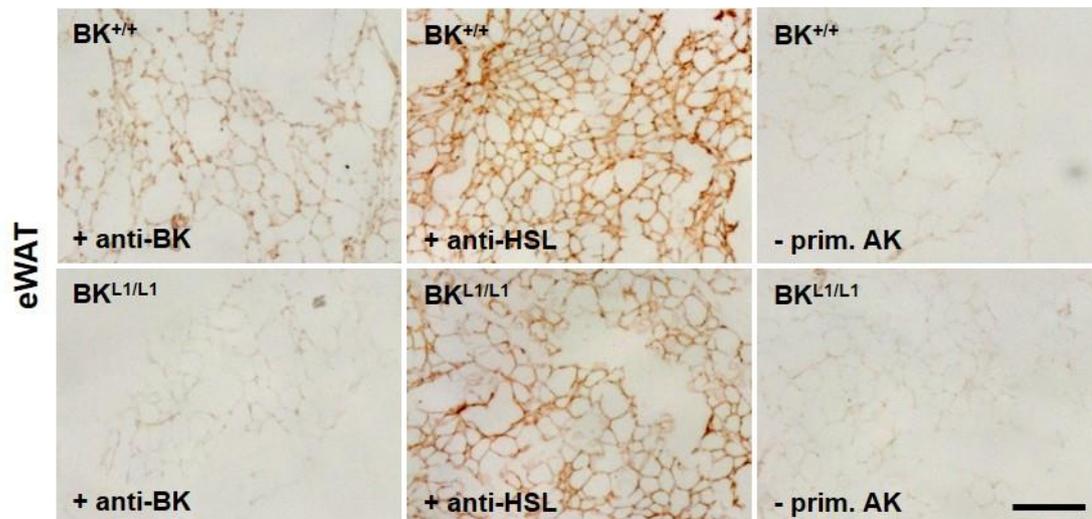
Über welche mechanistischen Signalwege die Deletion des adipozytären BK-Kanal zu diesem schlanken und metabolisch gesünderen Phänotyp führt, bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen. Möglicherweise liegt die Ursache jedoch in einem Anstieg von *Browning* und BAT-Aktivität in Folge der BK-Kanal-Deletion begründet, was zu einem Anstieg im Energieverbrauch der Tiere führen würde. Dies hätte wiederum einen positiven Einfluss auf die Energiehomöostase der Tiere. Hinweis hierauf ist neben der signifikant gesteigerten Körpertemperatur der adipoBK<sup>L2/L1</sup>-Tiere nach Hochfett-Diät auch die ebenfalls signifikant gesteigerte Expression des braunen Fettzellmarkers Ucp1 im iWAT dieser Tiere, welches sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Level nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus konnte auch eine Hypertrophie brauner Adipozyten, welche möglicherweise ähnlich wie in weißen Fettzellen mit deren Funktionsverlust einhergeht (Pouliot et al., 1992; Feng et al., 2013; Pellegrinelli et al., 2016), durch die genetische BK-Kanal Modifikation verhindert werden.

Alle diese im Zuge dieser Arbeit erstmals gewonnenen Befunde und Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Deletion des adipozytären BK-Kanals weitreichende positive Einflüsse auf Körpergewicht und metabolische Gesundheit zur Folge hat. Da die Gewebs-spezifische Exzision des Kanals außerdem nicht mit den systemischen Nebenwirkungen einer globalen Kanal-Deletion einhergeht, könnte hierin ein äußerst attraktiver und vielversprechender neuer Therapieansatz begründet liegen.

Außer Frage steht jedoch, dass zuvor weitere Untersuchungen notwendig sind um insbesondere die mechanistischen Ursachen des schlanken Phänotypes der BK-defizienten Tiere näher zu untersuchen. Insbesondere die genauen Effektoren und Interaktoren des BK-Kanals in braunen und weißen Fettgeweben müssen hierfür identifiziert und näher charakterisiert werden. Vielversprechende Targets könnten an dieser Stelle TRP-Kanäle, insbesondere TRPV4-Kanäle darstellen. Diese werden wie BK-Kanäle sowohl in Präadipozyten als auch reifen Fettzellen exprimiert (Ye et al., 2012; Bishnoi et al., 2013; Palmer and Lunn, 2013; Che et al., 2014; Sanchez et al., 2016) und interagieren in verschiedenen Geweben nachweislich auch mit BK-Kanälen (Fernandez-Fernandez et al., 2008; Hdud et al., 2014b, a; Li et al., 2016).

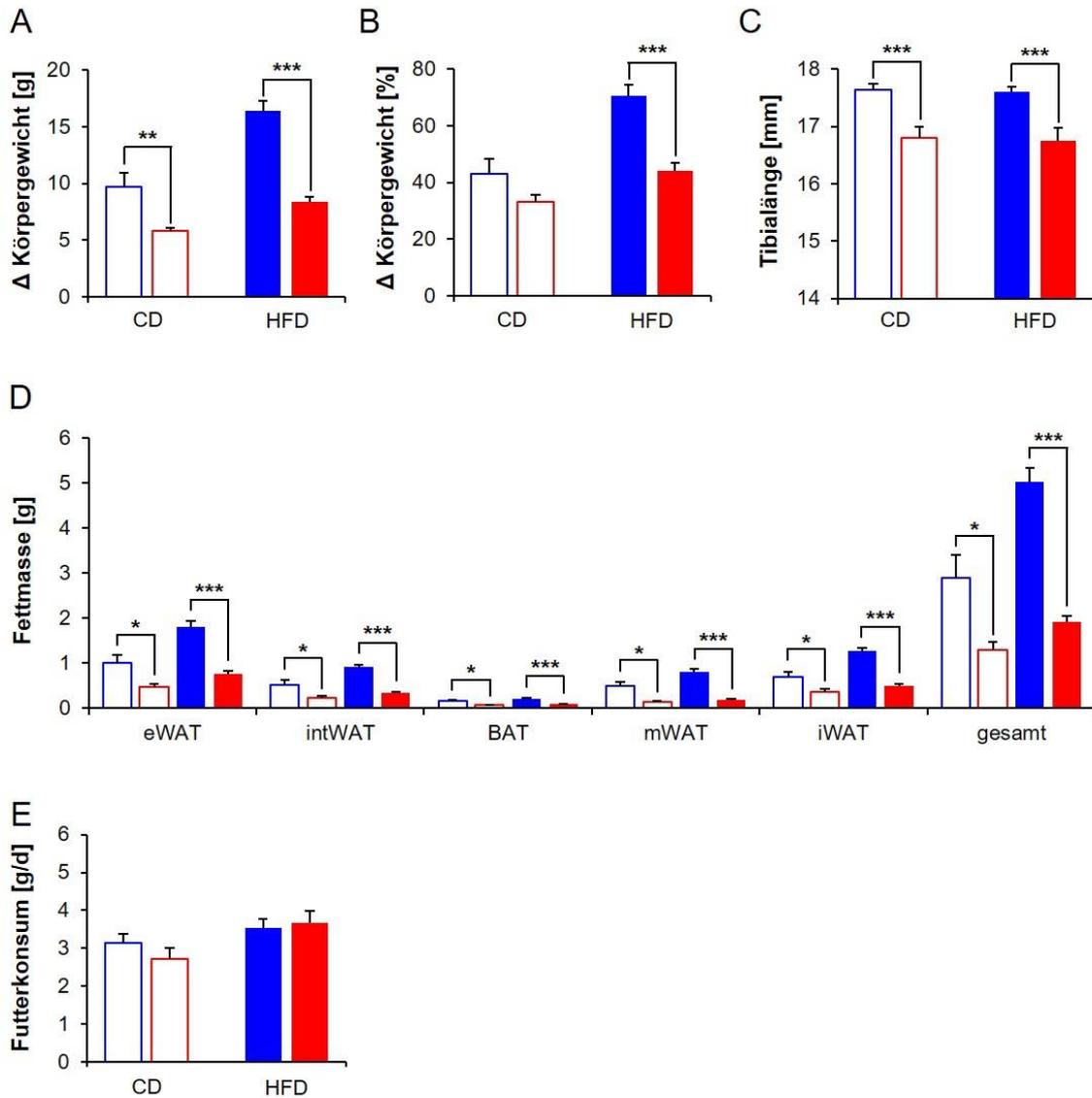
Im Hinblick auf Auswirkungen der BK-Kanal-Deletion auf das *Browning* weißer Fettdepots oder eine vermehrte Aktivierung von BAT könnten beispielsweise weitere Untersuchungen zur Expression klassischer *Browning*-Marker *in vivo* und *in vitro* durchgeführt werden. Darüber hinaus könnten mit Hilfe von FDG-PET-Untersuchungen oder Messung der neuronalen Aktivität in BAT weitere Einblicke in dessen metabolische und thermogenetische Funktionalität in Abhängigkeit der BK-Kanal-Expression sowie den hierdurch bedingten Veränderungen der BAT-Zellgröße gewonnen werden. Ein weiterer Ansatz zur mechanistischen Aufklärung der Auswirkung der adipozytären BK-Kanal-Deletion liegt auch in Metabolom-Untersuchungen (Daten nicht gezeigt), welche im Rahmen dieser Arbeit bereits begonnen werden konnten. Diese könnten potentielle Veränderungen hinsichtlich der Verstoffwechslung verschiedener Nährstoffe aufdecken und somit zu einem besseren Verständnis der mechanistischen Grundlagen des Schutzes vor Adipositas und deren Folgeerkrankungen beitragen.

## 7 Supplement



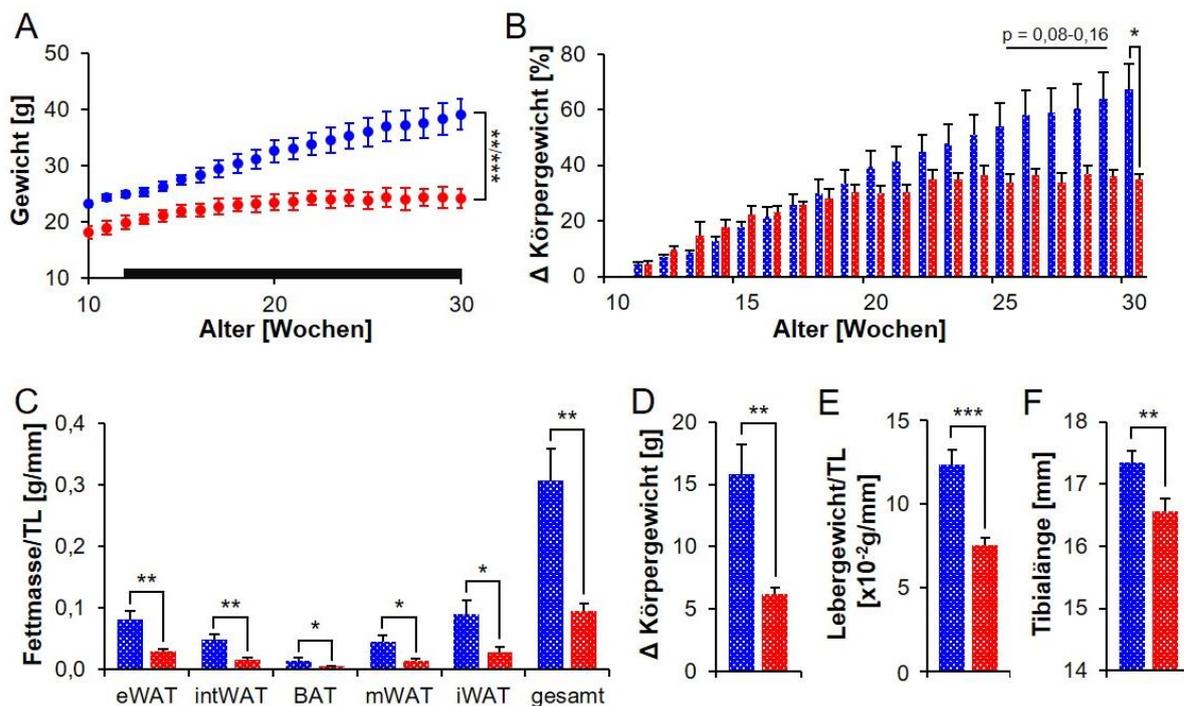
### Suppl. Abb. 1: Immunhistochemischer Nachweis von BK und HSL mittels DAB-Methode

Immunhistochemischer Nachweis verschiedener Proteine in Gefrierschnitten aus epididymalem Fettgewebe (eWAT) mittels DAB-Methode (braune Färbung). BK-Kanal (linke Spalte) kann im eWAT von Wildtyp-Tieren (BK<sup>+/+</sup>), nicht jedoch im Gewebe von BK-Kanal-defizienten Tieren (BK<sup>L1/L1</sup>) detektiert werden. Nachweis des Fettzellmarkers Hormonsensitive Lipase (HSL) in beiden Genotypen (mittlere Spalte) verifiziert die Identität von Fettgewebe. Die Negativkontrolle (rechte Spalte) ohne Primärantikörper zeigt keine Braunfärbung und somit die Spezifität der Methode. Maßstabsbalken entspricht 200  $\mu$ m.



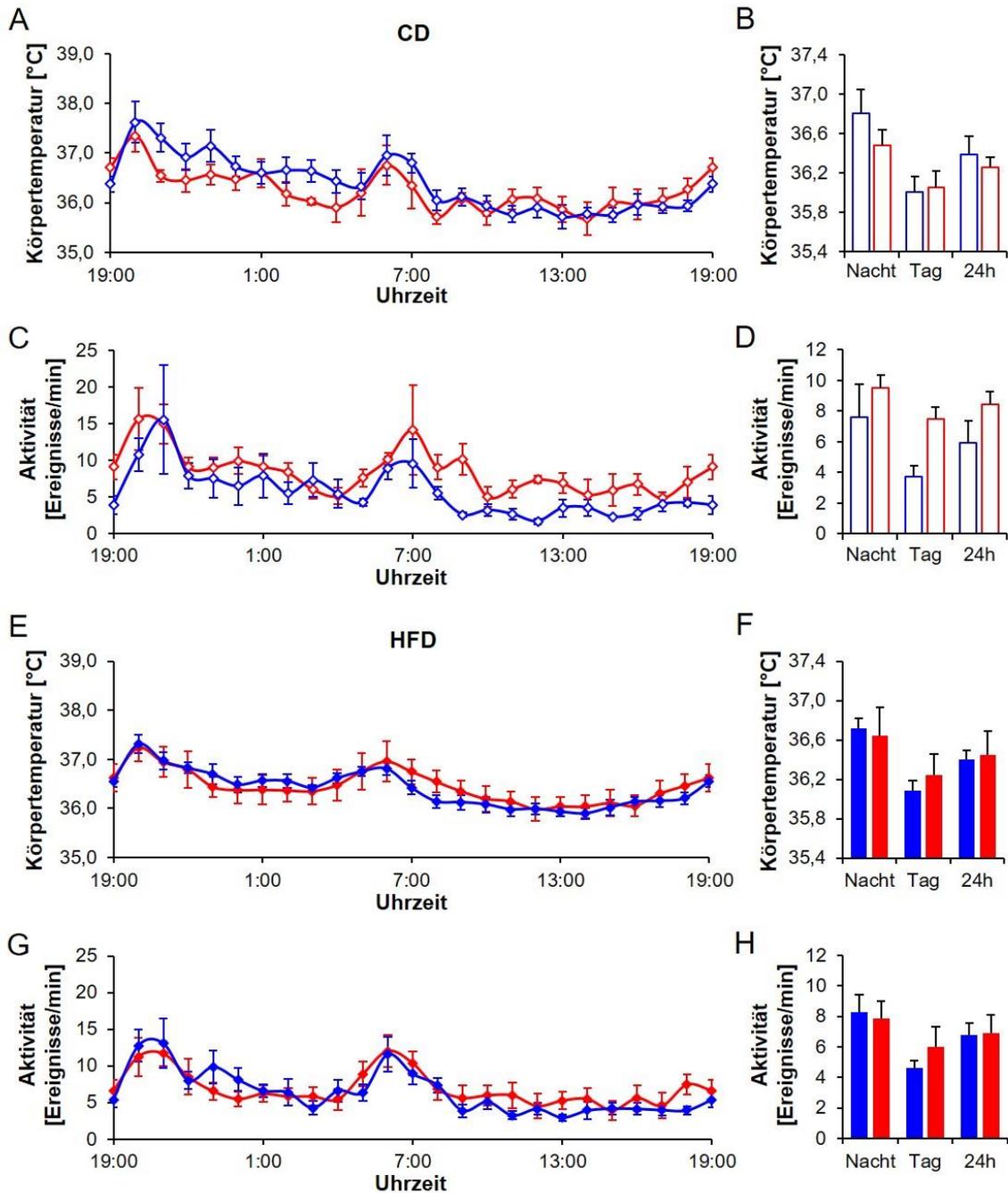
**Suppl. Abb. 2: Größenparameter globaler BK-Tiere**

Zunahme des Körpergewichtes ( $\Delta$  Körpergewicht) unter Kontrolldiät (CD, offene Symbole) und Hochfettdiät (HFD, gefüllte Symbole) über einen Zeitraum von 20 Wochen (Alter von 10 Wochen bis 30 Wochen). Die absolute **(A)** ebenso wie die prozentuale **(B)** Zunahme des Körpergewichtes ist sowohl unter CD (BK<sup>+/+</sup> n=15, BK<sup>L1/L1</sup> n=14) als auch unter HFD (BK<sup>+/+</sup> n=34, BK<sup>L1/L1</sup> n=29) in BK<sup>L1/L1</sup> signifikant reduziert. **(C)** Hochsignifikant reduzierte Tibiallänge in BK<sup>L1/L1</sup> (CD n=6, HFD n=11) gegenüber BK<sup>+/+</sup>-Tieren (CD n=9, HFD n=20) sowohl unter CD- als auch HFD-Fütterung. **(D)** Analyse der Gewichte von epididymalem Fettgewebe (eWAT), interscapularem Fett (intWAT), braunem Fettgewebe (BAT), mesenterischem Fett (mWAT) und Leistenfett (iWAT) sowie die daraus resultierende Gesamtmasse (gesamt). Die absolute Masse aller untersuchten Fettdepots ist in BK<sup>L1/L1</sup> (n=12) hochsignifikant reduziert gegenüber BK<sup>+/+</sup> (n=20). **(E)** Der durchschnittliche Futterkonsum, ermittelt in modifizierten metabolischen Käfigen, unterscheidet sich zwischen Kontrolltieren (BK<sup>+/+</sup>, blau) und BK-Kanaldefizienten Tieren (BK<sup>L1/L1</sup>, rot), sowohl unter Kontrolldiät-Fütterung (CD, offene Symbole), als auch unter Hochfettdiät (HFD, gefüllte Symbole) nach Fütterungsversuch im Alter von 30 Wochen nicht. **(A-E)** Abbildungen zeigt Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.



### Suppl. Abb. 3: Sucrose-Fütterung globaler BK-Tiere

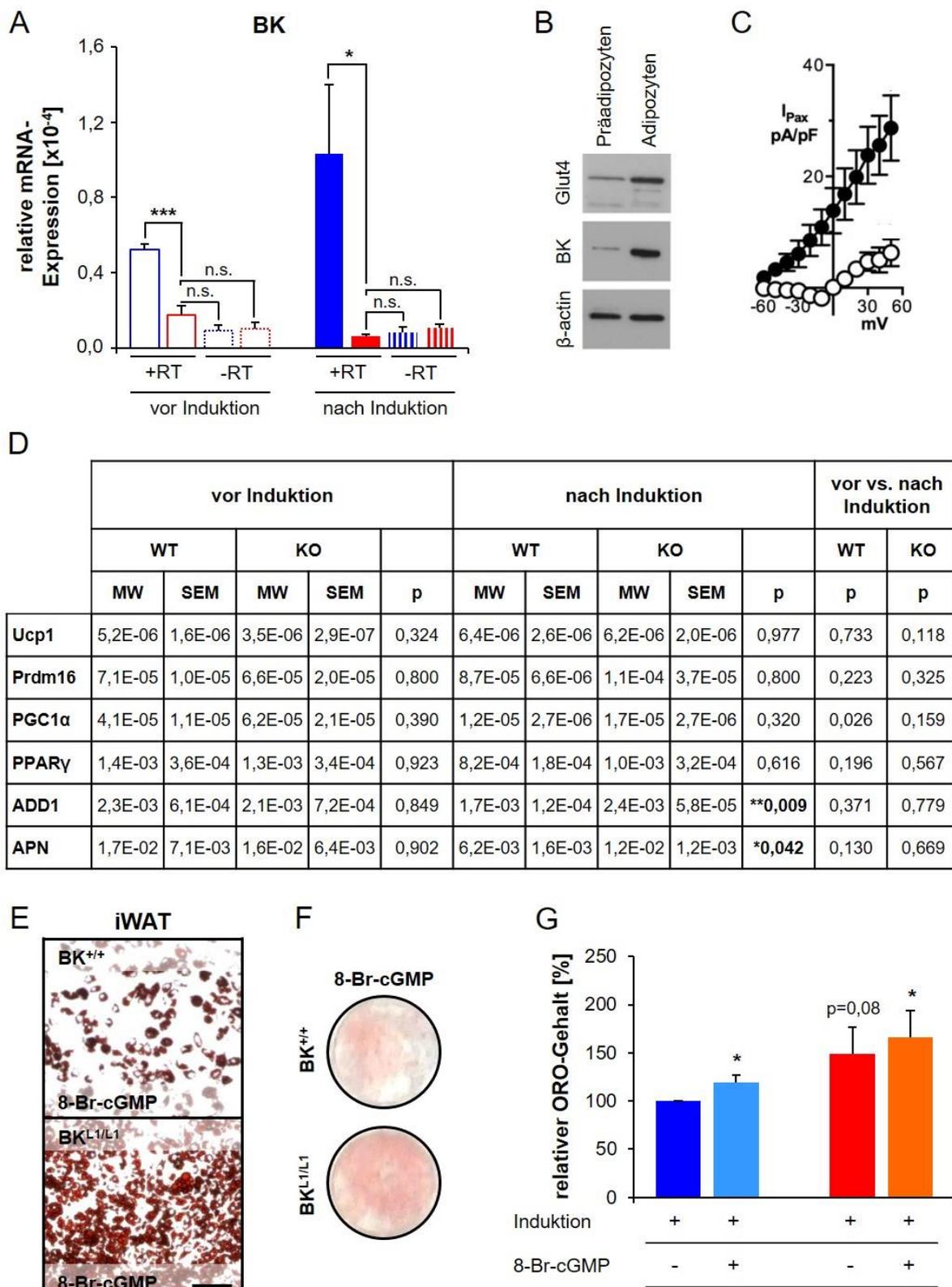
**(A)** Gewichtsentwicklung von Wildtyp-Tieren (BK<sup>+/+</sup>) und global BK-Kanal-defizienten Mäusen (BK<sup>L1/L1</sup>) unter Hochkohlenhydratdiät (30% Sucrose). Die Dauer der Sucrose-Fütterung wird durch einen schwarzen Balken dargestellt. Die BK<sup>+/+</sup>-Tiere (blau, n=7) zeigen über den gesamten Versuchszeitraum ein hochsignifikant erhöhtes Körpergewicht gegenüber ihren BK<sup>L1/L1</sup>-Wurfgeschwistern (rot, n=6) (\*\* Woche 10-12 sowie 16-30, \*\*\* Woche 13-15). **(B)** Die prozentuale Körpergewichtszunahme (Δ Körpergewicht [%]) scheint in BK<sup>L1/L1</sup> ebenfalls reduziert (\* Woche 30). **(C)** Das Gewicht unterschiedlicher Fettdepots, normiert auf die Tibiallänge (TL), ist nach Sucrose-Fütterung in BK<sup>L1/L1</sup> in epididymalem Fett (eWAT), interscapularem weißem Fett (intWAT), braunem Fettgewebe (BAT), mesenterischem Fettgewebe (mWAT) sowie Leistenfett (iWAT) signifikant verringert, wodurch sich auch die Summe der untersuchten Fettdepots (gesamt) signifikant von BK<sup>+/+</sup>-Tieren unterscheidet. Die absolute Zunahme des Körpergewichtes **(D)** über den Versuchszeitraum ist in BK<sup>L1/L1</sup> gegenüber BK<sup>+/+</sup> ebenso reduziert, wie das auf die Tibiallänge bezogene Lebergewicht **(E)** und die Tibiallänge selbst **(F)**. **(A-F)** Abbildungen zeigen Mittelwerte ± Standardfehler (SEM). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.



**Suppl. Abb. 4: Telemetrische Erfassung von Körpertemperatur und Aktivität globaler BK-Tiere**

Mittels telemetrischer Messung erfasste Körpertemperatur und lokomotorische Aktivität von 30 Wochen alten globalen BK-Kanal-Knockout Mäusen ( $BK^{L1/L1}$ ) und Wildtyp-Kontrollen ( $BK^{+/+}$ ) unter Kontrolldiät (CD, offene Symbole) und Hochfettdiät (HFD, gefüllte Symbole). Die Haltung der Tiere erfolgt innerhalb eines 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (7h-19h). **(A)** Darstellung der Körpertemperatur im Tagesprofil unter CD zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen  $BK^{+/+}$  (blau,  $n=4$ ) und  $BK^{L1/L1}$  (rot,  $n=4$ ). **(B)** Die gemittelte Körpertemperatur über Nacht (19h-7h), Tag (7h-19h) oder 24h (7h-7h) ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Genotypen. **(C)** Die Aktivität der Tiere im Tagesverlauf unterscheidet sich zwischen  $BK^{L1/L1}$  und  $BK^{+/+}$  nicht. **(D)** Auch die gemittelte Aktivität während der Nacht, dem Tag oder innerhalb 24h ist nicht verschieden. **(E)** Darstellung der Körpertemperatur im Tagesprofil unter HFD zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen  $BK^{+/+}$  (blau,  $n=6$ ) und  $BK^{L1/L1}$  (rot,  $n=6$ ). **(F)** Die gemittelte Körpertemperatur über Nacht (19h-7h), Tag (7h-19h) oder 24h (7h-7h) ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Genotypen. Die Aktivität der  $BK^{L1/L1}$ - und  $BK^{+/+}$ -Tiere unterscheidet

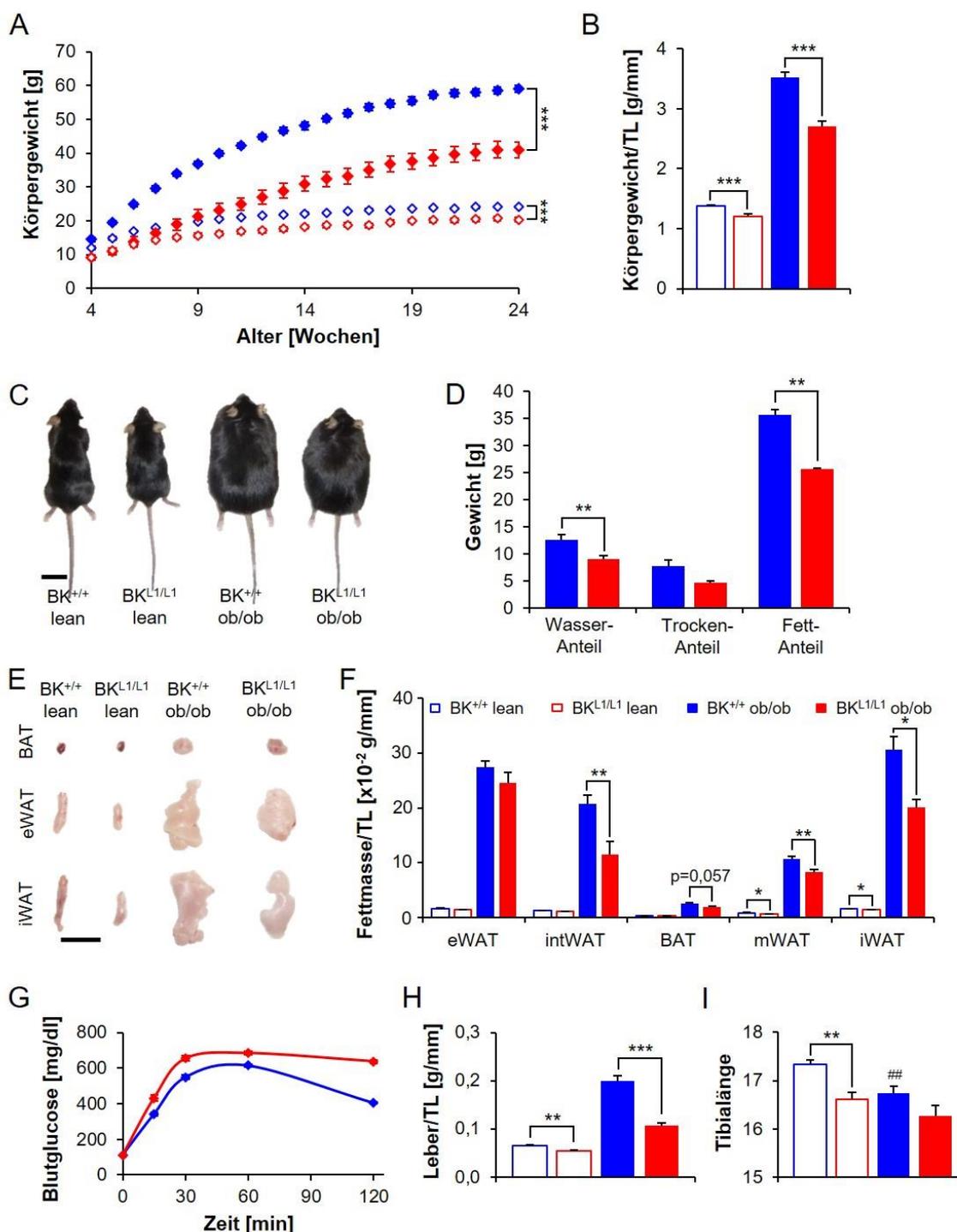
sich im Tagesverlauf (**G**) genauso wenig, wie die gemittelte Aktivität (**H**) während der Nacht, dem Tag oder innerhalb 24h. (**A-H**) Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM).



### Suppl. Abb. 5: Untersuchung zur Reifung und Fettakkumulation von Präadipozyten-Kulturen

(A-D) Untersuchungen an Kulturen aus epididymalem Fettgewebe (eWAT) (**A**) Analyse der BK messenger RNA-Expressionen (mRNA) mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR), normiert auf  $\beta$ -

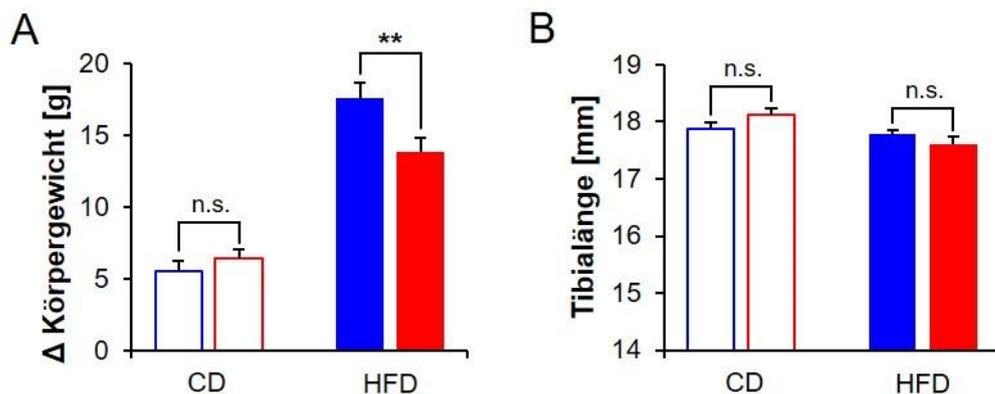
Aktin, vor Induktion (Tag 4-5) der Fettzellreifung (offene Balken) sowie an Tag 14 der Kultur (nach Induktion, gefüllte Balken). Positivproben (+RT) sind durchgehend gefärbt, Negativkontrollen ohne reverse Transkriptase (-RT) gestreift. Die Signalstärke der BK<sup>L1/L1</sup> (rot) unterscheidet sich hierbei weder vor noch nach Induktion von jener, der Negativkontrollen. Die BK mRNA-Expression von BK<sup>+/+</sup> (blau) ist sowohl vor als auch nach Induktion signifikant höher. **(B)** Western Blot Analyse von BK-Kanal und Glucosetransporter 4 (GLUT4) zeigt stärkere Protein-Expression in reifen Adipozyten gegenüber Präadipozyten. **(C)** Deutlich stärkere Ionenströme in reifen Adipozyten (schwarze Kreise), verglichen mit Fettvorläuferzellen (weiße Kreise). **(D)** Untersuchung verschiedener *Browning*- und Fettzellreifungsmarker in eWAT-Kulturen vor Induktion und am Ende der Kulturen (d14). Vor Induktion sind keine Unterschiede in der mRNA-Expression von Uncoupling Protein 1 (Ucp1), PR-Domäne enthaltendes Protein 16 (Prdm16), PPAR $\gamma$ -Coaktivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ), Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), Adipozyten-Differenzierungs- und Determinierungsfaktor 1 (ADD1) sowie Adiponektin (APN) zwischen BK<sup>+/+</sup>-Kulturen (n=5) und BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen (n=5) feststellbar. Nach Induktion sind APN und ADD1 in BK<sup>+/+</sup> (n=6) signifikant reduziert gegenüber BK<sup>L1/L1</sup> (n=3). Angegeben sind die gemittelten  $2^{-\Delta c(t)}$ -Werte (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01. **(E)** Lichtmikroskopische Aufnahmen von Ölrot-gefärbten, repräsentativen Ausschnitten einer ausgereiften Präadipozyten-Kultur aus iWAT unter Zusatz von 8-Br-cGMP (100  $\mu$ M Endkonzentration) zeigt eine deutlich erhöhte Anzahl an Ölrot gefärbten Fettzellen in BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen gegenüber BK<sup>+/+</sup>. **(F)** Übersichtsaufnahmen der Kulturgefäße zeigen ebenfalls eine vermehrte Rotfärbung der BK<sup>L1/L1</sup> Zellkultur-Platten nach Ölrot-Färbung. **(G)** Photometrische Bestimmung des relativen Ölrot-Gehaltes (518 nm), normiert auf BK<sup>+/+</sup> (n=8), zeigt eine tendenziell erhöhte Ölrot-Akkumulation (p=0,08) in BK<sup>L1/L1</sup>-Zellkulturen (rot, n=7) gegenüber BK<sup>+/+</sup> (blau). Die Zugabe von 8-Br-cGMP erhöhte sowohl in BK<sup>+/+</sup> (hellblau, n=7) als auch in BK<sup>L1/L1</sup>-Kulturen (orange, n=7) den relativen Ölrot-Gehalt. **(B, C)** Die Versuche wurden von der Arbeitsgruppe um Mike Shipston (Universität Edinburgh, UK) durchgeführt.



### Suppl. Abb. 6: Untersuchung von weiblichen BK X ob/ob Doppelmutanten

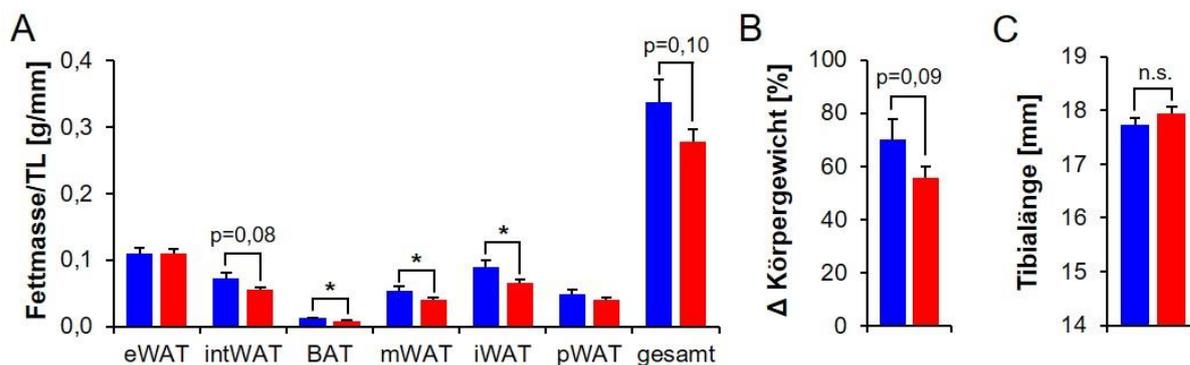
**(A)** Gewichtsentwicklung von weiblichen Wildtyp-Tieren (BK<sup>+/+</sup> lean, blau offene Symbole) und global BK-Kanal-defizienten Mäusen (BK<sup>L1/L1</sup> lean, rot offene Symbole) sowie BK<sup>+/+</sup> ob/ob (blau ausgefüllte Symbole) und BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob Doppelmutanten (rot ausgefüllte Symbole) mit Chow-Fütterung. BK<sup>+/+</sup>-Tiere (n=22) zeigen über den gesamten Versuchszeitraum ein hochsignifikant erhöhtes Körpergewicht gegenüber ihren BK<sup>L1/L1</sup>-Wurfgeschwistern (n=20). Auch bei den Doppelmutanten führt die Deletion des BK-Kanals zu einer hochsignifikanten Reduktion des Körpergewichtes in BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob (n=12) gegenüber BK<sup>+/+</sup> ob/ob (n=29). **(B)** Das auf die Tibiallänge (TL) normierte finale Körpergewicht im Alter von 24 Wochen, ist in BK<sup>L1/L1</sup> (n=13) hochsignifikant reduziert gegenüber BK<sup>+/+</sup> (n=14). Darüber hinaus resultiert die Deletion des BK-Kanals auch in BK<sup>L1/L1</sup> ob/ob (n=6) in einer hochsignifikanten Reduktion des Körpergewichtes gegenüber BK<sup>+/+</sup> ob/ob (n=20). **(C)** Repräsentative Fotos von Tieren im Alter von

24 Wochen. **(D)** Die Analyse der Körperstruktur mittels Soxhlet-Fettextraktion zeigt signifikante Gewichts-Reduktionen des Wasser- und Fettanteils in  $BK^{L1/L1}$  ob/ob (n=4) verglichen mit  $BK^{+/+}$  ob/ob (n=6). **(E)** Repräsentative Darstellung von braunem Fettgewebe (BAT), epididymalem Fett (eWAT) und Leistenfett (iWAT) der verschiedenen Genotypen im Alter von 24 Wochen. **(F)** Das Gewicht unterschiedlicher Fettdepots, normiert auf die Tibiallänge (TL), ist in schlanken  $BK^{L1/L1}$  (n=13) in mesenterischem Fett (mWAT) und iWAT signifikant erniedrigt gegenüber schlanken  $BK^{+/+}$ -Tieren (n=14). Bei den global BK-defizienten Doppelmutanten (n=6) ist gegenüber den  $BK^{+/+}$  ob/ob Tieren (n=20) eine hochsignifikante Reduktion der, auf die Tibiallänge normierten, Fettmasse in intWAT, mWAT und iWAT zu beobachten, während sich das eWAT-Gewicht nicht unterscheidet. Die Masse an BAT ist in  $BK^{L1/L1}$  ob/ob Tieren im Vergleich zu  $BK^{+/+}$  ob/ob Mäusen ebenfalls tendenziell erniedrigt ( $p=0,057$ ). **(G)** Die Untersuchung des Glucose-Stoffwechsels mittels intraperitonealem Glucose-Toleranz-Test (i.p. GTT) zeigt leicht erhöhte Blutglucose-Spiegel in  $BK^{L1/L1}$  ob/ob (n=5) gegenüber  $BK^{+/+}$  ob/ob Tieren (n=6). **(H)** Die Deletion des BK-Kanals erzielt sowohl in lean Kohorten als auch bei den BK ob/ob Doppelmutanten eine hochsignifikante Reduktion des Lebermasse/TL-Quotienten. **(I)** Die Tibiallänge der schlanken  $BK^{+/+}$ -Tiere ist signifikant höher, als die der schlanken  $BK^{L1/L1}$  Tiere. Zwischen den Doppelmutanten ist kein signifikanter Unterschied in der Tibiallänge vorhanden, jedoch ist in  $BK^{+/+}$  ob/ob eine hochsignifikante Reduktion der TL sowohl gegenüber schlanken BK zu verzeichnen (Signifikanz dargestellt durch #). **(A-I)** Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*  $p < 0,05$ ; \*\*/##  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . **(C, E)** Maßstabsbalken entsprechen 2 cm.



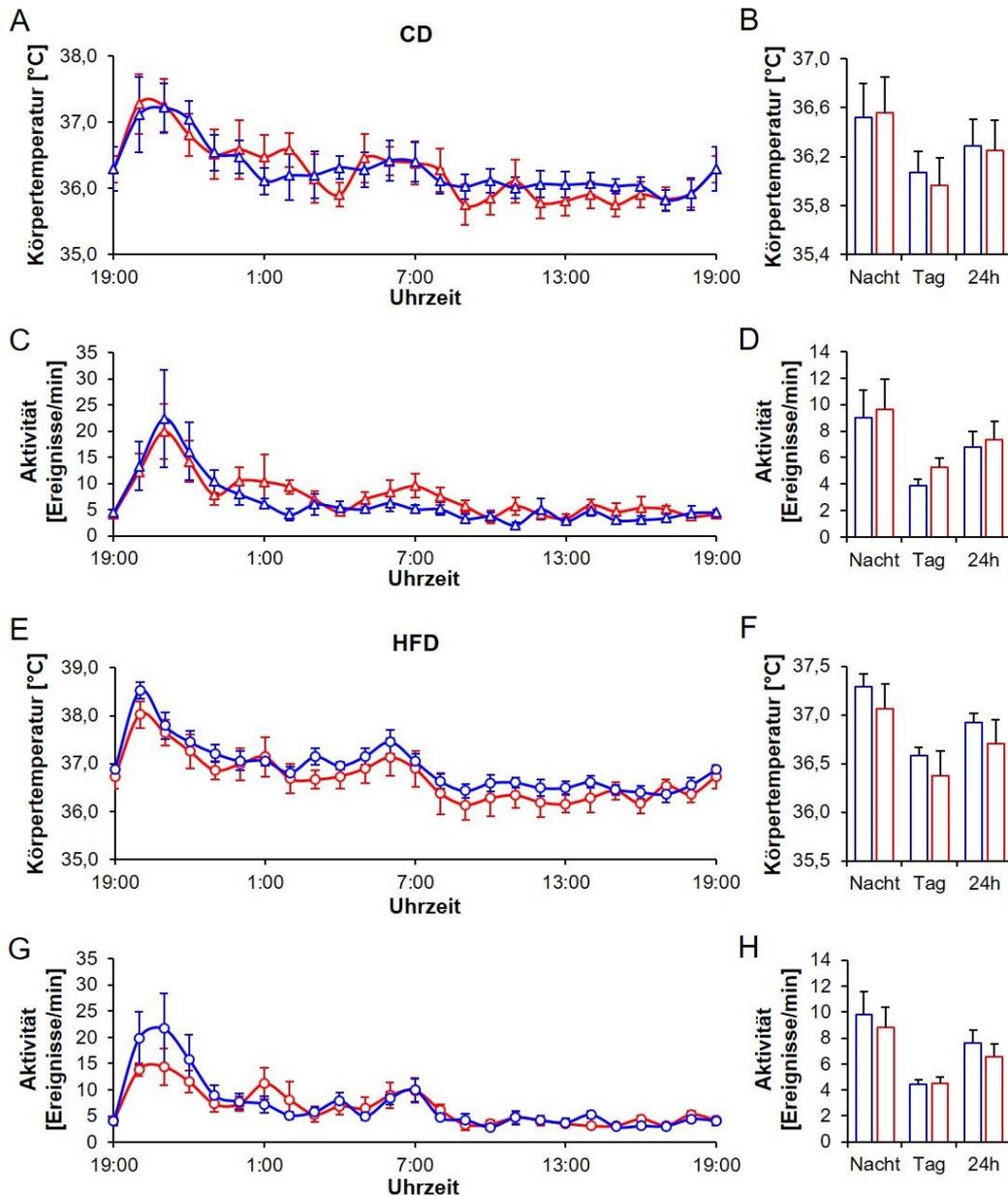
### Suppl. Abb. 7: Absolutes Körpergewicht und Tibiallänge von adipoBK nach CD oder HFD

**(A)** Zunahme des absoluten Körpergewichts unter Kontrolldiät (CD, offene Symbole) unterscheidet sich nicht zwischen Adipozyten-spezifischen BK-Kanal-Knockout Tieren (adipoBK<sup>L2/L1</sup>, rot, n=16) gegenüber Wildtyp-Kontrollen (adipoBK<sup>L2/+</sup>, blau, n=20). Unter Hochfettdiät (HFD, gefüllte Symbole) ist die Gewichtszunahme in adipoBK<sup>L2/+</sup> (n=18) signifikant erhöht gegenüber adipoBK<sup>L2/L1</sup> (n=21). **(B)** Die Tibiallänge der Genotypen unterscheidet sich unter keiner Diät. **(A, B)** Die Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*\*  $p < 0,01$ .



### Suppl. Abb. 8: Ablation des BK-Kanals in Adipozyten als Therapieoption bei bestehender Adipositas

Untersuchung der Auswirkung einer späten (Woche 19-20) Deletion des BK-Kanals in Adipozyten durch Tamoxifen-Injektion, auf die Entwicklung von Körpergewicht und Fettmassen in Kontrolltieren (adipoBK<sup>L2/+</sup>) und Adipozyten-spezifischen BK-Knockout-Tieren (adipoBK<sup>L2/L1</sup>) bei Hochfettdiät (HFD)-Fütterung. **(A)** Das Gewicht von braunem Fettgewebe (BAT), mesenterischem Fett (mWAT), und Leistenfett (iWAT), normiert auf die Tibiallänge (TL), ist in adipoBK<sup>L2/L1</sup> (rot, n=22) signifikant verringert gegenüber adipoBK<sup>L2/+</sup> (blau, n=14). In interscapularem Fett (intWAT), perirenalem Fett (pWAT) sowie der Summe der untersuchten Fettdepots (gesamt) ist ebenfalls eine tendenzielle Reduktion der Fettmasse in adipoBK<sup>L2/L1</sup> zu beobachten. **(B)** Der prozentuale Anstieg des Körpergewichtes über den Versuchszeitraum ist in adipoBK<sup>L2/L1</sup> vermindert. **(C)** Die beiden Genotypen zeigen keine Unterschiede hinsichtlich der Tibiallänge. **(A-C)** Die Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). \*  $p < 0,05$ .



**Suppl. Abb. 9: Telemetrische Erfassung von Körpertemperatur und lokomotorischer Aktivität in adipoBK-Tieren**

Mittels telemetrischer Messung erfasste Körpertemperatur und lokomotorische Aktivität von 10-12 Wochen alten Adipozyten-spezifischen BK-Kanal-Knockout Mäusen ( $adipoBK^{L2/L1}$ ) und Wildtyp-Kontrollen ( $adipoBK^{L2/+}$ ) unter Kontrolldiät (CD, offene Dreiecke) und Hochfettdiät (HFD, offene Kreise). Die Haltung der Tiere erfolgt innerhalb eines 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (7h-19h). **(A)** Darstellung der Körpertemperatur im Tagesprofil unter CD zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen  $adipoBK^{L2/+}$  (blau,  $n=6$ ) und  $adipoBK^{L2/L1}$  (rot,  $n=6$ ). **(B)** Die gemittelte Körpertemperatur über Nacht (19h-7h), Tag (7h-19h) oder 24h (7h-7h) ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Genotypen. **(C)** Die Aktivität der Tiere im Tagesverlauf unterscheidet sich zwischen  $adipoBK^{L2/L1}$  und  $adipoBK^{L2/+}$  nicht. **(D)** Auch die gemittelte Aktivität während der Nacht, dem Tag oder innerhalb 24h ist nicht verschieden. **(E)** Darstellung der Körpertemperatur im Tagesprofil unter HFD zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen  $adipoBK^{L2/+}$  (blau,  $n=6$ ) und  $adipoBK^{L2/L1}$  (rot,  $n=6$ ). **(F)** Die gemittelte Körpertemperatur über Nacht (19h-7h), Tag (7h-19h) oder 24h (7h-7h) ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Genotypen. Die Aktivität der  $adipoBK^{L2/L1}$ - und  $adipoBK^{L2/+}$ -Tiere unterscheidet sich im Tagesverlauf **(G)** genauso wenig, wie die gemittelte Aktivität **(H)** während der Nacht, dem Tag oder innerhalb 24h. **(A-H)** Abbildungen zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM).

## 8 Literaturverzeichnis

- Abriel H, Rougier JS, Jalife J** (2015) Ion Channel Macromolecular Complexes in Cardiomyocytes: Roles in Sudden Cardiac Death. *Circulation research* 116:1971-1988.
- Adrian TE, Bloom SR, Bryant MG, Polak JM, Heitz PH, Barnes AJ** (1976) Distribution and release of human pancreatic polypeptide. *Gut* 17:940-944.
- Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR** (1985) Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology* 89:1070-1077.
- Ahima RS, Osei SY** (2008) Adipokines in obesity. *Frontiers of hormone research* 36:182-197.
- Ahima RS, Lazar MA** (2008) Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Molecular endocrinology* 22:1023-1031.
- Ahmad S, Varga TV, Franks PW** (2013) Gene x environment interactions in obesity: the state of the evidence. *Human heredity* 75:106-115.
- Ahmed K, Tunaru S, Tang C, Muller M, Gille A, Sassmann A, Hanson J, Offermanns S** (2010) An Autocrine Lactate Loop Mediates Insulin-Dependent Inhibition of Lipolysis through GPR81. *Cell metabolism* 11:311-319.
- Akagiri S, Naito Y, Ichikawa H, Mizushima K, Takagi T, Handa O, Kokura S, Yoshikawa T** (2008) Bofutsushosan, an Oriental Herbal Medicine, Attenuates the Weight Gain of White Adipose Tissue and the Increased Size of Adipocytes Associated with the Increase in Their Expression of Uncoupling Protein 1 in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta mice. *J Clin Biochem Nutr* 42:158-166.
- Alioua A, Huggins JP, Rousseau E** (1995) PKG-I alpha phosphorylates the alpha-subunit and upregulates reconstituted GKCa channels from tracheal smooth muscle. *The American journal of physiology* 268:L1057-1063.
- Alioua A, Mahajan A, Nishimaru K, Zarei MM, Stefani E, Toro L** (2002) Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:14560-14565.
- Alioua A, Tanaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L** (1998) The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K<sup>+</sup> channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *The Journal of biological chemistry* 273:32950-32956.
- Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K** (1996) The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 20:501-506.
- Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ** (2002) The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. *Biochemical and biophysical research communications* 293:1145-1152.
- Arnoldussen IA, Kiliaan AJ, Gustafson DR** (2014) Obesity and dementia: adipokines interact with the brain. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 24:1982-1999.
- Arumugam M et al.** (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174-180.
- Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Ueno N, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Niijima A, Meguid MM, Kasuga M** (2003) Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology* 124:1325-1336.
- Ashby D, Bloom SR** (2007) Recent progress in PYY research--an update report for 8th NPY meeting. *Peptides* 28:198-202.
- Ashcroft FM** (1988) Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annual review of neuroscience* 11:97-118.
- Atit R, Sgaier SK, Mohamed OA, Taketo MM, Dufort D, Joyner AL, Niswander L, Conlon RA** (2006) Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Developmental biology* 296:164-176.

- Avdonin V, Tang XD, Hoshi T** (2003) Stimulatory action of internal protons on Slo1 BK channels. *Biophysical journal* 84:2969-2980.
- Ayala JE, Bracy DP, Julien BM, Rottman JN, Fueger PT, Wasserman DH** (2007) Chronic treatment with sildenafil improves energy balance and insulin action in high fat-fed conscious mice. *Diabetes* 56:1025-1033.
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI** (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307:1915-1920.
- Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI** (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15718-15723.
- Bado A, Lévassieur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ** (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature* 394:790-793.
- Balderas E, Zhang J, Stefani E, Toro L** (2015) Mitochondrial BKCa channel. *Frontiers in physiology* 6:104.
- Balland E, Cowley MA** (2015) New insights in leptin resistance mechanisms in mice. *Frontiers in neuroendocrinology* 39:59-65.
- Bao G, de Jong D, Alevra M, Schild D** (2015) Ca<sup>2+</sup>/BK channel clusters in olfactory receptor neurons and their role in odor coding. *The European journal of neuroscience*.
- Baratta M** (2002) Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 8:RA282-292.
- Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S** (2010) The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 298:E1244-1253.
- Barlow GM, Yu A, Mathur R** (2015) Role of the Gut Microbiome in Obesity and Diabetes Mellitus. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 30:787-797.
- Barrachina MD, Martinez V, Wang L, Wei JY, Tache Y** (1997) Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:10455-10460.
- Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmuller A, Gordts PL, Rinninger F, Bruegelmann K, Freund B, Nielsen P, Merkel M, Heeren J** (2011) Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature medicine* 17:200-205.
- Baskaran P, Krishnan V, Ren J, Thyagarajan B** (2016) Capsaicin induces browning of white adipose tissue and counters obesity by activating TRPV1 channel-dependent mechanisms. *British journal of pharmacology* 173:2369-2389.
- Beatty AL, Zhang MH, Ku IA, Na B, Schiller NB, Whooley MA** (2012) Adiponectin is associated with increased mortality and heart failure in patients with stable ischemic heart disease: data from the Heart and Soul Study. *Atherosclerosis* 220:587-592.
- Behrens R, Nolting A, Reimann F, Schwarz M, Waldschutz R, Pongs O** (2000) hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS letters* 474:99-106.
- Berger NA** (2014) Obesity and cancer pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1311:57-76.
- Bergstrom RW, Newell-Morris LL, Leonetti DL, Shuman WP, Wahl PW, Fujimoto WY** (1990) Association of elevated fasting C-peptide level and increased intra-abdominal fat distribution with development of NIDDM in Japanese-American men. *Diabetes* 39:104-111.
- Berkefeld H, Sailer CA, Bildl W, Rohde V, Thumfart JO, Eble S, Klugbauer N, Reisinger E, Bischofberger J, Oliver D, Knaus HG, Schulte U, Fakler B** (2006) BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> signaling. *Science* 314:615-620.

- Bernardis LL, Bellinger LL** (1987) The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain research* 434:321-381.
- Beurg M, Hafidi A, Skinner LJ, Ruel J, Nouvian R, Henaff M, Puel JL, Aran JM, Dulon D** (2005) Ryanodine receptors and BK channels act as a presynaptic depressor of neurotransmission in cochlear inner hair cells. *The European journal of neuroscience* 22:1109-1119.
- Bishnoi M, Kondepudi KK, Gupta A, Karmase A, Boparai RK** (2013) Expression of multiple Transient Receptor Potential channel genes in murine 3T3-L1 cell lines and adipose tissue. *Pharmacol Rep* 65:751-755.
- Bonfanti DH, Alcazar LP, Arakaki PA, Martins LT, Agustini BC, de Moraes Rego FG, Frigeri HR** (2015) ATP-dependent potassium channels and type 2 diabetes mellitus. *Clinical biochemistry* 48:476-482.
- Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessi-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, Collins S** (2012) Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *The Journal of clinical investigation* 122:1022-1036.
- Bouchard C** (1991) Current understanding of the etiology of obesity: genetic and nongenetic factors. *The American journal of clinical nutrition* 53:1561S-1565S.
- Bouchard C, Perusse L, Leblanc C, Tremblay A, Theriault G** (1988) Inheritance of the amount and distribution of human body fat. *Int J Obes* 12:205-215.
- Boutin P, Froguel P** (2001) Genetics of human obesity. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 15:391-404.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.
- Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y, Aldrich RW** (2000) Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. *The Journal of biological chemistry* 275:6453-6461.
- Broadwell RD, Brightman MW** (1976) Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *The Journal of comparative neurology* 166:257-283.
- Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt C, Blouin R, Bordignon V, Murphy BD, Palin MF** (2010) Adiponectin action from head to toe. *Endocrine* 37:11-32.
- Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, Martines D** (2007) Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 292:G518-525.
- Buchner DA, Geisinger JM, Glazebrook PA, Morgan MG, Spiezio SH, Kaiyala KJ, Schwartz MW, Sakurai T, Furley AJ, Kunze DL, Croniger CM, Nadeau JH** (2012) The juxtapanodal proteins CNTNAP2 and TAG1 regulate diet-induced obesity. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 23:431-442.
- Budworth J, Meillerais S, Charles I, Powell K** (1999) Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochemical and biophysical research communications* 263:696-701.
- Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC** (2007) High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 15:798-808.
- Burnett MA, Del Vecchio M, Bown E, O'Rahilly S, Turner RC** (1987) Normal calcium-activated potassium channel in red cells in type 2 diabetes. *Diabetes research* 5:19-21.
- Cai TQ, Ren N, Jin L, Cheng K, Kash S, Chen RP, Wright SD, Taggart AKP, Waters MG** (2008) Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochemical and biophysical research communications* 377:987-991.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P** (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-549.
- Cannon B, Nedergaard J** (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews* 84:277-359.

- Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, Floering LM, Spiegelman BM, Collins S** (2004) p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Molecular and cellular biology* 24:3057-3067.
- Carmen GY, Victor SM** (2006) Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cellular signalling* 18:401-408.
- Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlsson P, Enerback S** (2001) FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* 106:563-573.
- Chaudhri OB, Wynne K, Bloom SR** (2008a) Can gut hormones control appetite and prevent obesity? *Diabetes care* 31 Suppl 2:S284-289.
- Chaudhri OB, Field BC, Bloom SR** (2008b) Gastrointestinal satiety signals. *International journal of obesity* 32 Suppl 7:S28-31.
- Chaudhri OB, Salem V, Murphy KG, Bloom SR** (2008c) Gastrointestinal satiety signals. *Annual review of physiology* 70:239-255.
- Chavis P, Ango F, Michel JM, Bockaert J, Fagni L** (1998) Modulation of big K<sup>+</sup> channel activity by ryanodine receptors and L-type Ca<sup>2+</sup> channels in neurons. *The European journal of neuroscience* 10:2322-2327.
- Che H, Yue J, Tse HF, Li GR** (2014) Functional TRPV and TRPM channels in human preadipocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 466:947-959.
- Chen BY, Tie R, Qu P, Zhu MZ, Zhu XX, Jin J, Yu J** (2011) Vasonatin peptide, a new regulator of adiponectin and interleukin-6 production in adipocytes. *Journal of endocrinological investigation* 34:742-746.
- Chen L, Tuo B, Dong H** (2016) Regulation of Intestinal Glucose Absorption by Ion Channels and Transporters. *Nutrients* 8.
- Chen M, Petkov GV** (2009) Identification of large conductance calcium activated potassium channel accessory beta4 subunit in rat and mouse bladder smooth muscle. *The Journal of urology* 182:374-381.
- Chen Z, Guo L, Zhang Y, Walzem RL, Pendergast JS, Printz RL, Morris LC, Matafonova E, Stien X, Kang L, Coulon D, McGuinness OP, Niswender KD, Davies SS** (2014) Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity. *The Journal of clinical investigation* 124:3391-3406.
- Chomczynski P, Sacchi N** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162:156-159.
- Clapham DE** (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047-1058.
- Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Batterham RL, Park A, Patterson M, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR** (2003) Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:4696-4701.
- Cohen P, Spiegelman BM** (2015) Brown and Beige Fat: Molecular Parts of a Thermogenic Machine. *Diabetes* 64:2346-2351.
- Cohen P et al.** (2014) Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 156:304-316.
- Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH, Arky RA, Speizer FE** (1990) Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. *American journal of epidemiology* 132:501-513.
- Colombo G, Colombo MD, Schiavon Lde L, d'Acampora AJ** (2013) Phosphodiesterase 5 as target for adipose tissue disorders. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 35:186-192.
- Combe H, Vol S, Thevenot A, Lasfargues G, Caces E, Tichet J, Lecomte P** (2004) Comparison of men with impaired fasting glycaemia to controls and to diabetic subjects with fasting glycaemia from 7.0 to 7.7 mmol/l: clinical, nutritional and biological status. *Diabetes & metabolism* 30:167-174.

- Contreras GF, Neely A, Alvarez O, Gonzalez C, Latorre R** (2012) Modulation of BK channel voltage gating by different auxiliary beta subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:18991-18996.
- Cook DL, Satin LS, Ashford ML, Hales CN** (1988) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes* 37:495-498.
- Cooke D, Bloom S** (2006) The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nature reviews Drug discovery* 5:919-931.
- Crowson CS, Matteson EL, Davis JM, 3rd, Gabriel SE** (2013) Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis. *Arthritis care & research* 65:71-77.
- Cui J, Cox DH, Aldrich RW** (1997) Intrinsic voltage dependence and Ca<sup>2+</sup> regulation of mslo large conductance Ca-activated K<sup>+</sup> channels. *The Journal of general physiology* 109:647-673.
- Cui J, Yang H, Lee US** (2009) Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66:852-875.
- Cummings DE, Overduin J** (2007) Gastrointestinal regulation of food intake. *The Journal of clinical investigation* 117:13-23.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS** (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-1719.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR** (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* 360:1509-1517.
- Cypess AM et al.** (2013) Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nature medicine* 19:635-639.
- Daïen CI, Sellam J** (2015) Obesity and inflammatory arthritis: impact on occurrence, disease characteristics and therapeutic response. *RMD open* 1:e000012.
- Dakin CL, Gunn I, Small CJ, Edwards CM, Hay DL, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR** (2001) Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. *Endocrinology* 142:4244-4250.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M** (2000) Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255-4261.
- Day JW et al.** (2009) A new glucagon and GLP-1 co-agonist eliminates obesity in rodents. *Nature chemical biology* 5:749-757.
- de Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, Glynn NM, Yu DZ, Pray J, Ndubuizu K, Patil S, Schwartz A, Kligman M, Fried SK, Gong DW, Shuldiner AR, Pollin TI, McLenithan JC** (2007) Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* 56:1655-1661.
- Deacon CF** (2004) Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 36:761-765.
- Despres JP, Lemieux I, Prud'homme D** (2001) Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *Bmj* 322:716-720.
- Dichter MA** (1989) Cellular mechanisms of epilepsy and potential new treatment strategies. *Epilepsia* 30 Suppl 1:S3-12; discussion S64-18.
- Diez JJ, Iglesias P** (2003) The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148:293-300.
- Djouder N, Tuerk RD, Suter M, Salvioni P, Thali RF, Scholz R, Vaahromeri K, Auchli Y, Rechsteiner H, Brunisholz RA, Viollet B, Makela TP, Wallimann T, Neumann D, Krek W** (2010) PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis. *The EMBO journal* 29:469-481.
- Dostalova I, Smitka K, Papezova H, Kvasnickova H, Nedvidkova J** (2006) [The role of adiponectin in increased insulin sensitivity of patients with anorexia nervosa]. *Vnitřní lékařství* 52:887-890.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R** (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.

- Du W, Bautista JF, Yang H, Diez-Sampedro A, You SA, Wang L, Kotagal P, Luders HO, Shi J, Cui J, Richerson GB, Wang QK** (2005) Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nature genetics* 37:733-738.
- Dufer M, Neye Y, Horth K, Krippeit-Drews P, Hennige A, Widmer H, McClafferty H, Shipston MJ, Haring HU, Ruth P, Drews G** (2011) BK channels affect glucose homeostasis and cell viability of murine pancreatic beta cells. *Diabetologia* 54:423-432.
- Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK** (2009) The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 58:727-736.
- Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK** (1999) Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23:775-786.
- Enerback S** (2010) Human brown adipose tissue. *Cell metabolism* 11:248-252.
- Evanson KW, Bannister JP, Leo MD, Jaggar JH** (2014) LRRRC26 is a functional BK channel auxiliary gamma subunit in arterial smooth muscle cells. *Circulation research* 115:423-431.
- Fadool DA, Tucker K, Pedarzani P** (2011) Mitral cells of the olfactory bulb perform metabolic sensing and are disrupted by obesity at the level of the Kv1.3 ion channel. *PLoS one* 6:e24921.
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW** (2004) Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145:2273-2282.
- Fakler B, Adelman JP** (2008) Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. *Neuron* 59:873-881.
- Famulla S, Lamers D, Hartwig S, Passlack W, Horrigs A, Cramer A, Lehr S, Sell H, Eckel J** (2011) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is one of the most abundant proteins secreted by human adipocytes and induces insulin resistance and inflammatory signaling in muscle and fat cells. *International journal of obesity* 35:762-772.
- Farmer SR** (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism* 4:263-273.
- Farooqi IS** (2008) Monogenic human obesity. *Frontiers of hormone research* 36:1-11.
- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S** (2003) Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *The New England journal of medicine* 348:1085-1095.
- Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S** (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *The New England journal of medicine* 341:879-884.
- Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R** (2002) Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 290:1084-1089.
- Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y** (2012) Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* 151:400-413.
- Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J** (2009) UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell metabolism* 9:203-209.
- Feng B, Zhang T, Xu HY** (2013) Human adipose dynamics and metabolic health. *Ann Ny Acad Sci* 1281:160-177.
- Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE** (2012) The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *British journal of pharmacology* 166:510-521.
- Fernandez-Fernandez JM, Andrade YN, Arniges M, Fernandes J, Plata C, Rubio-Moscardo F, Vazquez E, Valverde MA** (2008) Functional coupling of TRPV4 cationic channel and large conductance, calcium-dependent potassium channel in human bronchial epithelial cell lines. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 457:149-159.
- Findlay I, Dunne MJ, Petersen OH** (1985) High-conductance K<sup>+</sup> channel in pancreatic islet cells can be activated and inactivated by internal calcium. *The Journal of membrane biology* 83:169-175.

- Flachs P, Rossmeisl M, Kuda O, Kopecky J** (2013) Stimulation of mitochondrial oxidative capacity in white fat independent of UCP1: a key to lean phenotype. *Biochimica et biophysica acta* 1831:986-1003.
- Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI** (2013) Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *Jama* 309:71-82.
- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S** (2007) Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56:1010-1013.
- Forbes GB, Sauer EP, Weitkamp LR** (1995) Lean body mass in twins. *Metabolism: clinical and experimental* 44:1442-1446.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D** (2010) cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacological reviews* 62:525-563.
- Friebe A, Koesling D** (2009) The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 21:149-156.
- Friedman J** (2014) 20 years of leptin: leptin at 20: an overview. *The Journal of endocrinology* 223:T1-8.
- Friedman JM** (2003) A war on obesity, not the obese. *Science* 299:856-858.
- Frontini A, Cinti S** (2010) Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell metabolism* 11:253-256.
- Garcia-Calvo M, Knaus HG, McManus OB, Giangiacomo KM, Kaczorowski GJ, Garcia ML** (1994) Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *The Journal of biological chemistry* 269:676-682.
- Geary N, Kissileff HR, Pi-Sunyer FX, Hinton V** (1992) Individual, but not simultaneous, glucagon and cholecystokinin infusions inhibit feeding in men. *The American journal of physiology* 262:R975-980.
- Ghatei MA, Uttenthal LO, Christofides ND, Bryant MG, Bloom SR** (1983) Molecular forms of human enteroglucagon in tissue and plasma: plasma responses to nutrient stimuli in health and in disorders of the upper gastrointestinal tract. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 57:488-495.
- Gibbs J, Young RC, Smith GP** (1973) Cholecystokinin decreases food intake in rats. *Journal of comparative and physiological psychology* 84:488-495.
- Gnad T et al.** (2014) Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A receptors. *Nature*.
- Golowasch J, Kirkwood A, Miller C** (1986) Allosteric effects of Mg<sup>2+</sup> on the gating of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from mammalian skeletal muscle. *The Journal of experimental biology* 124:5-13.
- Gonzalez-Perez V, Xia XM, Lingle CJ** (2015) Two classes of regulatory subunits coassemble in the same BK channel and independently regulate gating. *Nature communications* 6:8341.
- Gonzalez JA, Reimann F, Burdakov D** (2009) Dissociation between sensing and metabolism of glucose in sugar sensing neurones. *The Journal of physiology* 587:41-48.
- Grabauskas G, Wu X, Lu Y, Heldsinger A, Song I, Zhou SY, Owyang C** (2015) KATP channels in the nodose ganglia mediate the orexigenic actions of ghrelin. *The Journal of physiology* 593:3973-3989.
- Gribkoff VK, Starrett JE, Jr., Dworetzky SI** (2001) Maxi-K potassium channels: form, function, and modulation of a class of endogenous regulators of intracellular calcium. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 7:166-177.
- Gustafson D, Rothenberg E, Blennow K, Steen B, Skoog I** (2003) An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Archives of internal medicine* 163:1524-1528.
- Gustafson RH, Bowen RE** (1997) Antibiotic use in animal agriculture. *Journal of applied microbiology* 83:531-541.
- Ha TS, Heo MS, Park CS** (2004) Functional effects of auxiliary beta4-subunit on rat large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel. *Biophysical journal* 86:2871-2882.

- Haas B, Mayer P, Jennissen K, Scholz D, Berriel Diaz M, Bloch W, Herzig S, Fassler R, Pfeifer A** (2009) Protein kinase G controls brown fat cell differentiation and mitochondrial biogenesis. *Science signaling* 2:ra78.
- Hagan JJ et al.** (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:10911-10916.
- Hagan S, Niswender KD** (2012) Neuroendocrine regulation of food intake. *Pediatric blood & cancer* 58:149-153.
- Hainer V, Aldhoon-Hainerova I** (2013) Obesity paradox does exist. *Diabetes care* 36 Suppl 2:S276-281.
- Hansen LK** (2014) The role of T cell potassium channels, KV1.3 and KCa3.1, in the inflammatory cascade in ulcerative colitis. *Danish medical journal* 61:B4946.
- Harkins JM, Moustaid-Moussa N, Chung YJ, Penner KM, Pestka JJ, North CM, Claycombe KJ** (2004) Expression of interleukin-6 is greater in preadipocytes than in adipocytes of 3T3-L1 cells and C57BL/6J and ob/ob mice. *The Journal of nutrition* 134:2673-2677.
- Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, Byrd-Holt DD** (1998) Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes care* 21:518-524.
- Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ** (2001) The biology of white adipocyte proliferation. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2:239-254.
- Havrankova J, Mate R, Belanger R, D'Amour P, Ste-Marie LG, Petit JL** (1987) [Non-insulin-dependent diabetes in obesity (type IIB): study of insulin secretion, insulin receptors and response to low-calorie diet]. *L'union medicale du Canada* 116:337-341.
- Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, Kuroda Y** (1998) Effect of acidosis on Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 436:509-514.
- Hdud IM, Mobasheri A, Loughna PT** (2014a) Effects of cyclic equibiaxial mechanical stretch on alpha-BK and TRPV4 expression in equine chondrocytes. *Springerplus* 3:59.
- Hdud IM, Mobasheri A, Loughna PT** (2014b) Effect of osmotic stress on the expression of TRPV4 and BKCa channels and possible interaction with ERK1/2 and p38 in cultured equine chondrocytes. *American journal of physiology Cell physiology* 306:C1050-1057.
- Heaton JM** (1972) The distribution of brown adipose tissue in the human. *Journal of anatomy* 112:35-39.
- Hedekov CJ** (1980) Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiological reviews* 60:442-509.
- Helge JW, Stallknecht B, Pedersen BK, Galbo H, Kiens B, Richter EA** (2003) The effect of graded exercise on IL-6 release and glucose uptake in human skeletal muscle. *The Journal of physiology* 546:299-305.
- Herrera GM, Nelson MT** (2002) Differential regulation of SK and BK channels by Ca(2+) signals from Ca(2+) channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes. *The Journal of physiology* 541:483-492.
- Herrera GM, Heppner TJ, Nelson MT** (2000) Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 279:R60-68.
- Herrera GM, Etherton B, Nausch B, Nelson MT** (2005) Negative feedback regulation of nerve-mediated contractions by KCa channels in mouse urinary bladder smooth muscle. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 289:R402-R409.
- Hodgkin AL, Keynes RD** (1955) The potassium permeability of a giant nerve fibre. *The Journal of physiology* 128:61-88.
- Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J** (2000) Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of cell science* 113 ( Pt 10):1671-1676.

- Holst JJ** (2004) On the physiology of GIP and GLP-1. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 36:747-754.
- Holst JJ** (2007) The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological reviews* 87:1409-1439.
- Horrigan FT, Aldrich RW** (1999) Allosteric voltage gating of potassium channels II - mSlo channel gating charge movement in the absence of Ca<sup>2+</sup>. *Journal of General Physiology* 114:305-336.
- Horrigan FT, Heinemann SH, Hoshi T** (2005) Heme regulates allosteric activation of the Slo1 BK channel. *The Journal of general physiology* 126:7-21.
- Hoshi T, Tian Y, Xu R, Heinemann SH, Hou S** (2013) Mechanism of the modulation of BK potassium channel complexes with different auxiliary subunit compositions by the omega-3 fatty acid DHA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:4822-4827.
- Hosoda H, Kojima M, Kangawa K** (2006) Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Journal of pharmacological sciences* 100:398-410.
- Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y** (2001) Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50:1126-1133.
- Hou S, Heinemann SH, Hoshi T** (2009) Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules. *Physiology* 24:26-35.
- Hou S, Xu R, Heinemann SH, Hoshi T** (2008) Reciprocal regulation of the Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> sensitivity in the SLO1 BK channel conferred by the RCK1 domain. *Nature structural & molecular biology* 15:403-410.
- Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatgei MA, Ritter MA, Lechler RI, Bloom SR** (1999) Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *The Journal of clinical investigation* 104:1051-1059.
- Hristov KL, Afeli SA, Parajuli SP, Cheng Q, Rovner ES, Petkov GV** (2013) Neurogenic detrusor overactivity is associated with decreased expression and function of the large conductance voltage- and Ca(2+)-activated K(+) channels. *PloS one* 8:e68052.
- Hu H, He ML, Tao R, Sun HY, Hu R, Zang WJ, Yuan BX, Lau CP, Tse HF, Li GR** (2009) Characterization of Ion Channels in Human Preadipocytes. *Journal of cellular physiology* 218:427-435.
- Huttunen P, Hirvonen J, Kinnula V** (1981) The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 46:339-345.
- Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Baik HW, Ha J, Park OJ** (2005) Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochemical and biophysical research communications* 338:694-699.
- Hypponen E, Virtanen SM, Kenward MG, Knip M, Akerblom HK, Childhood Diabetes in Finland Study G** (2000) Obesity, increased linear growth, and risk of type 1 diabetes in children. *Diabetes care* 23:1755-1760.
- Hyson DA, Thomson AB, Kappagoda CT** (1996) Calcium channel blockers modify jejunal uptake of D-galactose in rabbits. *Digestive diseases and sciences* 41:1871-1875.
- Igel M, Becker W, Herberg L, Joost HG** (1997) Hyperleptinemia, leptin resistance, and polymorphic leptin receptor in the New Zealand obese mouse. *Endocrinology* 138:4234-4239.
- Igel M, Lindenthal B, Giesa U, von BK** (2002) Evidence that leptin contributes to intestinal cholesterol absorption in obese (ob/ob) mice and wild-type mice. *Lipids* 37:153-157.
- Isaacson JS, Murphy GJ** (2001) Glutamate-mediated extrasynaptic inhibition: direct coupling of NMDA receptors to Ca(2+)-activated K+ channels. *Neuron* 31:1027-1034.
- Jacobowitz DM, O'Donohue TL** (1978) alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:6300-6304.
- Jagger JH, Porter VA, Lederer WJ, Nelson MT** (2000) Calcium sparks in smooth muscle. *American journal of physiology Cell physiology* 278:C235-256.

- Jaggar JH, Leffler CW, Cheranov SY, Tcheranova D, E S, Cheng X** (2002) Carbon monoxide dilates cerebral arterioles by enhancing the coupling of Ca<sup>2+</sup> sparks to Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Circulation research* 91:610-617.
- Jeandel L, Okamura H, Belles-Isles M, Chabot JG, Dihl F, Morel G, Kelly PA, Heisler S** (1989) Immunocytochemical localization, binding, and effects of atrial natriuretic peptide in rat adipocytes. *Molecular and cellular endocrinology* 62:69-78.
- Jenkinson DH** (2006) Potassium channels--multiplicity and challenges. *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1:S63-71.
- Jennissen K, Siegel F, Liebig-Gonglach M, Hermann MR, Kipschull S, van Dooren S, Kunz WS, Fassler R, Pfeifer A** (2012) A VASP-Rac-soluble guanylyl cyclase pathway controls cGMP production in adipocytes. *Science signaling* 5:ra62.
- Jensen B, Farach-Carson MC, Kenaley E, Akanbi KA** (2004) High extracellular calcium attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Experimental cell research* 301:280-292.
- Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Daugaard S, Homoe P, Loft A, de Jong J, Mathur N, Cannon B, Nedergaard J, Pedersen BK, Moller K, Scheele C** (2013) A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell metabolism* 17:798-805.
- Jiang Z, Wallner M, Meera P, Toro L** (1999) Human and rodent MaxiK channel beta-subunit genes: cloning and characterization. *Genomics* 55:57-67.
- Jiao H, Arner P, Hoffstedt J, Brodin D, Dubern B, Czernichow S, van't Hooft F, Axelsson T, Pedersen O, Hansen T, Sorensen TI, Hebebrand J, Kere J, Dahlman-Wright K, Hamsten A, Clement K, Dahlman I** (2011) Genome wide association study identifies KCNMA1 contributing to human obesity. *BMC medical genomics* 4:51.
- Johnson TR, Mann BE, Clark JE, Foresti R, Green CJ, Motterlini R** (2003) Metal carbonyls: a new class of pharmaceuticals? *Angewandte Chemie* 42:3722-3729.
- Johnston SL, Souter DM, Tolkamp BJ, Gordon IJ, Illius AW, Kyriazakis I, Speakman JR** (2007) Intake compensates for resting metabolic rate variation in female C57BL/6J mice fed high-fat diets. *Obesity* 15:600-606.
- Jones SF, Brito V, Ghamande S** (2015) Obesity hypoventilation syndrome in the critically ill. *Critical care clinics* 31:419-434.
- Kaczmarek LK** (2013) Slack, Slick and Sodium-Activated Potassium Channels. *ISRN neuroscience* 2013.
- Kaczorowski GJ, Garcia ML** (1999) Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Current opinion in chemical biology* 3:448-458.
- Kanaya AM, Barrett-Connor E, Gildengorin G, Yaffe K** (2004) Change in cognitive function by glucose tolerance status in older adults: a 4-year prospective study of the Rancho Bernardo study cohort. *Archives of internal medicine* 164:1327-1333.
- Kaneko Y, Ishikawa T, Amano S, Nakayama K** (2003) Dual effect of nitric oxide on cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *American journal of physiology Cell physiology* 284:C1215-1222.
- Kibirige M, Metcalf B, Renuka R, Wilkin TJ** (2003) Testing the accelerator hypothesis: the relationship between body mass and age at diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes care* 26:2865-2870.
- Kiemer AK, Weber NC, Furst R, Bildner N, Kulhanek-Heinze S, Vollmar AM** (2002) Inhibition of p38 MAPK activation via induction of MKP-1: atrial natriuretic peptide reduces TNF-alpha-induced actin polymerization and endothelial permeability. *Circulation research* 90:874-881.
- Kim GW, Lin JE, Blomain ES, Waldman SA** (2014) Antiobesity pharmacotherapy: new drugs and emerging targets. *Clinical pharmacology and therapeutics* 95:53-66.
- Kishore P, Boucai L, Zhang K, Li W, Koppaka S, Kehlenbrink S, Schiwiek A, Esterson YB, Mehta D, Bursheh S, Su Y, Gutierrez-Juarez R, Muzumdar R, Schwartz GJ, Hawkins M** (2011) Activation of K(ATP) channels suppresses glucose production in humans. *The Journal of clinical investigation* 121:4916-4920.

- Kiskinis E, Hallberg M, Christian M, Olofsson M, Dilworth SM, White R, Parker MG** (2007) RIP140 directs histone and DNA methylation to silence Ucp1 expression in white adipocytes. *The EMBO journal* 26:4831-4840.
- Kissebah AH, Freedman DS, Peiris AN** (1989) Health risks of obesity. *The Medical clinics of North America* 73:111-138.
- Kissileff HR, Pi-Sunyer FX, Thornton J, Smith GP** (1981) C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *The American journal of clinical nutrition* 34:154-160.
- Klingenspor M, Herzig S, Pfeifer A** (2012) Brown fat develops a bright future. *Obesity facts* 5:890-896.
- Klingenspor M, Fromme T, Hughes DA, Jr., Manzke L, Polymeropoulos E, Riemann T, Trzcionka M, Hirschberg V, Jastroch M** (2008) An ancient look at UCP1. *Biochimica et biophysica acta* 1777:637-641.
- Kloukina V, Herzer S, Karlsson N, Perez M, Daraio T, Meister B** (2012) G-protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel 4 (GIRK4) immunoreactivity in chemically defined neurons of the hypothalamic arcuate nucleus that control body weight. *Journal of chemical neuroanatomy* 44:14-23.
- Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA** (2005) Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 146:3417-3427.
- Knights AJ, Funnell AP, Pearson RC, Crossley M, Bell-Anderson KS** (2014) Adipokines and insulin action: A sensitive issue. *Adipocyte* 3:88-96.
- Kotlikoff M, Hall I** (2003) Hypertension: beta testing. *The Journal of clinical investigation* 112:654-656.
- Koval OM, Fan Y, Rothberg BS** (2007) A role for the S0 transmembrane segment in voltage-dependent gating of BK channels. *The Journal of general physiology* 129:209-220.
- Kozak LP** (2010) Brown fat and the myth of diet-induced thermogenesis. *Cell metabolism* 11:263-267.
- Kuhre RE, Bechmann LE, Wewer Albrechtsen NJ, Hartmann B, Holst JJ** (2015) Glucose stimulates neurotensin secretion from the rat small intestine by mechanisms involving SGLT1 and GLUT2, leading to cell depolarization and calcium influx. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 308:E1123-1130.
- Lacquaniti A, Donato V, Chirico V, Buemi A, Buemi M** (2011) Obestatin: an interesting but controversial gut hormone. *Annals of nutrition & metabolism* 59:193-199.
- Latorre R, Brauchi S** (2006) Large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channel: activation by Ca<sup>2+</sup> and voltage. *Biological research* 39:385-401.
- Lavallard VJ, Gual P** (2014) Autophagy and non-alcoholic fatty liver disease. *BioMed research international* 2014:120179.
- Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT** (2006) Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* 21:69-78.
- Lee MH, Klein RL, El-Shewy HM, Luttrell DK, Luttrell LM** (2008) The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth. *Biochemistry* 47:11682-11692.
- Lee US, Cui J** (2009)  $\beta$  subunit-specific modulations of BK channel function by a mutation associated with epilepsy and dyskinesia. *The Journal of physiology* 587:1481-1498.
- Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG** (2012) In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell metabolism* 15:480-491.
- Lee YS** (2009) The role of genes in the current obesity epidemic. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 38:45-43.
- Leibowitz SF, Hammer NJ, Chang K** (1981) Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiology & behavior* 27:1031-1040.
- Lemieux S, Prud'homme D, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP** (1996) Anthropometric correlates to changes in visceral adipose tissue over 7 years in women. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 20:618-624.

- Leonardsson G, Steel JH, Christian M, Pocock V, Milligan S, Bell J, So PW, Medina-Gomez G, Vidal-Puig A, White R, Parker MG** (2004) Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:8437-8442.
- Leone DP, Genoud S, Atanasoski S, Grausenburger R, Berger P, Metzger D, Macklin WB, Chambon P, Suter U** (2003) Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Molecular and cellular neurosciences* 22:430-440.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI** (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444:1022-1023.
- Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI** (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11070-11075.
- Li F, Wang D, Zhou Y, Zhou B, Yang Y, Chen H, Song J** (2008a) Protein kinase A suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Cell research* 18:311-323.
- Li FY, Lam KS, Xu A** (2012a) Therapeutic perspectives for adiponectin: an update. *Current medicinal chemistry* 19:5513-5523.
- Li H, Zhou B, Xu L, Liu J, Zang W, Wu S, Sun H** (2014) Circulating PGRN is significantly associated with systemic insulin sensitivity and autophagic activity in metabolic syndrome. *Endocrinology* 155:3493-3507.
- Li N, Zhang D, Zhang J, Guo Y, Yan Z, Wang H, Zhou L, Hong J, Wang X, A Z** (2012b) Influence of age on the association of GIRK4 with metabolic syndrome. *Annals of clinical biochemistry* 49:369-376.
- Li Y, Hu H, Butterworth MB, Tian JB, Zhu MX, O'Neil RG** (2016) Expression of a Diverse Array of Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels (SK1/3, IK1, BK) that Functionally Couple to the Mechanosensitive TRPV4 Channel in the Collecting Duct System of Kidney. *PLoS one* 11:e0155006.
- Li YF, Zhuo YH, Bi WN, Bai YJ, Li YN, Wang ZJ** (2008b) Voltage-gated potassium channel Kv1.3 in rabbit ciliary epithelium regulates the membrane potential via coupling intracellular calcium. *Chinese medical journal* 121:2272-2277.
- Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA** (1985) Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *The Journal of clinical investigation* 75:1144-1152.
- Lin S, Boey D, Herzog H** (2004) NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides* 38:189-200.
- Liu G, Zakharov SI, Yang L, Deng SX, Landry DW, Karlin A, Marx SO** (2008a) Position and role of the BK channel alpha subunit S0 helix inferred from disulfide crosslinking. *Journal of General Physiology* 131:537-548.
- Liu G, Zakharov SI, Yang L, Deng SX, Landry DW, Karlin A, Marx SO** (2008b) Position and role of the BK channel alpha subunit S0 helix inferred from disulfide crosslinking. *The Journal of general physiology* 131:537-548.
- Liu L, Wang F, Lu H, Ren X, Zou J** (2014) Chromanol 293B, an inhibitor of KCNQ1 channels, enhances glucose-stimulated insulin secretion and increases glucagon-like peptide-1 level in mice. *Islets* 6:e962386.
- Lo KA, Sun L** (2013) Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes. *Bioscience reports* 33.
- Lu R, Alioua A, Kumar Y, Eghbali M, Stefani E, Toro L** (2006) MaxiK channel partners: physiological impact. *The Journal of physiology* 570:65-72.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA** (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological reviews* 52:375-414.
- Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS, Maratos-Flier E** (2001) Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 107:379-386.

- Ma S, Yu H, Zhao Z, Luo Z, Chen J, Ni Y, Jin R, Ma L, Wang P, Zhu Z, Li L, Zhong J, Liu D, Nilius B, Zhu Z** (2012) Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. *J Mol Cell Biol* 4:88-96.
- Ma Y, Gao M, Sun H, Liu D** (2015) Interleukin-6 gene transfer reverses body weight gain and fatty liver in obese mice. *Biochimica et biophysica acta* 1852:1001-1011.
- Maes HH, Neale MC, Eaves LJ** (1997) Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behavior genetics* 27:325-351.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al.** (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine* 1:1155-1161.
- Magleby KL** (2003) Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far. *The Journal of general physiology* 121:81-96.
- Mahajan R, Lau DH, Sanders P** (2015) Impact of obesity on cardiac metabolism, fibrosis, and function. *Trends in cardiovascular medicine* 25:119-126.
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore E** (1999) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *Journal of Biological Chemistry* 274:26691-26696.
- Marsh DJ et al.** (2002) Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:3240-3245.
- Martin JR, Novin D** (1977) Decreased feeding in rats following hepatic-portal infusion of glucagon. *Physiology & behavior* 19:461-466.
- Marty A, Neher E** (1985) Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of physiology* 367:117-141.
- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K** (1997) Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature medicine* 3:1029-1033.
- Matos JE, Sausbier M, Beranek G, Sausbier U, Ruth P, Leipziger J** (2007) Role of cholinergic-activated KCa1.1 (BK), KCa3.1 (SK4) and KV7.1 (KCNQ1) channels in mouse colonic Cl<sup>-</sup> secretion. *Acta physiologica* 189:251-258.
- Matthews K, Lim Z, Pearce L, Pagliuca A, Alejandro Madrigal J, Mufti GJ, Barber LD** (2010a) Rapid recovery of lymphocyte subsets is not associated with protection from relapse of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia after haematopoietic stem cell transplantation using a reduced intensity conditioning regimen and alemtuzumab. *British journal of haematology* 149:879-889.
- Matthews VB, Allen TL, Risis S, Chan MH, Henstridge DC, Watson N, Zaffino LA, Babb JR, Boon J, Meikle PJ, Jowett JB, Watt MJ, Jansson JO, Bruce CR, Febbraio MA** (2010b) Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia* 53:2431-2441.
- McCobb DP, Fowler NL, Featherstone T, Lingle CJ, Saito M, Krause JE, Salkoff L** (1995) A human calcium-activated potassium channel gene expressed in vascular smooth muscle. *The American journal of physiology* 269:H767-777.
- Meera P, Wallner M, Song M, Toro L** (1997) Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:14066-14071.
- Meglasson MD, Matschinsky FM** (1986) Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes/metabolism reviews* 2:163-214.
- Mendoza-Nunez VM, Garcia-Sanchez A, Sanchez-Rodriguez M, Galvan-Duarte RE, Fonseca-Yerena ME** (2002) Overweight, waist circumference, age, gender, and insulin resistance as risk factors for hyperleptinemia. *Obesity research* 10:253-259.

- Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE** (1993) Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *European journal of biochemistry / FEBS* 214:829-835.
- Meredith AL, Thorneloe KS, Werner ME, Nelson MT, Aldrich RW** (2004) Overactive bladder and incontinence in the absence of the BK large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *The Journal of biological chemistry* 279:36746-36752.
- Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larhammar D, Quirion R, Schwartz T, Westfall T** (1998) XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacological reviews* 50:143-150.
- Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S** (1998) Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10402-10406.
- Miki T, Tashiro F, Iwanaga T, Nagashima K, Yoshitomi H, Aihara H, Nitta Y, Gono T, Inagaki N, Miyazaki J, Seino S** (1997) Abnormalities of pancreatic islets by targeted expression of a dominant-negative KATP channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:11969-11973.
- Miller CW, Casimir DA, Ntambi JM** (1996) The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F<sub>2</sub>alpha. *Endocrinology* 137:5641-5650.
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB** (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339-343.
- Misler S, Barnett DW, Gillis KD, Pressel DM** (1992) Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human beta-cells. *Diabetes* 41:1221-1228.
- Mitschke MM, Hoffmann LS, Gnad T, Scholz D, Kruthoff K, Mayer P, Haas B, Sassmann A, Pfeifer A, Kilic A** (2013) Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27:1621-1630.
- Miyashita K, Itoh H, Tsujimoto H, Tamura N, Fukunaga Y, Sone M, Yamahara K, Taura D, Inuzuka M, Sonoyama T, Nakao K** (2009) Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes* 58:2880-2892.
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW** (1997) Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82:4196-4200.
- Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E** (1999) Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140:5995-5998.
- Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D** (2015) Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*.
- Moro C, Lafontan M** (2013) Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 304:H358-368.
- Moro C, Klimcakova E, Lafontan M, Berlan M, Galitzky J** (2007) Phosphodiesterase-5A and neutral endopeptidase activities in human adipocytes do not control atrial natriuretic peptide-mediated lipolysis. *British journal of pharmacology* 152:1102-1110.
- Motter AL, Ahern GP** (2008) TRPV1-null mice are protected from diet-induced obesity. *FEBS letters* 582:2257-2262.
- Murphy KG, Bloom SR** (2006) Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444:854-859.
- Mussig K, Staiger H, Machicao F, Kirchhoff K, Guthoff M, Schafer SA, Kantartzis K, Silbernagel G, Stefan N, Holst JJ, Gallwitz B, Haring HU, Fritsche A** (2009) Association of type 2 diabetes candidate polymorphisms in KCNQ1 with incretin and insulin secretion. *Diabetes* 58:1715-1720.

- Musso G, Gambino R, Cassader M** (2010a) Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition: mechanisms and implications for metabolic disorders. *Current opinion in lipidology* 21:76-83.
- Musso G, Gambino R, Cassader M** (2010b) Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabetes care* 33:2277-2284.
- Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L** (2007) A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45:593-605.
- Nakkrasae LI, Thongon N, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Charoenphandhu N** (2010) Transepithelial calcium transport in prolactin-exposed intestine-like Caco-2 monolayer after combinatorial knockdown of TRPV5, TRPV6 and Ca(v)1.3. *The journal of physiological sciences : JPS* 60:9-17.
- Neal JW, Clipstone NA** (2002) Calcineurin mediates the calcium-dependent inhibition of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *The Journal of biological chemistry* 277:49776-49781.
- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B** (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 293:E444-452.
- Nedvidkova J, Smitka K, Kopsky V, Hainer V** (2005) Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 54:133-140.
- Nelson MT, Quayle JM** (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American journal of physiology* 268:C799-822.
- Ngala RA, Zaibi MS, Langlands K, Stocker CJ, Arch JR, Cawthorne MA** (2014) Stimulation of glucose uptake in murine soleus muscle and adipocytes by 5-(4-phenoxybutoxy)psoralen (PAP-1) may be mediated by Kv1.5 rather than Kv1.3. *PeerJ* 2:e614.
- Nikonova L, Koza RA, Mendoza T, Chao PM, Curley JP, Kozak LP** (2008) Mesoderm-specific transcript is associated with fat mass expansion in response to a positive energy balance. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:3925-3937.
- Nishimura S, Manabe I, Nagai R** (2009a) Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. *Discovery medicine* 8:55-60.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R** (2009b) CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature medicine* 15:914-920.
- Nisoli E, Clementi E, Moncada S, Carruba MO** (2004) Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochemical pharmacology* 67:1-15.
- Nisoli E, Clementi E, Tonello C, Sciorati C, Briscini L, Carruba MO** (1998) Effects of nitric oxide on proliferation and differentiation of rat brown adipocytes in primary cultures. *British journal of pharmacology* 125:888-894.
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO** (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299:896-899.
- Niu X, Qian X, Magleby KL** (2004) Linker-gating ring complex as passive spring and Ca(2+)-dependent machine for a voltage- and Ca(2+)-activated potassium channel. *Neuron* 42:745-756.
- Noma A** (1983) ATP-regulated K+ channels in cardiac muscle. *Nature* 305:147-148.
- Ntambi JM, Takova T** (1996) Role of Ca2+ in the early stages of murine adipocyte differentiation as evidenced by calcium mobilizing agents. *Differentiation; research in biological diversity* 60:151-158.
- Oberhauser A, Alvarez O, Latorre R** (1988) Activation by divalent cations of a Ca2+-activated K+ channel from skeletal muscle membrane. *The Journal of general physiology* 92:67-86.
- Oguri A, Tanaka T, Iida H, Meguro K, Takano H, Oonuma H, Nishimura S, Morita T, Yamasoba T, Nagai R, Nakajima T** (2010) Involvement of CaV3.1 T-type calcium channels in cell proliferation in mouse preadipocytes. *American journal of physiology Cell physiology* 298:C1414-1423.

- Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, Watanabe T, Yazawa S, Fushiki T** (2001) Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 65:2735-2740.
- Orio P, Rojas P, Ferreira G, Latorre R** (2002) New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 17:156-161.
- Ostrowski K, Schjerling P, Pedersen BK** (2000) Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. *European journal of applied physiology* 83:512-515.
- Owyang C, Heldsinger A** (2011) Vagal control of satiety and hormonal regulation of appetite. *Journal of neurogastroenterology and motility* 17:338-348.
- Palmer RK, Lunn CA** (2013) TRP channels as targets for therapeutic intervention in obesity: focus on TRPV1 and TRPM5. *Current topics in medicinal chemistry* 13:247-257.
- Park JK, Kim YC, Sim JH, Choi MY, Choi W, Hwang KK, Cho MC, Kim KW, Lim SW, Lee SJ** (2007) Regulation of membrane excitability by intracellular pH (pHi) changes through Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current (BK channel) in single smooth muscle cells from rabbit basilar artery. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454:307-319.
- Parker HE, Habib AM, Rogers GJ, Gribble FM, Reimann F** (2009) Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells. *Diabetologia* 52:289-298.
- Patterson AJ, Henrie-Olson J, Brenner R** (2002) Vasoregulation at the molecular level: a role for the beta1 subunit of the calcium-activated potassium (BK) channel. *Trends in cardiovascular medicine* 12:78-82.
- Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen BV, Wiik A, Wohlfahrt J, Frisch M** (2006) Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis research & therapy* 8:R133.
- Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal-Puig A** (2016) Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia* 59:1075-1088.
- Peng W, Hoidal JR, Farrukh IS** (1996) Regulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in pulmonary vascular smooth muscle cells: role of nitric oxide. *Journal of applied physiology* 81:1264-1272.
- Perry CA, Pravetoni M, Teske JA, Aguado C, Erickson DJ, Medrano JF, Lujan R, Kotz CM, Wickman K** (2008) Predisposition to late-onset obesity in GIRK4 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:8148-8153.
- Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, DePaoli AM, Taylor SI, Gorden P, Shulman GI** (2002) Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *The Journal of clinical investigation* 109:1345-1350.
- Petersen RK, Madsen L, Pedersen LM, Hallenborg P, Hagland H, Viste K, Dorskeland SO, Kristiansen K** (2008) Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Molecular and cellular biology* 28:3804-3816.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS** (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:9996-10015.
- Pfeifer A, Hoffmann LS** (2014) Brown, Beige, and White: The New Color Code of Fat and Its Pharmacological Implications. *Annual review of pharmacology and toxicology*.
- Pfeifer A, Kilic A, Hoffmann LS** (2013) Regulation of metabolism by cGMP. *Pharmacology & therapeutics* 140:81-91.
- Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F** (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 135:105-149.

- Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D** (1997) NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40:1286-1292.
- Plum L, Schubert M, Bruning JC** (2005) The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 16:59-65.
- Pocai A et al.** (2009) Glucagon-like peptide 1/glucagon receptor dual agonism reverses obesity in mice. *Diabetes* 58:2258-2266.
- Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E** (1988) Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *The Journal of clinical investigation* 81:442-448.
- Porte D, Jr., Baskin DG, Schwartz MW** (2005) Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 54:1264-1276.
- Pouliot MC, Despres JP, Nadeau A, Tremblay A, Moorjani S, Lupien PJ, Theriault G, Bouchard C** (1990) Associations between regional body fat distribution, fasting plasma free fatty acid levels and glucose tolerance in premenopausal women. *Int J Obes* 14:293-302.
- Pouliot MC, Despres JP, Nadeau A, Moorjani S, Prud'Homme D, Lupien PJ, Tremblay A, Bouchard C** (1992) Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* 41:826-834.
- Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, Nadeau A, Lupien PJ** (1994) Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *The American journal of cardiology* 73:460-468.
- Powell K** (2007) Obesity: the two faces of fat. *Nature* 447:525-527.
- Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM** (2001) C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama* 286:327-334.
- Priestman DA, van der Spoel AC, Butters TD, Dwek RA, Platt FM** (2008) N-butyldeoxynojirimycin causes weight loss as a result of appetite suppression in lean and obese mice. *Diabetes, obesity & metabolism* 10:159-166.
- Proenca AR, Sertie RA, Oliveira AC, Campana AB, Caminhotto RO, Chimin P, Lima FB** (2014) New concepts in white adipose tissue physiology. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 47:192-205.
- Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M** (1987) Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes/metabolism reviews* 3:463-524.
- Ramanathan K, Fuchs PA** (2002) Modeling hair cell tuning by expression gradients of potassium channel beta subunits. *Biophysical journal* 82:64-75.
- Reda TK, Geliebter A, Pi-Sunyer FX** (2002) Amylin, food intake, and obesity. *Obesity research* 10:1087-1091.
- Reinehr T, de Sousa G, Niklowitz P, Roth CL** (2007) Amylin and its relation to insulin and lipids in obese children before and after weight loss. *Obesity* 15:2006-2011.
- Renaldi O, Pramono B, Sinorita H, Purnomo LB, Asdie RH, Asdie AH** (2009) Hypoadiponectinemia: a risk factor for metabolic syndrome. *Acta medica Indonesiana* 41:20-24.
- Robidoux J, Martin TL, Collins S** (2004) Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annual review of pharmacology and toxicology* 44:297-323.
- Robidoux J, Kumar N, Daniel KW, Moukdar F, Cyr M, Medvedev AV, Collins S** (2006) Maximal beta3-adrenergic regulation of lipolysis involves Src and epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation. *The Journal of biological chemistry* 281:37794-37802.
- Romacho T, Sanchez-Ferrer CF, Peiro C** (2013) Visfatin/Nampt: an adipokine with cardiovascular impact. *Mediators of inflammation* 2013:946427.
- Rosen ED, Spiegelman BM** (2014) What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156:20-44.
- Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C** (2013) Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature cell biology* 15:659-667.

- Roth J, Qiang X, Marban SL, Redelt H, Lowell BC** (2004) The obesity pandemic: where have we been and where are we going? *Obesity research* 12 Suppl 2:88S-101S.
- Rothwell NJ, Stock MJ** (1979) A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281:31-35.
- Rushing PA, Hagan MM, Seeley RJ, Lutz TA, Woods SC** (2000) Amylin: a novel action in the brain to reduce body weight. *Endocrinology* 141:850-853.
- Ruttiger L, Sausbier M, Zimmermann U, Winter H, Braig C, Engel J, Knirsch M, Arntz C, Langer P, Hirt B, Muller M, Kopschall I, Pfister M, Munkner S, Rohbock K, Pfaff I, Rusch A, Ruth P, Knipper M** (2004) Deletion of the Ca<sup>2+</sup>-activated potassium (BK) alpha-subunit but not the BKbeta1-subunit leads to progressive hearing loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:12922-12927.
- Saif-Ali R, Ismail IS, Al-Hamodi Z, Al-Mekhlafi HM, Siang LC, Alabsi AM, Muniandy S** (2011) KCNQ1 haplotypes associate with type 2 diabetes in Malaysian Chinese Subjects. *International journal of molecular sciences* 12:5705-5718.
- Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M** (2009) High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58:1526-1531.
- Saito H, Akita T, Tohyama J, Goldberg-Stern H, Kobayashi Y, Cohen R, Kato M, Ohba C, Miyatake S, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Fukuda A, Matsumoto N** (2015) De novo KCNB1 mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal firing. *Scientific reports* 5:15199.
- Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A** (2006) High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nature reviews Neuroscience* 7:921-931.
- Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, Piersma AH, Ozanne SE, Twinn DF, Remacle C, Rowlerson A, Poston L, Taylor PD** (2008) Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 51:383-392.
- Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Sparks CA, Tang Y, Li H, Guertin DA** (2012) PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell metabolism* 16:348-362.
- Sanchez JC, Rivera RA, Munoz LV** (2016) TRPV4 Channels in Human White Adipocytes: Electrophysiological Characterization and Regulation by Insulin. *Journal of cellular physiology* 231:954-963.
- Sandhiya S, Dkhar SA** (2009) Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *The Indian journal of medical research* 129:223-232.
- Santarelli LC, Chen J, Heinemann SH, Hoshi T** (2004) The beta1 subunit enhances oxidative regulation of large-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels. *The Journal of general physiology* 124:357-370.
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK** (2002) The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36:199-211.
- Saponaro C, Gaggini M, Gastaldelli A** (2015) Nonalcoholic Fatty liver disease and type 2 diabetes: common pathophysiological mechanisms. *Current diabetes reports* 15:607.
- Sassmann A, Offermanns S, Wettschureck N** (2010) Tamoxifen-inducible Cre-mediated recombination in adipocytes. *Genesis* 48:618-625.
- Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer CA, Feil R, Hofmann F, Korth M, Shipston MJ, Knaus HG, Wolfer DP, Pedroarena CM, Storm JF, Ruth P** (2004) Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:9474-9478.
- Sausbier M et al.** (2005) Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* 112:60-68.
- Sausbier U, Sausbier M, Sailer CA, Arntz C, Knaus HG, Neuhuber W, Ruth P** (2006) Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of the BK-type in the mouse brain. *Histochemistry and cell biology* 125:725-741.

- Savage DC** (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual review of microbiology* 31:107-133.
- Savaria D, Lanoue C, Cadieux A, Rousseau E** (1992) Large conducting potassium channel reconstituted from airway smooth muscle. *The American journal of physiology* 262:L327-336.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF** (1995) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 270:26746-26749.
- Schubert R, Nelson MT** (2001) Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends in pharmacological sciences* 22:505-512.
- Schulman JL, Carleton JL, Whitney G, Whitehorn JC** (1957) Effect of glucagon on food intake and body weight in man. *J Appl Physiol* 11:419-421.
- Schulz TJ, Huang P, Huang TL, Xue R, McDougall LE, Townsend KL, Cypess AM, Mishina Y, Gussoni E, Tseng YH** (2013) Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* 495:379-383.
- Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, Cerletti M, McDougall LE, Giorgadze N, Tchkonja T, Schrier D, Falb D, Kirkland JL, Wagers AJ, Tseng YH** (2011) Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:143-148.
- Schwartz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD** (2010) Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* 18:190-195.
- Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, Cohen P, Cinti S, Spiegelman BM** (2011) Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *The Journal of clinical investigation* 121:96-105.
- Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM** (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454:961-967.
- Seidell JC** (2000) Obesity, insulin resistance and diabetes--a worldwide epidemic. *The British journal of nutrition* 83 Suppl 1:S5-8.
- Seino S, Iwanaga T, Nagashima K, Miki T** (2000) Diverse roles of K(ATP) channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes* 49:311-318.
- Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, Hu H, Wang L, Pavlova Z, Gilsanz V, Kajimura S** (2012) Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS one* 7:e49452.
- Shen KZ, Lagrutta A, Davies NW, Standen NB, Adelman JP, North RA** (1994) Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 426:440-445.
- Shen W, Hao J, Feng Z, Tian C, Chen W, Packer L, Shi X, Zang W, Liu J** (2011) Lipoamide or lipoic acid stimulates mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 adipocytes via the endothelial NO synthase-cGMP-protein kinase G signalling pathway. *British journal of pharmacology* 162:1213-1224.
- Shi H, Halvorsen YD, Ellis PN, Wilkison WO, Zemel MB** (2000) Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiological genomics* 3:75-82.
- Shi J, Cui J** (2001) Intracellular Mg(2+) enhances the function of BK-type Ca(2+)-activated K(+) channels. *The Journal of general physiology* 118:589-606.
- Shi NQ, Ye B, Makielski JC** (2005) Function and distribution of the SUR isoforms and splice variants. *Journal of molecular and cellular cardiology* 39:51-60.
- Shore A, Karamitri A, Kemp P, Speakman JR, Lomax MA** (2010) Role of Ucp1 enhancer methylation and chromatin remodelling in the control of Ucp1 expression in murine adipose tissue. *Diabetologia* 53:1164-1173.
- Shore AM, Karamitri A, Kemp P, Speakman JR, Graham NS, Lomax MA** (2013) Cold-induced changes in gene expression in brown adipose tissue, white adipose tissue and liver. *PLoS one* 8:e68933.

- Simpson KA, Martin NM, Bloom SR** (2009) Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 53:120-128.
- Skop V, Kontrova K, Zidek V, Pravenec M, Kazdova L, Mikulik K, Sajdok J, Zidkova J** (2010) Autocrine effects of visfatin on hepatocyte sensitivity to insulin action. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 59:615-618.
- Sloth B, Holst JJ, Flint A, Gregersen NT, Astrup A** (2007) Effects of PYY1-36 and PYY3-36 on appetite, energy intake, energy expenditure, glucose and fat metabolism in obese and lean subjects. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 292:E1062-1068.
- Smitka K, Maresova D** (2015) Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. *Prague medical report* 116:87-111.
- Soom M, Gessner G, Heuer H, Hoshi T, Heinemann SH** (2008) A mutually exclusive alternative exon of slo1 codes for a neuronal BK channel with altered function. *Channels* 2:278-282.
- Sorensen MV, Matos JE, Sausbier M, Sausbier U, Ruth P, Praetorius HA, Leipziger J** (2008) Aldosterone increases KCa1.1 (BK) channel-mediated colonic K<sup>+</sup> secretion. *The Journal of physiology* 586:4251-4264.
- Sorensen MV, Sausbier M, Ruth P, Seidler U, Riederer B, Praetorius HA, Leipziger J** (2010) Adrenaline-induced colonic K<sup>+</sup> secretion is mediated by KCa1.1 (BK) channels. *The Journal of physiology* 588:1763-1777.
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P** (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783-787.
- Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford ML** (1997) Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* 390:521-525.
- Spiller RC, Trotman IF, Higgins BE, Ghatei MA, Grimble GK, Lee YC, Bloom SR, Misiewicz JJ, Silk DB** (1984) The ileal brake--inhibition of jejunal motility after ileal fat perfusion in man. *Gut* 25:365-374.
- Sprossmann F, Pankert P, Sausbier U, Wirth A, Zhou XB, Madlung J, Zhao H, Bucurenciu I, Jakob A, Lamkemeyer T, Neuhuber W, Offermanns S, Shipston MJ, Korth M, Nordheim A, Ruth P, Sausbier M** (2009) Inducible knockout mutagenesis reveals compensatory mechanisms elicited by constitutive BK channel deficiency in overactive murine bladder. *The FEBS journal* 276:1680-1697.
- Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ** (2013) Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *The Journal of clinical investigation* 123:215-223.
- Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S** (2005) Hormonal regulation of food intake. *Physiological reviews* 85:1131-1158.
- Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK** (2003) Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- $\alpha$  production in humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17:884-886.
- Straub SV, Perez SM, Tan B, Coughlan KA, Trebino CE, Cosgrove P, Buxton JM, Kreeger JM, Jackson VM** (2011) Pharmacological inhibition of Kv1.3 fails to modulate insulin sensitivity in diabetic mice or human insulin-sensitive tissues. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 301:E380-390.
- Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z** (1986a) A twin study of human obesity. *Jama* 256:51-54.
- Stunkard AJ, Sorensen TI, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull WJ, Schulsinger F** (1986b) An adoption study of human obesity. *The New England journal of medicine* 314:193-198.
- Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR** (2012) Obesity and appetite control. *Experimental diabetes research* 2012:824305.
- Suzuki K, Simpson KA, Minnion JS, Shillito JC, Bloom SR** (2010) The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocrine journal* 57:359-372.
- Szabo E, Qiu Y, Baksh S, Michalak M, Opas M** (2008) Calreticulin inhibits commitment to adipocyte differentiation. *The Journal of cell biology* 182:103-116.

- Tambs K, Moum T, Eaves LJ, Neale MC, Midthjell K, Lund-Larsen PG, Naess S** (1992) Genetic and environmental contributions to the variance of body height in a sample of first and second degree relatives. *American journal of physical anthropology* 88:285-294.
- Tan CY, Ishikawa K, Virtue S, Vidal-Puig A** (2011) Brown adipose tissue in the treatment of obesity and diabetes: Are we hot enough? *Journal of diabetes investigation* 2:341-350.
- Tang-Christensen M, Vrang N, Larsen PJ** (2001) Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 25 Suppl 5:S42-47.
- Tatemoto K, Mutt V** (1980) Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature* 285:417-418.
- Tateya S, Rizzo NO, Handa P, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Daum G, Clowes AW, Morton GJ, Schwartz MW, Kim F** (2011) Endothelial NO/cGMP/VASP signaling attenuates Kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat feeding. *Diabetes* 60:2792-2801.
- Terry RB, Stefanick ML, Haskell WL, Wood PD** (1991) Contributions of regional adipose tissue depots to plasma lipoprotein concentrations in overweight men and women: possible protective effects of thigh fat. *Metabolism: clinical and experimental* 40:733-740.
- Tharabenjasin P, Douard V, Patel C, Krishnamra N, Johnson RJ, Zuo J, Ferraris RP** (2014) Acute interactions between intestinal sugar and calcium transport in vitro. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 306:G1-12.
- Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW** (1994) Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83:113-118.
- Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B** (2007) Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:4401-4406.
- Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM** (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Molecular and cellular biology* 13:4753-4759.
- Toro L, Wallner M, Meera P, Tanaka Y** (1998) Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 13:112-117.
- Tovar S, Paeger L, Hess S, Morgan DA, Hausen AC, Bronneke HS, Hampel B, Ackermann PJ, Evers N, Buning H, Wunderlich FT, Rahmouni K, Kloppenburg P, Bruning JC** (2013) K(ATP)-channel-dependent regulation of catecholaminergic neurons controls BAT sympathetic nerve activity and energy homeostasis. *Cell metabolism* 18:445-455.
- Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK** (2004) Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:5577-5582.
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML** (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913.
- Tseng-Crank J, Godinot N, Johansen TE, Ahring PK, Strobaek D, Mertz R, Foster CD, Olesen SP, Reinhart PH** (1996) Cloning, expression, and distribution of a Ca(2+)-activated K+ channel beta-subunit from human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:9200-9205.
- Tucker JD, Dhanvantari S, Brubaker PL** (1996) Proglucagon processing in islet and intestinal cell lines. *Regulatory peptides* 62:29-35.
- Tucker K, Overton JM, Fadool DA** (2008) Kv1.3 gene-targeted deletion alters longevity and reduces adiposity by increasing locomotion and metabolism in melanocortin-4 receptor-null mice. *International journal of obesity* 32:1222-1232.
- Tucker K, Overton JM, Fadool DA** (2012) Diet-induced obesity resistance of Kv1.3-/- mice is olfactory bulb dependent. *Journal of neuroendocrinology* 24:1087-1095.

- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI** (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444:1027-1031.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI** (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480-484.
- Uebele VN, Lagrutta A, Wade T, Figueroa DJ, Liu Y, McKenna E, Austin CP, Bennett PB, Swanson R** (2000) Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel. *The Journal of biological chemistry* 275:23211-23218.
- Ukropec J, Anunciado RP, Ravussin Y, Hulver MW, Kozak LP** (2006) UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1<sup>-/-</sup> mice. *The Journal of biological chemistry* 281:31894-31908.
- Unger TJ, Calderon GA, Bradley LC, Sena-Esteves M, Rios M** (2007) Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:14265-14274.
- Unoki H et al.** (2008) SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nature genetics* 40:1098-1102.
- Upadhyay SK, Eckel-Mahan KL, Mirbolooki MR, Tjong I, Griffey SM, Schmunk G, Koehne A, Halbout B, Iadonato S, Pedersen B, Borrelli E, Wang PH, Mukherjee J, Sassone-Corsi P, Chandy KG** (2013) Selective Kv1.3 channel blocker as therapeutic for obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:E2239-2248.
- Vahl TP, Drazen DL, Seeley RJ, D'Alessio DA, Woods SC** (2010) Meal-anticipatory glucagon-like peptide-1 secretion in rats. *Endocrinology* 151:569-575.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F** (2008) Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 18:158-168.
- Vallon V, Grahmmer F, Richter K, Bleich M, Lang F, Barhanin J, Volkl H, Warth R** (2001) Role of KCNE1-dependent K<sup>+</sup> fluxes in mouse proximal tubule. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12:2003-2011.
- Vallon V, Grahmmer F, Volkl H, Sandu CD, Richter K, Rexhepaj R, Gerlach U, Rong Q, Pfeifer K, Lang F** (2005) KCNQ1-dependent transport in renal and gastrointestinal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:17864-17869.
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ** (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine* 360:1500-1508.
- Vegiopoulos A, Muller-Decker K, Strzoda D, Schmitt I, Chichelnitskiy E, Ostertag A, Berriel Diaz M, Rozman J, Hrabe de Angelis M, Nusing RM, Meyer CW, Wahli W, Klingenspor M, Herzig S** (2010) Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* 328:1158-1161.
- Verbraecken J, McNicholas WT** (2013) Respiratory mechanics and ventilatory control in overlap syndrome and obesity hypoventilation. *Respiratory research* 14:132.
- Vilsboll T, Agero H, Krarup T, Holst JJ** (2003) Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:220-224.
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P** (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine* 360:1518-1525.
- Vogler GP, Sorensen TI, Stunkard AJ, Srinivasan MR, Rao DC** (1995) Influences of genes and shared family environment on adult body mass index assessed in an adoption study by a comprehensive path model. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 19:40-45.

- Vojarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE** (2001) Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obesity research* 9:414-417.
- Walden TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J** (2012) Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 302:E19-31.
- Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO** (2002) Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nature medicine* 8:75-79.
- Wallner M, Meera P, Toro L** (1996) Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:14922-14927.
- Wallner M, Meera P, Toro L** (1999) Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:4137-4142.
- Wang B, Rothberg BS, Brenner R** (2006) Mechanism of beta4 subunit modulation of BK channels. *The Journal of general physiology* 127:449-465.
- Wang MY, Orci L, Ravazzola M, Unger RH** (2005) Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:18011-18016.
- Watanabe M, Yamamoto T, Mori C, Okada N, Yamazaki N, Kajimoto K, Kataoka M, Shinohara Y** (2008) Cold-induced changes in gene expression in brown adipose tissue: implications for the activation of thermogenesis. *Biological & pharmaceutical bulletin* 31:775-784.
- Weaver GA, Krause JA, Miller TL, Wolin MJ** (1986) Incidence of methanogenic bacteria in a sigmoidoscopy population: an association of methanogenic bacteria and diverticulosis. *Gut* 27:698-704.
- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H** (2005) International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacological reviews* 57:463-472.
- Wellcome Trust Case Control C** (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447:661-678.
- Wellman GC, Nelson MT** (2003) Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of Ca<sup>2+</sup>-sensitive ion channels. *Cell calcium* 34:211-229.
- Wen J, Phillips SF, Sarr MG, Kost LJ, Holst JJ** (1995) PYY and GLP-1 contribute to feedback inhibition from the canine ileum and colon. *The American journal of physiology* 269:G945-952.
- Werner ME, Meredith AL, Aldrich RW, Nelson MT** (2008) Hypercontractility and impaired sildenafil relaxations in the BKCa channel deletion model of erectile dysfunction. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 295:R181-188.
- Werner ME, Zvara P, Meredith AL, Aldrich RW, Nelson MT** (2005) Erectile dysfunction in mice lacking the large-conductance calcium-activated potassium (BK) channel. *The Journal of physiology* 567:545-556.
- Wernstedt I, Olsson B, Jernas M, Pagliarunga S, Carlsson LM, Smith U, Cianflone K, Wallenius K, Wallenius V** (2006) Increased levels of acylation-stimulating protein in interleukin-6-deficient (IL-6(-/-)) mice. *Endocrinology* 147:2690-2695.
- Wesley A, Bengtsson C, Elkan AC, Klareskog L, Alfredsson L, Wedren S, Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis Study G** (2013) Association between body mass index and anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis: results from a population-based case-control study. *Arthritis care & research* 65:107-112.
- West DB, Fey D, Woods SC** (1984) Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *The American journal of physiology* 246:R776-787.
- Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA** (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86:1930-1935.

- White RE, Kryman JP, El-Mowafy AM, Han G, Carrier GO** (2000) cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation research* 86:897-905.
- Whittle A, Relat-Pardo J, Vidal-Puig A** (2013) Pharmacological strategies for targeting BAT thermogenesis. *Trends in pharmacological sciences* 34:347-355.
- WHO** (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organization technical report series* 894:i-xii, 1-253.
- Williams G, Harrold JA, Cutler DJ** (2000) The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *The Proceedings of the Nutrition Society* 59:385-396.
- Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C, Kemp PJ** (2004) Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 306:2093-2097.
- Wolf BA, Colca JR, Turk J, Florholmen J, McDaniel ML** (1988) Regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis by islet endoplasmic reticulum and its role in insulin secretion. *The American journal of physiology* 254:E121-136.
- Womack MD, Chevez C, Khodakhah K** (2004) Calcium-activated potassium channels are selectively coupled to P/Q-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:8818-8822.
- Wu J, Cohen P, Spiegelman BM** (2013) Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes & development* 27:234-250.
- Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerback S, Schrauwen P, Spiegelman BM** (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150:366-376.
- Wu RS, Marx SO** (2010) The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney: alpha- and beta-subunits. *Kidney international* 78:963-974.
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S** (2005) Appetite control. *The Journal of endocrinology* 184:291-318.
- Wynne K, Park AJ, Small CJ, Meeran K, Ghatgei MA, Frost GS, Bloom SR** (2006) Oxyntomodulin increases energy expenditure in addition to decreasing energy intake in overweight and obese humans: a randomised controlled trial. *International journal of obesity* 30:1729-1736.
- Xi Q, Tcheranova D, Parfenova H, Horowitz B, Leffler CW, Jaggar JH** (2004) Carbon monoxide activates KCa channels in newborn arteriole smooth muscle cells by increasing apparent Ca<sup>2+</sup> sensitivity of alpha-subunits. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 286:H610-618.
- Xia XM, Ding JP, Lingle CJ** (1999) Molecular basis for the inactivation of Ca<sup>2+</sup>- and voltage-dependent BK channels in adrenal chromaffin cells and rat insulinoma tumor cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:5255-5264.
- Xia XM, Zeng X, Lingle CJ** (2002) Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 418:880-884.
- Xia XM, Ding JP, Zeng XH, Duan KL, Lingle CJ** (2000) Rectification and rapid activation at low Ca<sup>2+</sup> of Ca<sup>2+</sup>-activated, voltage-dependent BK currents: consequences of rapid inactivation by a novel beta subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:4890-4903.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP** (1998) Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395:503-507.
- Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF** (2003a) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature neuroscience* 6:736-742.

- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H** (2003b) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 112:1821-1830.
- Xu J, Koni PA, Wang P, Li G, Kaczmarek L, Wu Y, Li Y, Flavell RA, Desir GV** (2003c) The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. *Human molecular genetics* 12:551-559.
- Xu Y, Ramu Y, Lu Z** (2008) Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K<sup>+</sup> channels. *Nature* 451:826-829.
- Yamauchi T, Kadowaki T** (2008) Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. *International journal of obesity* 32 Suppl 7:S13-18.
- Yamauchi T et al.** (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature medicine* 7:941-946.
- Yamauchi T et al.** (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769.
- Yan J, Aldrich RW** (2010) LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium. *Nature* 466:513-516.
- Yan J, Aldrich RW** (2012) BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:7917-7922.
- Yang H, Hu L, Shi J, Delaloye K, Horrigan FT, Cui J** (2007) Mg<sup>2+</sup> mediates interaction between the voltage sensor and cytosolic domain to activate BK channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:18270-18275.
- Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM** (2001) Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86:3815-3819.
- Ye L, Kleiner S, Wu J, Sah R, Gupta RK, Banks AS, Cohen P, Khandekar MJ, Bostrom P, Mepani RJ, Laznik D, Kamenecka TM, Song X, Liedtke W, Mootha VK, Puigserver P, Griffin PR, Clapham DE, Spiegelman BM** (2012) TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell* 151:96-110.
- Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, McCann SM, Licinio J** (2004) Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:10434-10439.
- You H, Laychock SG** (2011) Long-term treatment with atrial natriuretic peptide inhibits ATP production and insulin secretion in rat pancreatic islets. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 300:E435-444.
- Yuan A, Santi CM, Wei A, Wang ZW, Pollak K, Nonet M, Kaczmarek L, Crowder CM, Salkoff L** (2003) The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron* 37:765-773.
- Zarei MM, Zhu N, Alioua A, Eghbali M, Stefani E, Toro L** (2001) A novel MaxiK splice variant exhibits dominant-negative properties for surface expression. *The Journal of biological chemistry* 276:16232-16239.
- Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, Mao Y, Zhang X, Pang X, Wei C, Zhao G, Chen Y, Zhao L** (2010a) Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME journal* 4:232-241.
- Zhang J, Yan J** (2014) Regulation of BK channels by auxiliary gamma subunits. *Frontiers in physiology* 5:401.
- Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD** (2004) Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *The Journal of biological chemistry* 279:4471-4478.
- Zhang LL, Yan Liu D, Ma LQ, Luo ZD, Cao TB, Zhong J, Yan ZC, Wang LJ, Zhao ZG, Zhu SJ, Schrader M, Thilo F, Zhu ZM, Tepel M** (2007) Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circulation research* 100:1063-1070.

- Zhang X, Solaro CR, Lingle CJ** (2001) Allosteric regulation of BK channel gating by Ca(2+) and Mg(2+) through a nonselective, low affinity divalent cation site. *The Journal of general physiology* 118:607-636.
- Zhang X, Ji J, Yan G, Wu J, Sun X, Shen J, Jiang H, Wang H** (2010b) Sildenafil promotes adipogenesis through a PKG pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 396:1054-1059.
- Zhang XH, Zhang YY, Sun HY, Jin MW, Li GR** (2012) Functional ion channels and cell proliferation in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of cellular physiology* 227:1972-1979.
- Zhang Y, Kaczmarek LK** (2015) Kv3.3 potassium channels and spinocerebellar ataxia. *The Journal of physiology*.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zhao CM, Furnes MW, Stenstrom B, Kulseng B, Chen D** (2008) Characterization of obestatin- and ghrelin-producing cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats: an immunohistochemical and electron-microscopic study. *Cell and tissue research* 331:575-587.
- Zhou X, Wulfsen I, Korth M, McClafferty H, Lukowski R, Shipston MJ, Ruth P, Dobrev D, Wieland T** (2012) Palmitoylation and membrane association of the stress axis regulated insert (STREX) controls BK channel regulation by protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 287:32161-32171.
- Zhou XB, Arntz C, Kamm S, Motejlek K, Sausbier U, Wang GX, Ruth P, Korth M** (2001) A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *The Journal of biological chemistry* 276:43239-43245.
- Zhou XB, Wulfsen I, Utku E, Sausbier U, Sausbier M, Wieland T, Ruth P, Korth M** (2010) Dual role of protein kinase C on BK channel regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:8005-8010.
- Zoratti M, De Marchi U, Gulbins E, Szabo I** (2009) Novel channels of the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et biophysica acta* 1787:351-363.

## 9 Publikationen und Kongressbeiträge

### 9.1 Publikationen

Veronika Leiss, Julia Illison, Katrin Domes, Franz Hofmann, Robert Lukowski. (2014). „Expression of cGMP-dependent protein kinase type I in mature white adipocytes.“ *Biochem Biophys Res Communications* 452 (1): 151-156

Julia Illison, Lijun Tian, Heather McClafferty, Martin Werno, Luke H. Chamberlain, Veronika Leiss, Antonia Sassmann, Stefan Offermanns, Peter Ruth, Michael J. Shipston and Robert Lukowski. (2016): „Obesogenic and diabetogenic effects of high-calorie nutrition require adipocyte BK channels.“ *Diabetes (accepted)*

### 9.2 Kongressbeiträge

Julia Illison, Beisan Mohammad, Annette Schürmann, Peter Ruth and Robert Lukowski (08/2013). “Putative roles of fat-cell BK channels for the development and manifestation of obesity.” 12<sup>th</sup> International Summer School: Inflammation, Immunomodulation, Inspiration. *Jongny (Genfer See)* (Poster)

Julia Illison, Beisan Mohammad, Annette Schürmann, Peter Ruth and Robert Lukowski (09/2013). „BK channels in adipocytes as potential targets for anti-obese therapies.“ DPhG Annual Meeting 2013: Drug Discovery inspired by nature. *Freiburg i.B.* (Poster)

Julia Illison, Beisan Mohammad, Annette Schürmann, Peter Ruth and Robert Lukowski (07/2014). “Ablation of BK channels may prevent the development and manifestation of obesity.” Summer School 2014: Tracking fast signalling processes in vivo - mechanisms, targets and tools. *Frauenchiemsee* (Poster)

Julia Illison, Beisan Mohammad, Annette Schürmann, Peter Ruth and Robert Lukowski (05/2015). „BK channels as potential targets for anti-obese therapies.“ 2nd European Calcium Channel Conference. *Alpbach* (Poster)

Julia Illison, Beisan Mohammad, Annette Schürmann, Peter Ruth and Robert Lukowski (07/2015). “BK channel in adipocytes as a potential target for anti-obese therapies.” Summer School 2015. *Frauenchiemsee* (Vortrag)

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Illison
Vorname	Julia Sabrina
Geburtsdatum	23.06.1986
Geburtsort	Bad-Cannstatt
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### Schulische Ausbildung

08/1992 - 07/1996	Grundschule Deggenhausertal (Wittenhofen)
08/1996 - 06/2005	Gymnasium Wilhelmsdorf
06/2005	Abitur am Gymnasium Wilhelmsdorf

### Studium und beruflicher Werdegang

09/2005 - 03/2006	PTA-Ausbildung, Bernd-Blindow-Schulen Friedrichshafen
04/2006 - 03/2008	Grundstudium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/2008	1. Staatsexamen der Pharmazie
04/2008 - 03/2010	Hauptstudium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/2010	1. Staatsexamen der Pharmazie
04/2010 - 10/2010	1. Abschnitt des Praktischen Jahres: Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie der Universität Tübingen. „Rolle des BK-Kanals für gastrointestinale Kontraktilität und Motilität in konstitutiven und konditionalen Knockout Mausmodellen“
11/2010 - 05/2011	2. Abschnitt des Praktischen Jahres: Bären-Apotheke Tübingen- Derendingen
06/2011	3. Staatsexamen der Pharmazie, Approbation als Apothekerin
06/2011 - 12/2015	Apothekerin (Teilzeit), Tal-Apotheke Deggenhausertal
09/2011 - aktuell	Promotion am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie der Universität Tübingen. „Der adipozytäre BK <sub>Ca</sub> Kaliumkanal und seine Rolle bei Prävention und Therapie von Adipositas“
01/2016 - aktuell	Apothekerin (Vollzeit), Tal-Apotheke Deggenhausertal

## 11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2011 bis September 2016 unter wissenschaftlicher Anleitung durch Herrn JProf. Dr. Robert Lukowski und Herrn Prof. Dr. Peter Ruth am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen. Die Promotionszeit wird mir wohl immer in guter Erinnerung bleiben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn JProf. Dr. Robert Lukowski für die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation und das mir entgegengebrachte Vertrauen während dieser Zeit bedanken. Vielen Dank für hilfreiche und motivierende Gespräche, die Korrektur meiner Arbeit und die Übernahme des Gutachtens.

Ein herzliches Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. Peter Ruth für die Bereitstellung des spannenden Dissertationsthemas, die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, sein Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Gutachtens.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Prüfern für ihren Einsatz bei der Disputation.

Vielen Dank an Mike Shipston und seine Arbeitsgruppe am Zentrum für integrative Physiologie an der Universität Edinburgh für die elektrophysiologischen Untersuchungen an BK-Kanälen in Fettzellkulturen sowie die BK- und GLUT4-Protein-Analysen der Zellen.

Ein großes Dankeschön auch an Prof. Dr. Michael Lämmerhofer und Bernhard Drotleff (Abteilung für Analytische Chemie, Universität Tübingen) für die viele Zeit und Motivation, die sie in die Etablierung und Durchführung von Metabolomuntersuchungen im Zuge dieser Arbeit investiert haben.

Mein herzlicher Dank geht auch an Dr. Veronika Leiss (Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinik Tübingen) für die freundliche und hilfreiche Einführung in die Durchführung des i.p.GTT und der Insulin-Analyse.

Vielmals danken möchte ich auch Isolde Breuning, Clément Kabagema-Bilan, Katrin Junger und Michael Glaser für ihre vielfältige Hilfe im Laboralltag sowie bei der Pflege und Genotypisierung unserer Mäuse. Insbesondere ein großes Dankeschön an Clément, der mit seiner herzlichen und humorvollen Art an so manchem Tag Sonne ins Labor gebracht hat.

Frau Ilona Böhler danke ich für die hingebungsvolle und zuverlässige Pflege und Versorgung unserer Mäuse.

Ein ganz herzliches Dankeschön an alle, die mir während meiner Promotion mit Rat und Tat im Labor und im Büro beigestanden und mich unterstützt haben.

Herzlichen Dank allen aktuellen und ehemaligen Doktoranden, Postdocs, Diplomanden und Masterstudenten der 7. und 9. Ebene für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit. Insbesondere Angelina, Anne, Beisan, Christina, Corinna, Eric, Friederike, Julia, Katrin, Lena, Markus, Michael, Rebekka, Sabrina, Sandra, Steffi und Tanja. Unsere vielen gemeinsamen Ausflüge und zahlreichen Unternehmungen sowie die entstandenen Freundschaften haben meine Zeit in Tübingen für mich zu etwas Besonderem gemacht.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für alles was ihr mir stets ermöglicht (habt). Für euer Vertrauen und eure grenzenlose Unterstützung bei der Umsetzung meiner Träume und Ziele und dafür, dass ihr einfach immer für mich da seid.

Eric – danke außerdem für unsere tolle „WG-Zeit“, deine Hilfe und deine ansteckende positive Art.

Ein ganz herzliches Dankeschön auch an Andi, für dein Verständnis, deine Geduld und Unterstützung, insbesondere in den letzten Monaten. Und ganz besonders für deine tatkräftige Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit.