

# Unterschiede in der Entwicklung von Diät – induzierter Adipositas bei C57BL/6 Substämmen

Untersuchung von phänotypischen und genetischen Unterschieden in C57BL/6 Substämmen

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTORUM RERUM MEDICINARUM  
(Dr. rer. med.)

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von: Diplom-Biologe Matthias Kern  
geboren am 31. Juli 1980 in Leipzig  
angefertigt April 2012 an der Universität Leipzig,  
Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie  
Betreuer: Prof. Dr. med. Matthias Blüher

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 16. Oktober 2012



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<b>BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG</b>	<b>4</b>
<b>1. EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK</b>	<b>5</b>
1.1 Definition und Epidemiologie der Adipositas	5
1.2 Entstehung von Adipositas	5
1.3 Fettverteilungsmuster und Einflussfaktoren	6
<b>2. MODELLTIERE DER ADIPOSITAS</b>	<b>8</b>
2.1 Zucker fatty Ratte (ZFR)	8
2.2 Wistar fatty Ratte (WFR)	9
2.3 agouti Maus	9
2.4 New Zealand Obese (NZO) Maus	10
2.5 Kuo Kondo (KK) Maus	10
2.6 db/db Maus	11
2.7 ob/ob – Maus	12
2.8 C57BL/6 Substämme und Diät – Induzierte Adipositas	13
<b>3. SNP – SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM</b>	<b>14</b>
<b>4. ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>15</b>
<b>5. PUBLIKATION DER VORLIEGENDEN ARBEIT</b>	<b>16</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>20</b>
<b>7. LITERATUR</b>	<b>25</b>
<b>8. ANLAGEN</b>	<b>35</b>
8.1 Lebenslauf	35
8.2 Danksagung	39
8.3 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	40

## Bibliographische Beschreibung

Kern, Matthias

### Unterschiede in der Entwicklung von Diät – induzierter Adipositas bei C57BL/6 Substämmen

Formatiert: Links

Universität Leipzig, Dissertation

40 S., 94 Lit., 2 Tab., 3 Dia., 3 Anlagen

Die Prävalenz der Adipositas nimmt in Deutschland seit vielen Jahren kontinuierlich zu. Adipositas entwickelt sich auf der Grundlage und Wechselwirkung genetischer Faktoren mit Verhaltensmustern, Lebensgewohnheiten und Umwelteinflüssen. In der Adipositasforschung haben Modelltiere seit der Entdeckung des Fettgewebshormons Leptin 1994 einen wesentlichen Stellenwert erhalten. Unterschiedliche Modelle haben dazu beigetragen, die Bedeutung vererblicher Faktoren bei der Adipositas – Entstehung zu verstehen. Sogenannte transgene Tiere, mit organspezifisch induzierter Ausschaltung bzw. Über- oder Unterexpression bestimmter Gene sowie temporärer Beeinflussung von Genen, haben in den letzten 15 Jahren die biomedizinische Forschung im Adipositasfeld revolutioniert. Als Hintergrundstamm für transgene Tiere ist der Inzuchtmausstamm, C57BL/6, ein sehr verbreiteter Kontrollstamm. Der C57BL/6 Mausstamm wurde vom C57BL Stamm abgeleitet, welcher in den 1920er Jahren von C.C. Little in den Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) etabliert wurde. Mehr als neun C57BL/6 Substämmen wurden in den 1970er Jahren generiert. Die Bezeichnung Substamm wird vorgenommen, wenn sie als Zweig eines Inzuchtstammes hervorgehen, und bekannt ist oder vermutet wird, dass er sich genetisch vom Originalstamm unterscheidet.

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob sich zwei C57BL/6 Substämmen, der C57BL/6JRj und der C57BL/6NTac Stamm, hinsichtlich genetischer und phänotypischer Merkmale unterscheiden. Phänotypisch untersucht wurden die Ausprägung einer Diät induzierten Adipositas, Futteraufnahme, Fettmasse und die Bewegung der Tiere. Für die genetische Analyse wurden eine Single Nukleotid Polymorphismen (SNP) Analyse durchgeführt. Im Ergebnis zeigte sich, dass der C57BL/6JRj Stamm gegenüber einer Diät induzierte Adipositas geschützt ist, während der C57BL/6NTac Stamm eine signifikante Gewichtszunahme unter Hochfettbedingungen aufweist. Die tägliche Futteraufnahme der C57BL/6NTac Mäuse war signifikant reduziert, obwohl die relative viszerale Fettmasse über 50 Prozent zunahm. Die physische Aktivität zwischen beiden Substämmen unterschied sich nicht. Die genetische SNP Analyse ergab, dass sich beide Stämme in 11 SNPs voneinander unterscheiden.

Zusammenfassend zeigt die Arbeit, dass sich die Substämmen, C57BL/6NTac und C57BL/6JRj, der Mauslinie C57BL/6 phänotypisch und genetisch voneinander unterscheiden. Diese Arbeit unterstreicht die Wichtigkeit der kontinuierlichen Überwachung des genetischen Hintergrundes insbesondere bei der Nutzung von transgenen Tieren.

# 1. Einführung in die Thematik

## 1.1 Definition und Epidemiologie der Adipositas

Adipositas ist durch eine Zunahme der Fettgewebsmasse gekennzeichnet. Zur Diagnose der Adipositas dient die Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen anhand des Body–Mass–Index (BMI) nach den Leitlinien der Deutschen Adipositas Gesellschaft [1]. Die Prävalenz der Adipositas (BMI > 30kg/m<sup>2</sup>) nimmt auch in Deutschland seit vielen Jahren kontinuierlich zu und liegt im Moment bei etwa 20,5% der Männer und 21,1% der Frauen [2,3]. Besonders bei Kindern und Jugendlichen sowie bei jungen Erwachsenen hat die Adipositas in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Inzwischen lässt sich auch bei Kindern und Jugendlichen eine Prävalenz des Metabolischen Syndroms von 5–10% nachweisen [2]. Die Prävalenz des Metabolischen Syndroms in Deutschland liegt bei etwa 23,8% (Frauen 21,0%, Männer 26,6%) [4].

## 1.2 Entstehung von Adipositas

Adipositas entwickelt sich auf der Grundlage und Wechselwirkung genetischer Faktoren mit Verhaltensmustern, Lebensgewohnheiten und Umwelteinflüssen. Obwohl genetische Faktoren [5] für die Manifestation der Adipositas eine hohe Bedeutung haben, sind die entscheidenden genetischen Veränderungen bisher nur zum Teil bekannt [6]. Monogenetische Adipositasursachen sind sehr selten und manifestieren sich vor allem im Kindesalter. Mit einer Prävalenz von bis zu 5% sind Mutationen im Melanocortin–Rezeptor–4 (MC4R)–Gen die häufigste Ursache einer frühkindlichen Adipositas [7] während andere monogene Formen der Adipositas, wie zum Beispiel Mutationen im Leptingen, bisher nur in wenigen Familien weltweit nachgewiesen wurden [8]. Erst kürzlich wurde in genomweiten Assoziationsstudien in 13 verschiedenen Kohorten mit mehr als 38.000 Teilnehmern eine Variante im so genannten FTO–Gen identifiziert, die eng mit einem erhöhten BMI bei Kindern und Erwachsenen assoziiert ist [9]. Die funktionelle Bedeutung dieser genetischen

Variante bei der Adipositasentwicklung muss allerdings noch geklärt werden. Ähnliche Studien könnten mit Hilfe von „Single nucleotid polymorphisms“ (SNPs) zur Aufklärung der Genetik der Adipositas in den nächsten Jahren beitragen. Die Rolle genetischer Faktoren wird bisher jedoch nicht in einem Masse verstanden, um sie für Prävention oder Therapie der Adipositas nutzen zu können. Folglich spielt eine genetische Diagnostik in der klinischen Routine außerhalb wissenschaftlicher Fragestellungen gegenwärtig keine Rolle. Hyperkalorische Ernährung und Bewegungsmangel sind beeinflussbare Risikofaktoren für die Entstehung von Adipositas. Zur Adipositas kann es kommen, wenn langfristig eine positive Energiebilanz herrscht, wobei inadäquat hohe Energiezufuhr und Bewegungsmangel bei genetisch prädisponierten Personen die Hauptursachen für den Anstieg des Körpergewichts sind [10,11,12]. Adipositas ist ein wesentlicher pathogenetischer Faktor bei der Entwicklung eines metabolischen Syndroms. Allerdings scheint ein einzelner ätiologischer Faktor für das Metabolische Syndrom nicht zu existieren. Insulinresistenz, viszerale Adipositas, Dyslipidämie und arterielle Hypertonie wurden in einer multiplen Faktorenanalyse als die wesentlichen Mechanismen in der Pathogenese des metabolischen Syndroms identifiziert [13,14,15,16].

### ***1.3 Fettverteilungsmuster und Einflussfaktoren***

Bereits vor 60 Jahren wurde von Jean Vague [17] beobachtet, dass bei Patienten mit Oberkörper–betonter Adipositas (androide Adipositas, Apfelform) im Vergleich zu Patienten mit gynäkoider Adipositas (Unterkörper–betonte Adipositas, Birnenform) häufiger Komplikationen, wie Diabetes mellitus Typ 2, Gicht und kardiovaskuläre Erkrankungen auftreten [17]. Somit ist die gynäkoide Fettverteilung, die sich durch subkutane Fettablagerungen in der Gesäßgegend und an den Oberschenkeln auszeichnet, mit einem wesentlich geringeren Gesundheitsrisiko verbunden [17,18].

*Einflussfaktoren der viszeralen Fettmasse.* Die viszerale Fettmasse unterliegt sowohl bei schlanken als auch bei übergewichtigen Patienten kaum Schwankungen, während die subkutane Fettmasse sehr variabel ist und stärker von externen Einflussfaktoren bestimmt zu sein scheint [19,20]. Der Einfluss genetischer Faktoren auf die subkutane Fettmasse liegt nur bei etwa 5%, während die viszerale Fettmasse zu etwa 50% genetisch determiniert ist, wie Familienstudien und Untersuchungen mit monozygoten Zwillingen zeigten [21,22,23]. Für die starke genetische Komponente der viszeralen Fettverteilung spricht auch, dass vor kurzem fettdepotspezifische Expressionsmuster von Genen der Embryonalentwicklung gefunden wurden, die sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen die viszerale Fettmasse und metabolische Veränderungen vorhersagen können [24]. Diese Daten weisen darauf hin, dass genetisch programmierte Unterschiede in der Entwicklung und Differenzierung von Adipozyten zur Entstehung von viszeraler Adipositas beitragen.

Neben genetischen Faktoren bestimmen Alter, Geschlecht, die Gesamtkörperfettmasse sowie die Energiebilanz die viszerale Fettmasse und Fettverteilung [19,20]. Dabei spielt das Geschlecht für das Fettverteilungsmuster eine besondere Rolle, wie die Differenzierung in androide (bauchbetonte) und gynäkoide (hüftbetonte) Adipositas schon begrifflich verdeutlicht [25]. Östrogen und Testosteron beeinflussen das Fettverteilungsmuster, wobei die Wirkungen der Sexualsteroiden auf Adipozyten unterschiedlicher Lokalisationen komplex sind und bisher nicht vollständig verstanden werden. Androgenrezeptoren werden in beiden Geschlechtern vermehrt im viszeralen Fettgewebe gefunden und Östrogenrezeptoren scheinen zumindest bei Männern verstärkt im subkutanen Fettdepot exprimiert zu sein, wobei bei Frauen keine unterschiedliche Östrogenrezeptorexpression in Abhängigkeit von der Fettgewebslokalisierung gefunden wurde [19,20].

In epidemiologischen Studien wurde die viszerale Adipositas als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen [26] und Diabetes mellitus Typ 2 [27] identifiziert.

## 2. Modelltiere der Adipositas

In der Adipositasforschung steht eine Vielzahl von Modelltieren zur Verfügung. Angesichts der klinischen Vielfalt und des polygenen Charakters der humanen Adipositas und Adipositas-assoziierten Erkrankungen sowie der genetischen Heterogenität und den variierenden Umwelteinflüssen werden die Untersuchungen beim Menschen erschwert. Mittels Modelltieren können die Umweltkomponenten standardisiert und die genetische Heterogenität minimiert werden. Die am häufigsten genutzten Modelle sind dabei die Nager (Ratten und Mäuse). Die Generationszeiten unterscheiden sich zwischen Ratten und Mäusen nicht, jedoch haben Ratten gegenüber den Mäusen den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer Größe mehr biologisches Material für wissenschaftliche Zwecke aufweisen. Mäuse wiederum sind aufgrund ihrer Größe in der Haltung günstiger, und haben aber den entscheidenden Vorteil, dass sie im transgenen Sektor seit den 1990ern etabliert sind. Die Generierung von transgenen knockout Ratten steckt bisher noch in den Anfängen.

### 2.1 Zucker fatty Ratte (ZFR)

1961 wurde von L.M. Zucker und T.F. Zucker eine wegweisende Entdeckung in der Adipositasforschung gemacht [28]: eine autosomal rezessive Mutation im *fatty (fa)* Gen auf Chromosom 5 in der Ratte. Diese Ratten sind durch Hyperphagie und bereits in einem Alter von 5 Wochen durch Adipositas charakterisiert [28]. Obwohl die Zucker fatty Ratten einen Insulinresistenz aufweisen [29], bleibt der Blutglukosespiegel normal [30]. Die Zucker fatty Ratten entwickeln keinen Diabetes [30], doch ein Substamm der Zucker fatty Ratten ist diabetisch und wurde als Zucker diabetic fatty (ZDF) Ratte bezeichnet [31].



## 2.2 Wistar fatty Ratte (WFR)

1981 berichtete Ikeda und Mitarbeiter von einem weiteren Adipositas Rattenmodell, der Wistar fatty Ratte (WFR) [32]. Der WFR Stamm leitet sich von den Zucker fatty Ratten ab, denn es wurde das *fa* Gen der Zucker fatty Ratten in die Wistar Kyoto Ratten transferiert, welche eine schlechte Glukosetoleranz aufweisen [32]. Die Wistar fatty Ratten sind ab der dritten Lebenswoche adipös und entwickeln Adipositas abhängige Krankheiten, wie Diabetes mellitus Typ II, Hyperinsulinämie und Hyperlipidämie [32]. Metabolische Auffälligkeiten sind überwiegend in den männlichen WFRs zu finden, jedoch nicht bei den weiblichen Wistar fatty Ratten, welche lediglich eine schwache Insulinresistenz und Glukoseintoleranz zeigen [32]. Das Auftreten des Diabetes in den Wistar fatty Ratten und nicht in den Zucker fatty Ratten trotz der *fa* Mutation in beiden Stämmen, könnte durch weitere genetische Faktoren der Wistar fatty Ratte erklärt werden. Der Wistar fatty Rattenstamm wird häufig in der Diabetes Typ II Forschung eingesetzt, denn ältere Ratten zeigen diabetische Folgeerkrankungen wie Nephropathie und Neuropathie [33,34,35,36].

## 2.3 *agouti* Maus

Die *Lethal Yellow Mutant* ( $A^y$ ) bzw. *agouti* Maus [37], vor mehr als 100 Jahren das erste Mal erwähnt, wurde von Bultman et al. 1992 das *agouti* Protein kloniert und als erstes „Adipositas Gen“ charakterisiert [38]. *Agouti* ist ein Pigment-Kontrollgen, welches in Pigmentzellen der Haut exprimiert wird und die Produktion von schwarzem oder braunem Pigment inhibiert. Die  $A^y$  Maus ist eine von fünf gefundenen Mutationen im *agouti* Gen und erwies sich als ideales Mausmodell für Adipositas [38]. Die  $A^y$  Mutation ist durch eine 120 – 170kb große Deletion im *agouti* Gen charakterisiert, welche zu einer ubiquitären *agouti* Expression führt, da der gewebsspezifische Promoter fehlt [39,40,41]. Die  $A^y$  Maus weist folgende Eigenschaften auf: gelbes Fell, adipös, Diabetes mellitus Typ II, erhöhten Leptinspiegel und Infertilität [38]. Mäuse mit einer fettspezifischen *agouti* Überexpression weisen eine übermäßige Zunahme

von Fettgewebe auf, ohne erhöhte Futteraufnahme, was auf eine Veränderung im Stoffwechsel hinweisen könnte [42]. Die Expression des *agouti* Gens konnte in humanem Fettgewebe nachgewiesen werden [43,44] und ist im Fettgewebe von Typ II Diabetikern erhöht [45].

#### **2.4 New Zealand Obese (NZO) Maus**

Die *New Zealand Obese (NZO)* Maus ist ein polygenetisches Modell für Adipositas, welche einen Diabetes mellitus Typ II entwickeln, allerdings nur in männlichen Tieren [46]. Die NZO Mäuse nehmen in den ersten beiden Lebensmonaten schnell an Körpergewicht zu, aufgrund von Hyperphagie, die mit Leptinresistenz assoziiert ist [46]. Sie weisen in einem Alter von 6 Monaten eine Körperfettmasse von bis zu 40% des Gesamtkörpergewichts auf [47]. Des Weiteren weisen NZO Mäuse eine verminderte physische Aktivität im Vergleich zu Kontrolltieren auf [48].

#### **2.5 Kuo Kondo (KK) Maus**

Die *Kuo Kondo (KK)* Maus ist ebenfalls ein polygenetisches Modell für Adipositas, welches außerdem Diabetes mellitus Typ II entwickelt [46]. Die KK Maus wurde in Japan mittels selektiver Inzucht für eine größere Körpergröße gezüchtet [49]. Die KK Maus weist Hyperphagie, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz auf [50,51]. Die Insulinresistenz in den KK Mäusen führt zur Adipositas dieser Tiere [52]. Der KK Mausstamm wurde in den KKA<sup>Y</sup> Mausstamm mittels Transfer des *Lethal Yellow Obese (A<sup>Y</sup>)* Gens modifiziert und diese Linie wird häufig als Modell zur Untersuchung der Adipositas [53] genutzt.

## 2.6 *db/db Maus*

Zu den klassischen Maus Adipositasmodellen zählen die *ob/ob* und die *db/db* Mäuse. Beide Modelle besitzen eine spontan auftretende Mutation im Leptin- (*ob/ob*) bzw. im Leptinrezeptorgen (*db/db*).

Die *db/db* Maus fiel 1966 in den Jackson Laboratories auf, als sie zunächst mit einer erhöhten Futteraufnahme auffiel [54]. Das Diabetes Gen (*db*) wird als autosomal rezessives Merkmal vererbt. Das *db* Gen weist eine Punktmutation von Guanin zu Thymin im Leptinrezeptor auf, was zu alternativem Splicing und somit zu einem fehlerhaften Signalweg des Leptins führt [55,56]. Das Fehlen des Leptinsignal im Hypothalamus führt zu persistierender Hyperphagie und Adipositas mit hohen Leptin- und Insulinspiegeln [57]. Die *db/db* Maus entwickelt eine Hyperglykämie mit Glukosewerten von  $9,7 \pm 1,6$ mmol/l im Alter von 8 Wochen und Werte von  $15,7 \pm 4,3$ mmol/l im Alter von 10 Wochen [58]. Der zunehmende Anstieg von Futter- und Wasserbedarf ist mit der Zunahme an Körpergewicht bis zu einem Alter von 4 bis 5 Monaten assoziiert. Die Futteraufnahme beträgt im Mittel ca. 40g pro Woche bis zu einem Alter von 16 Wochen. Die Wasseraufnahme beträgt vor dem Einsetzen der Hyperglykämie durchschnittlich 30ml pro Woche, steigt danach auf bis zu 100ml pro Woche an [58]. Mit fortschreitendem Diabetes steigen die mittleren Blutglukosewerte von durchschnittlich  $28,6 \pm 13,2$ mmol/l auf bis zu 44mmol/l im Alter von 16 Wochen an [58,59]. Im Alter von 5 bis 6 Monaten, fallen Körpergewicht und Insulinspiegel in Assoziation mit der Inselzelldegeneration ab [60]. Zu diesem Zeitpunkt haben die *db/db* Mäuse ein so hohes Körpergewicht, dass sie in ihrer Mobilität so sehr eingeschränkt sind, dass sie kaum noch Futter und Wasser aufnehmen können und schließlich verenden [54].

## 2.7 *ob/ob* – Maus

Das Maus *ob/ob* Syndrom wurde 1949 in einem Auszuchtstamm von B. Roscoe im Jackson Memorial Laboratory (Bar Harbor, USA) entdeckt [61] und wurde, in den bis dahin gut charakterisierten C57BL Stamm, der während der 1930 Jahre etabliert wurde, transferiert [62].

Die offensichtlichen Merkmale der Leptin-defizienten *ob/ob* Mäuse sind ihr extremes Übergewicht und ihre erhöhte Futtermittelaufnahme. Sie sind außerdem hyperinsulinämisch, hyperglykämisch und hyperlipidämisch [63,64] und sind somit als Modelltier für die Diabetes- und Adipositasforschung prädestiniert. Sie zeigen des Weiteren eine gestörte Thermoregulation und eine verringerte physische Aktivität. Die Inselzellen der Pankreas sind vergrößert und enthalten eine erhöhte Anzahl von insulinproduzierenden Betazellen [62]. Es wurden noch weitere Merkmale der *ob/ob* Mäuse bekannt. Sie sind z.B. infertil und weisen eine gestörte Immunfunktion auf [62].

Bei der Geburt zeigen die *ob/ob* Tiere keine phänotypischen Unterschiede zu Wildtyp Tieren auf. Doch innerhalb von zwei Wochen nehmen sie deutlich an Gewicht zu und entwickeln eine Hyperinsulinämie. Die Blutglukose erreicht ihr höchstes Level im Alter von 3 bis 5 Monaten, zu dieser Zeit hat sich auch die Futtermittelaufnahme der Tiere drastisch erhöht und damit auch das Körpergewicht [65,66,67].

Interessanterweise zeigte sich abhängig vom genetischen Hintergrund, dass die Ausprägung der Adipositas beträchtlich variiert [68,69]. *Ob/ob* Mäuse mit C57BL/6J Hintergrund zeigen eine milde Form der Hyperglykämie, teilweise erst im fortgeschrittenen Alter und Glukosurie tritt nach Nahrungskarenz nicht auf. Dagegen sind *ob/ob* Mäuse mit BTBR (black and tan, brachyuric) Hintergrund diabetisch mit einer verkürzten Lebenserwartung [70,71] und zeigen eine höhere Futtermittelaufnahme als *ob/ob* Mäuse mit 6J Hintergrund [33]. Die *ob/ob* Maus unterscheidet sich von der *db/db* Maus insoweit, dass bei ihr eine Defizienz der Leptinproduktion vorliegt, der Leptinsignalweg jedoch intakt ist.

## **2.8 C57BL/6 Substämme und Diät – Induzierte Adipositas**

Untersuchungen mit unterschiedlichen Hintergrundstämmen zeigen, wie wichtig es ist, einen „genetisch sauberen“ Hintergrund [73,74] auszuwählen.

Der Inzuchtstamm, C57BL/6, ist einer der ältesten und weltweit verbreiteten Inzuchtstämmen. Er wird als Kontrollstamm, in der neurologischen, immunologischen Forschung und auch für Diät-induzierte Adipositasstudien vielfach eingesetzt [74,75]. C57BL/6 wird auch „C57 black 6“ oder nur „Black 6“ genannt. Diät-induzierte Adipositas (DIO, Diet Induced Obesity) ist ein Modell um Adipositas assoziierte Erkrankungen, z.B. Diabetes mellitus Typ 2 zu untersuchen. Hierbei werden Mäuse über einen mehrwöchigen Zeitraum mit einer Hochfett Diät gefüttert. In dieser Zeit entwickeln die Mäuse ein Übergewicht, einen erhöhten Blutglukosespiegel verbunden mit einer verminderten Glukosetoleranz. In diesem Modell können die genetischen und physiologischen Mechanismen der Adipositas untersucht werden.

Der C57BL/6 Mausstamm wurde vom C57BL Stamm abgeleitet, welcher in den 1920er Jahren von C.C. Little in den Jackson Laboratories etabliert wurde. Mitte der 1930er Jahre ging der C57BL/6 neben dem C57BL/10 Stamm aus dem C57BL Stamm hervor. Mehr als neun C57BL/6 Substämme wurden in den 1970er Jahren generiert [75,76,77]. Als Substämme werden sie bezeichnet, wenn sie als Zweig eines Inzuchtstammes hervorgehen und bekannt ist oder vermutet wird, dass er sich genetisch vom Originalstamm aufgrund folgender Konditionen unterscheidet.

Erstens, wenn sich Zweige eines Stammes nach 20 bis 40 Inzuchtgenerationen separiert haben. Zweitens, sich die Substämme nach 20 Generationen vom ursprünglichen Vorfahren separiert haben und drittens sich die Substämme genetisch unterscheiden [78]. Der C57BL/6J Stamm aus den Jackson Laboratories und der C57BL/6N des „National Institut of Health“ (NIH) sind die wichtigsten Substämme der C57BL/6 Mäuse, welche während den 1940er und 1950er Jahren etabliert wurden [79, 80]. Die C57BL/6JRj Mäuse wurden in der

172. Inzuchtgeneration (F<sub>172</sub>) 1993 von CSAL Orleans bei Janvier eingeführt, entsprechend dem Produktkatalog von Janvier [81].

Seitdem wird berichtet, dass sich die C57BL/6 Substämme phänotypisch unterscheiden [75], besonders im Verhalten[82,83,84], in der Glukose- und Insulintoleranz[85,86], auf Alkohol [87,88] und Medikamente [89,90]. Diese phänotypischen Unterschiede zwischen den Substämmen weisen auf genetische Differenzen hin, die mittels (SNP) Analysen untersucht werden können.

### 3. SNP – Single Nucleotide Polymorphism

Mit Einzelbasen-Polymorphismen (SNP, engl. Single Nucleotide Polymorphism) werden Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang bezeichnet, z.B. der Austausch des Cytosin ACTGCACTA in ein Thymin ATTGCACTA [[http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human\\_Genome/faq/snps.shtml](http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml)]. Mit Hilfe der SNP Genotypisierung kann man genetische Variationen, welche aus nur einem einzigen Nukleotid bestehen, identifizieren und analysieren. Hat man eine solche Variation gefunden, kann man diese mit Hilfe von internationalen Datenbanken im Internet abgleichen und feststellen, ob es sich um eine häufige Normvariante, oder eine eventuell krankheitsrelevante Variation handelt.

In den 1980er Jahren wurden die SNPs durch das Phänomen der Restriktionsfragmentlängen beim genetischen Fingerabdruck des Menschen entdeckt [91]. Einzelbasenaustausche in der DNA führen zu veränderten „Schnittmustern“ von Restriktionsenzymen, deren Erkennungsstelle durch den Einzelbasenaustausch verändert oder neu eingefügt wird. Im Verlauf der 1990er Jahre wurden die SNPs in Form der Restriktionspolymorphismen weitestgehend von den „short tandem repeats“, STR (engl. für kurze hintereinander auftretende Wiederholungen von Basenpaar-Mustern) als Marker in Kopplungsstudien ersetzt. Doch Ende der 1990er Jahre gewannen die SNPs zunehmend an

Bedeutung unter den Molekulargenetikern. SNPs sind in großer Anzahl vorhanden und stabiler als die STRs aufgrund niedriger Mutationsraten.

Es gibt zahlreiche Referenzsequenzen in internationalen Datenbanken (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, HapMap <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>, Ensembl <http://www.ensembl.org>) anhand derer SNPs, die bei der Sequenzierung gefunden wurden, identifiziert werden können. Dabei kann man auch feststellen, ob es sich um eine häufige Normvariante, oder eine eventuell krankheitsrelevante Variation handelt. Mit Hilfe der SNP – Genotypisierung kann man diese genetischen Variationen in größeren Populationen untersuchen und Phänotyp–bezogen statistisch analysieren.

#### **4. Ziel der Arbeit**

Der C57BL/6 Stamm wird als Kontrollstamm für Diät–induzierte Adipositasstudien vielfach eingesetzt. Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass sich die C57BL/6 Substämme phänotypisch und auch genetisch voneinander unterscheiden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit zu untersuchen, ob sich

- i) zwei Substämme von C57BL/6, der C57BL/6NTac und der C57BL/6JRj Stamm, sich hinsichtlich einer Ausprägung einer Diät–induzierten Adipositas unterscheiden und
- ii) ob es genetische Unterschiede zwischen den Substämmen gibt.

## 5. Publikation der vorliegenden Arbeit

Biochemical and Biophysical Research Communications 417 (2012) 717–720



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)



### C57BL/6JRj mice are protected against diet induced obesity (DIO)

Matthias Kern<sup>a</sup>, Anja Knigge<sup>a</sup>, John T. Heiker<sup>a</sup>, Joanna Kosacka<sup>a</sup>, Michael Stumvoll<sup>a</sup>, Peter Kovacs<sup>b</sup>, Matthias Blüher<sup>a,c</sup>, Nora Klötting<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Medicine, Endocrinology/Diabetes, University of Leipzig, Germany

<sup>b</sup> Interdisciplinary Center for Clinical Research, University of Leipzig, Germany

<sup>c</sup> IFB AdiposityDisease, University of Leipzig, Germany

<sup>d</sup> IFB AdiposityDisease, Junior Research Group 2 "Animal models of obesity", University of Leipzig, Germany

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 29 November 2011

Available online 8 December 2011

##### Keywords:

C57BL/6 substrain  
Diet induced obesity  
Genetic background  
DIO

#### ABSTRACT

The C57BL/6 (B6) is one of the oldest inbred mouse strains. It has been widely used as control strain in metabolism research for many decades. Preliminary data from our lab indicated that C57BL/6JRj mice are not responding to diet induced obesity. Therefore, the aim of this study was to compare the two different B6 substrains, C57BL/6NTac and C57BL/6JRj, in regard to their response to diet induced obesity (DIO) and to investigate genetic differences which may explain such phenotypic differences. Sixteen male mice of C57BL/6NTac and C57BL/6JRj were fed a high fat diet (HFD) or standard chow diet (SD) for 10 weeks. Phenotypic characterization included measurements of bodyweight, physical activity, food intake and relative epigonadal fat mass. Genetic differences between both substrains were analyzed using a panel of 1449 single nucleotide polymorphism (SNP) markers. Our study revealed that C57BL/6JRj mice are protected against DIO independently from food intake and physical activity. Genetic SNP analysis among C57BL/6 mice identified genetic differences in at least 11 SNPs. Our data strongly support the importance of attention on the genetic background in obesity research.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Experimental animal models offer a great opportunity to overcome genetic heterogeneity and various environmental factors influencing obesity and associated disorders. The C57BL/6 (B6) is one of the oldest inbred mouse strains. This strain is widely used as a control strain in metabolism research and serves as a background strain for spontaneous and induced mutant mice [1–3].

The C57BL strain was established by C.C. Little in the 1920s. In the mid 1930s the C57BL/6 strain was separated from the C57BL parent strain along with C57BL/10. More than nine C57BL/6 substrains were generated during the 1970s [4,5]. Substrains are defined as branches of an inbred strain that are either known or suspected to be genetically different from the original inbred strain due to any of the following rules: (i) branches of a strain which were separated after 20 but before 40 generations of inbreeding, (ii) branches separated by more than 20 generations from a common ancestor, (iii) genetic differences between branches [6].

C57BL/6J of The Jackson Laboratory and C57BL/6N of the National Institutes of Health (NIH) are core substrains of C57BL/6 that were developed from the ancestral C57BL/6 line during the 1940s and 1950s [6–8]. C57BL/6JRj mice were transferred from Centre de Service des Animaux de Laboratoire (Orleans, France) to Janvier at F172 in 1993, according to the Janvier product catalog.

Preliminary data from our lab in a study on weight cycling [9] indicated that C57BL/6JRj mice did not respond to diet induced obesity. Phenotypic differences among C57BL/6 substrains have been reported with respect to behavior [10–12], glucose and insulin tolerance [13] as well as responsiveness to alcohol [14] and drugs [2–3,15]. Furthermore, genetic differences among C57BL/6 substrains have been investigated [1,2]. However, to our knowledge no study has combined both approaches to characterize genetic and phenotypic differences between C57BL/6 substrains, C57BL/6NTac and C57BL/6JRj.

Here, we demonstrate that the core substrains of C57BL/6, C57BL/6NTac and C57BL/6JRj, feature a remarkably divergent responsiveness to high fat diet induced obesity. We have further identified several SNPs between both C57BL/6 strains. These data provide a useful guide for biomedical researchers in selecting an appropriate substrain for metabolic studies and points out the relevance of the genetic background in engineering of experimental models such as transgenic mice.

\* Corresponding author at: University of Leipzig, IFB AdiposityDisease, Junior Research Group 2, Liebigstr. 21, D-04103 Leipzig, Germany. Fax: +49 341 9713400. E-mail address: [nora.kloeting@medizin.uni-leipzig.de](mailto:nora.kloeting@medizin.uni-leipzig.de) (N. Klötting).



## 2. Methods

### 2.1. Animals

In 2007 breeding pairs from Taconic Farms, Inc. (C57BL/6NTac; Hudson, New York, USA, F198) and from Janvier (C57BL/6JRj; Le Genest Saint Isle, France, F142) were obtained and bred since that time in our own animal facility under standardized environmental conditions. Mice of both strains at the 11th inbred (F11) generation were used for these experiments. Animals were kept in groups of four in Macrolon cages (Size 2, Ehret, Emmendingen, Germany) under strict hygienic conditions. They had free access to food and water and were maintained at 12 h light and dark cycle (5 AM/5 PM).

All experiments were conform to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and were approved by the local authorities of the state of Saxony, Germany as recommended by the responsible local animal ethics review board.

### 2.2. Phenotyping

Eight male mice of each strain and diet group were fed a high fat diet with 40% kcal from fat (C1057, Altromin, Lage, Germany) or standard chow diet (Ssniff, Soest, Germany) with 9% kcal from fat for 10 weeks beginning at the age of 8 weeks. Bodyweight was recorded weekly, food intake and physical activity were measured for 5 days in week 16. At the end of the observation period relative visceral fat mass was analyzed.

### 2.3. Physical activity

We investigated wheel-running activity of both mouse strains under different diets to gain insight into physical effort. Mice of each strain were housed for 5 days in cages containing activity wheels (Intellibio, Nomeny, France). Wheels were connected to a system that used magnetic sensor to record wheel rotations interfaced with a PC. The mice had free access to the wheel and the following parameters were recorded: speed, acceleration (average and maximum), and distance (mean/run and over 24 h period).

### 2.4. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping

Genomic DNA was extracted from tail tips using the DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). Genotyping of 1.449 SNP loci covering the genome was carried out using Golden Gate assay (Illumina Inc., San Diego, California, USA) [1]. SNP genotyping was performed by Taconic, Albany-Molecular Analysis Laboratory, New York, USA. 129S1/Sv, Balb/cj and F1 cross between C57BL/6NTac and C57BL/6JRj served as control strains.

### 2.5. Data analysis and statistics

Data are given as means  $\pm$  SD. Datasets were analyzed for statistical significance using a two-tailed unpaired *t* test, or differences were assessed by one-way ANOVA using the Statistical Package for Social Science, version 18.0 (SPSS, Chicago, IL). *p*-values <0.05 were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Phenotypes

As shown in Fig. 1A C57BL/6JRj mice are protected against diet induced obesity whereas C57BL/6NTac mice exhibit a strong DIO

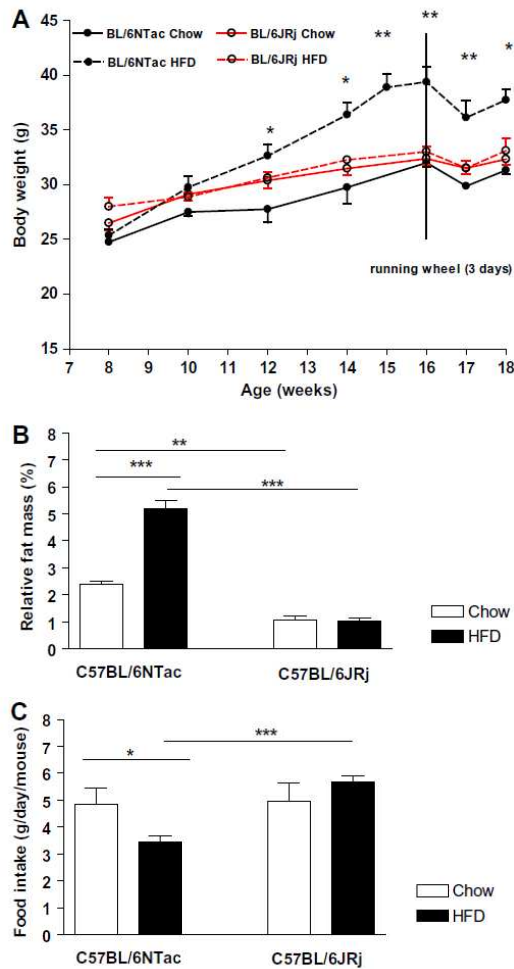


Fig. 1. Phenotype. Body weight gain (A), relative epigonadal fat mass (B), and food intake (C) of C57BL/6JRj and C57BL/6NTac mice under chow and HFD conditions. Significantly different at \*0.05, \*\*0.01, and \*\*\*0.001 *p*-value level.

responsiveness under HFD. In contrast, body weight gain of the C57BL/6JRj strain was comparable between standard and HFD groups. Standard chow fed C57BL/6NTac mice already featured a significantly higher relative epigonadal fat mass compared to the C57BL/6JRj mice and relative fat mass was significantly increased only in C57BL/6NTac under high fat diet conditions (Fig. 1B). Under HFD C57BL/6NTac mice showed reduced daily food intake by about 40% whereas food intake of C57BL/6JRj was indifferent of the diet (Fig. 1C). Physical activity, measured as running distance, duration and average speed and acceleration per day, was not different between both strains and diet conditions (Table 1).

### 3.2. Genetics

SNP genotyping was carried out for 1.449 SNP loci. 1430 (98.7%) targeted loci were successfully genotyped. As shown in Table 2, 11

**Table 1**  
Physical activity.

	C57BL/6Jrj		C57BL/6NTac	
	Chow	HFD	Chow	HFD
Av. speed (rev/min)	21.1 ± 1.0	20.7 ± 0.4	20.8 ± 1.7	19.9 ± 1.0
Max. speed (rev/min)	28.6 ± 1.9	27.1 ± 2.0	28.2 ± 3.8	27.0 ± 1.3
Av. acceleration (cm/s <sup>2</sup> )	3.5 ± 0.2	3.2 ± 0.4	2.9 ± 0.2	4.0 ± 0.7
Max. acceleration (cm/s <sup>2</sup> )	64.8 ± 4.4	58.9 ± 9.0	58.4 ± 9.5	63.6 ± 5.9
Distance (km/day)	2.8 ± 0.4	3.1 ± 0.2	3.0 ± 1.0	2.7 ± 0.7

**Table 2**  
SNP differences between C57BL/6Jrj and C57BL/6NTac.

No.	SNP ID	Chr.	Position (bp) NCBI	Linked gene	C57BL/6NTac	C57BL/6Jrj
1	rs13478783	6	62,742,498	–	G/G	A/A
2	rs13479522	7	128,856,948	–	G/G	A/A
3	rs13480122	9	28,415,943	<i>Ap1p2</i>	C/C	T/T
4	rs13480619	10	58,570,319	–	C/C	T/T
5	CEL-10_58149652	10	57,865,252	<i>Lims1</i>	A/A	G/G
6	rs13480759	10	111,319,127	–	T/T	C/C
7	rs13481014	11	52,702,597	–	C/C	T/T
8	rs13481734	13	27,266,316	–	G/G	A/A
9	CEL-14_116404928	14	124,509,120	<i>Fgf14</i>	A/A	G/G
10	rs4165065	16	17,985,036	<i>Snap29</i>	C/C	T/T
11	rs13483055	17	64,657,526	–	C/C	T/T

Data for SNP position and SNP allele was obtained from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>.

SNPs were detected between C57BL/6Jrj and C57BL/6NTac, indicating that 0.75% of SNP loci are genetically distinct between C57BL/6Jrj and C57BL/6NTac mice.

#### 4. Discussion

Our data demonstrate explicit phenotypical differences under high fat diet and identified accompanying genetic disparity between C57BL/6NTac and C57BL/6Jrj substrains. While C57BL/6NTac mice responded robustly to a high fat diet, the C57BL/6Jrj strain was protected against diet induced obesity. Interestingly, a previous study comparing DIO responsiveness of C57BL/6J and C57BL/6Nj (both from Jackson Laboratory) substrains found both strains highly sensitive to DIO [3]. Under HFD daily food intake of C57BL/6NTac mice was significantly reduced, although relative fat mass increased by about 50%, as expected. These adverse findings are in agreement with previous results, using B6/J and B6/Nj, where HFD fed C57BL/6Nj mice featured greater adiposity despite lower food consumption compared to C57BL/6J mice [3]. In our study, the lacking responsiveness to DIO for the C57BL/6Jrj mice cannot be explained by increased physical activity nor by changes in food intake. Non-responding C57BL/6Jrj had a significantly higher food intake under both chow and HFD and physical activity did not differ between both strains. Despite the lower food intake C57BL/6NTac mice featured higher relative visceral fat mass under standard chow and HFD. Indirect calorimetric analysis would be inevitable to clarify the difference between DIO sensitivity in these strains.

High DIO sensitivity of substrains C57BL/6J and C57BL/6Nj and absent responsiveness to DIO in C57BL/6Jrj, may indicate that C57BL/6J from Jackson Laboratory is separated from the here analyzed C57BL/6Jrj strain from Janvier. According to the product catalog of breeders, C57BL/6Jrj mice were introduced from Centre de Service des Animaux de Laboratoire (Orleans, France) to Janvier at F172 in 1993. Since it has been estimated that at least three recessive mutations are fixed to homozygosity at each inbreeding

generation [16] future experiments with both C57BL/6J and C57BL/6Jrj mice are required to identify more genetic differences which explain the different DIO responsiveness. Moreover genetic drift can result from the remaining heterozygosity within the original inbred strain or can also occur if spontaneous gametal mutations become fixed within the subcolony [17]. Our data clearly confirm genetic differences between C57BL/6J vs. C57BL/6N strains with respect to SNPs [1] and also indicate further SNP differences between C57BL/6J and C57BL/6Jrj strains. Bourdi and co-workers show that mispairing C57BL/6 substrains leads to confounding results as it did in studies of JNK2 in acetaminophen and concanavalin A induced liver injury [18], and further indicate the importance of the genetic background.

In summary, we demonstrate that core substrains of C57BL/6 (C57BL/6NTac and C57BL/6Jrj) have an explicit diverged responsiveness to DIO and we confirmed genetic differences between both C57BL/6 substrains. These data provide a solid basis for studies aimed at identifying of DIO protecting and promoting genetic factors. Furthermore, the data will be a valuable tool for biomedical researchers in selecting appropriate substrains for their specific research needs. Finally, our study points out the importance of continuous monitoring of the genetic background and substrain status of C57BL/6 mice.

#### Acknowledgments

We would like to thank Eva Bøge for technical assistance. This work was supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft Clinical Research group "Atherobesity" (KFO152; BL 833/1-1 and KL 2346) and Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, FKZ: 01EO1001 (N. Klötting).

#### References

- [1] K. Mekada, K. Abe, A. Murakami, S. Nakamura, H. Nakata, K. Moriwaki, et al., Genetic differences among C57BL/6 substrains, *Exp. Anim.* 58 (2009) 141–149.
- [2] S. Collins, T.L. Martin, R.S. Surwit, J. Robidoux, Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6j mouse: physiological and molecular characteristics, *Physiol. Behav.* 81 (2004) 243–248.
- [3] A. Nicholson, P.C. Reifsnnyder, R.D. Malcolm, C.A. Lucas, G.R. MacGregor, W. Zhang, et al., Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (*Nnt*) gene, *Obesity (Silver Spring)* 18 (2010) 1902–1905.
- [4] M.F. Festing, *Inbred Strains in Biomedical Research*, The Macmillan Press Ltd., London and Basingstoke, UK, 1979.
- [5] M.F. Festing, Origins and characteristics of inbred strains of mice, in: M.F. Lyon, S. Rastan, S.D.M. Brown (Eds.), *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Oxford University Press, Oxford, UK, 1996, pp. 1537–1576.
- [6] J.T. Eppig, Mouse strain and genetic nomenclature: an abbreviated guide, in: J.G. Fox, S.W. Barthold, M.T. Davisson, C.E. Newcomer, F.W. Quimby, A.L. Smith (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research, History, Wild Mice, and Genetics*, vol. 1, Elsevier Inc., London, UK, 2007, pp. 79–98, second ed.
- [7] P.L. Altman, D.D. Kats (Eds.), *Inbred and Genetically Defined Strains of Laboratory Animals, Part 1*, Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, MD, USA, 1979.
- [8] D.W. Bailey, Sources of subline divergence and their relative importance for sublines of six major inbred strains of mice, in: H.C. Morse III (Ed.), *Origins of Inbred Mice*, Academic Press, New York, NY, USA, 1978, pp. 197–215.
- [9] M. Kern, N. Klötting, J. Hebebrand, M. Stumvoll, M. Blüher, Effects of frequent weight cycling on longevity in C57BL/6 and 129Sv mice, *Diabetologia* 54 (Suppl 1) (2011) (abstract 269).
- [10] A.J. Grottick, D. Bagnol, S. Phillips, J. McDonald, D.P. Behan, D.T. Chalmers, et al., Neurotransmission- and cellular stress-related gene expression associated with prepulse inhibition in mice, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 139 (2005) 153–162.
- [11] F. Sluyter, C.C. Marican, W.E. Crusio, Further phenotypical characterisation of two substrains of C57BL/6j inbred mice differing by a spontaneous single-gene mutation, *Behav. Brain Res.* 98 (1999) 39–43.
- [12] O. Stiedl, J. Radulovic, R. Lohmann, K. Birkenfeld, M. Palve, J. Kammermeier, et al., Strain and substrain differences in context- and tone dependent fear conditioning of inbred mice, *Behav. Brain Res.* 104 (1999) 1–12.
- [13] H.C. Freeman, A. Hugill, N.T. Dear, F.M. Ashcroft, R.D. Cox, Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6j mice, *Diabetes* 55 (2006) 2153–2156.

- [14] M.L. Green, A.V. Singh, Y. Zhang, K.A. Nemeth, K.K. Sulik, T.B. Knudsen, Reprogramming of genetic networks during initiation of the fetal alcohol syndrome, *Dev. Dyn.* 236 (2007) 613–631.
- [15] B.A. Diwan, K.E. Blackman, Differential susceptibility of 3 sublines of C57BL/6 mice to the induction of colorectal tumors by 1, 2-dimethylhydrazine, *Cancer Lett.* 9 (1980) 111–115.
- [16] D. Bailey, How pure are inbred strains of mice, *Immunol. Today* 3 (1982) 210–214.
- [17] M.K. Mulligan, I. Ponomarev, S.L. Boehm II, J.A. Owen, P.S. Levin, A.E. Berman, et al., Alcohol trait and transcriptional genomic analysis of C57BL/6 substrains, *Genes Brain Behav.* 7 (2008) 677–689.
- [18] M. Bourdi, J.S. Davies, L.R. Pohl, Mispairing C57BL/6 substrains of genetically engineered mice and wild-type controls can lead to confounding results as it did in studies of JNK2 in acetaminophen and concanavalin a liver injury, *Chem. Res. Toxicol.* 6 (2011) 794–796.

## 6. Zusammenfassung

### Kumulative Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. med.

Unterschiede in der Entwicklung von Diät – induzierter Adipositas bei C57BL/6  
Substämmen

Eingereicht von: Matthias Kern  
Angefertigt an: Universität Leipzig, Medizinische Klinik III  
Betreut von: Prof. Dr. med. Matthias Blüher  
April 2012

**Hintergrund und Ziel.** Der C57BL/6 Stamm wird als Kontrollstamm, in Studien für Diät induzierte Adipositas oder als Hintergrundstamm für spontane oder induzierte Mutationen in Mäusen vielfach eingesetzt. Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass sich die C57BL/6 Substämmen phänotypisch und auch genetisch voneinander unterscheiden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob sich i) zwei Substämmen von C57BL/6, der C57BL/6NTac und der C57BL/6JRj Stamm, sich hinsichtlich einer Ausprägung einer Diät-induzierten Adipositas unterscheiden und ii) ob es genetische Unterschiede zwischen den Substämmen gibt.

**Methoden.** Seit 2005 werden beide Substämmen in Leipzig in der Arbeitsgruppe im Medizinisch-Experimentellen Zentrum (MEZ) der Universität Leipzig unter standardisierten Bedingungen gezüchtet. Alle Experimente wurden vom Sächsischen Ministerium (Regierungspräsidium Leipzig) genehmigt (TVV16/08).

Ab einem Lebensalter von acht Wochen sind acht männliche Tiere pro Stamm mit einer Hochfett Diät mit 40% kcal Fettgehalt (C1057, Altromin, Lage, Deutschland) und je acht Tiere mit einer Standard Diät (Ssniff, Soest, Deutschland) mit 9% kcal Fettgehalt über einen

Zeitraum von zehn Wochen gefüttert worden. Das Körpergewicht wurde wöchentlich erfasst, die Futteraufnahme und die physische Aktivität wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen in der 16. Lebenswoche ermittelt. Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurde die relative viszerale Fettmasse (relativ zum Körpergewicht) analysiert. Um die physische Bewegungsleistung der beiden Mausstämmen unter den verschiedenen Diäten zu ermitteln, wurden sie über einen Zeitraum von fünf Tagen in je einen Käfig mit einem Laufrad (Intellibio, Nomeny, Frankreich) gesetzt. Das Laufradsystem erfasst mittels eines magnetischen Sensors die Radumdrehungen, Geschwindigkeit, Beschleunigung (durchschnittlich und maximal) und die zurückgelegte Distanz innerhalb von 24 Stunden, welche über eine Schnittstelle die Daten an einen PC überträgt. Die Mäuse hatten freien Zugang zum Laufrad. Für die genetische Analyse wurde genomische DNA aus Schwanzspitzenbiopsien extrahiert (DNeasy Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Genotypisierung von 1449 SNP Loci des Genoms wurde unter Verwendung eines Golden Gate Assays (Illumina Inc., San Diego, California, USA) durchgeführt. Die SNP Genotypisierung wurde von Taconic (Albany-Molecular Analysis Laboratory, New York, USA) analysiert. Als Kontrollstämmen dienten 129S1/Sv, Balb/cJ und die F1 Kreuzung zwischen C57BL/6NTac und C57BL/6JRj.

Die statistischen Auswertungen wurden mittels SPSS, Version 18.0 (Statistical Package for Social Science, Chicago, USA) erhoben.

**Ergebnisse.** Der C57BL/6JRj Stamm ist vor einer Diät induzierten Adipositas geschützt. Nur der C57BL/6NTac Stamm zeigte unter Hochfettbedingungen eine signifikante Gewichtszunahme. Im Gegensatz dazu, waren die Körpergewichtsverläufe im C57BL/6JRj Stamm zwischen Standard- und Hochfettfutter vergleichbar. Die C57BL/6NTac Mäuse wiesen eine signifikant erhöhte relative viszerale Fettmasse im Vergleich zu den C57BL/6JRj Mäusen auf. Unter Hochfettbedingungen erhöhte sich die relative Fettmasse nur im C57BL/6NTac Stamm. Unter Hochfettdiät zeigen die C57BL/6NTac Mäuse eine um 40 Prozent reduzierte Futteraufnahme, wogegen die aufgenommene Futtermenge im C57BL/6JRj Stamm unabhängig vom Futter keine Unterschiede aufweist. Die physische

Aktivität, d.h. die zurückgelegte Distanz pro Tag, Laufdauer, Durchschnittsgeschwindigkeit und Beschleunigung, zeigen keine Unterschiede zwischen den Stämmen und des verabreichten Futters.

Die SNP Genotypisierung wurde für 1449 SNP Loci ausgeführt. 1430 (98,7%) gefundene Loci sind erfolgreich genotypisiert worden. Elf SNPs [siehe Tabelle 1] wurden zwischen C57BL/6JRj und C57BL6/NTac detektiert, das zeigt, dass 0,75% der überprüften SNP Loci der beiden Stämme C57BL/6JRj und C57BL6/NTac genetisch verschieden sind.

**Tabelle 1: SNP Unterschiede zwischen C57BL/6NTac und C57BL/6JRj**

Nr.	SNP ID	Chromosom	Position (bp) NCBI	linked gene	C57BL/6 NTac	C57BL/6 JRj
1	rs13478783	6	62.742.498	-	G/G	A/A
2	rs13479522	7	128.856.948	-	G/G	A/A
3	rs13480122	9	28.415.943	<i>Aplp2</i>	C/C	T/T
4	rs13480619	10	58.570.319	-	C/C	T/T
5	CEL-10_58149652	10	57.865.252	<i>Lims1</i>	A/A	G/G
6	rs13480759	10	111.319.127	-	T/T	C/C
7	rs13481014	11	52.702.597	-	C/C	T/T
8	rs13481734	13	27.266.316	-	G/G	A/A
9	CEL-14_116404928	14	124.509.120	<i>Fgf14</i>	A/A	G/G
10	rs4165065	16	17.985.036	<i>Snap29</i>	C/C	T/T
11	rs13483055	17	64.657.526	-	C/C	T/T

Die Daten für die SNP Position wurde über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP> ermittelt.

**Schlussfolgerungen.** Diese Daten zeigen deutlich eine phänotypische und genetische Disparität zwischen den untersuchten Maussubstämmen, C57BL/6JRj und C57BL6/NTac. Während der C57BL6/NTac Stamm stark auf die Hochfett-diät reagiert, ist der C57BL/6JRj Stamm gegenüber einer Diät induzierten Adipositas geschützt. Unter Hochfett-diät war die tägliche Futterraufnahme der C57BL/6NTac Mäuse signifikant reduziert, obwohl die relative viszerale Fettmasse über 50% zunahm. Diese vermeintlich im Kontrast stehenden Ergebnisse sind mit vorausgegangenen Studien übereinstimmend, bei denen gezeigt werden konnte, dass im Vergleich von C57BL/6J und C57BL/6NJ Mäusen unter Hochfett-diät die C57BL/6NJ einen höheren Körperfettgehalt als die C57BL/6J Mäuse aufweisen, trotz

geringerer Futtermittelaufnahme [92]. In der vorliegenden Untersuchung kann die ausbleibende Reaktion auf das Hochfettfutter bzw. eine Gewichtszunahme im C57BL/6JRj Stamm nicht über eine gesteigerte physische Aktivität noch über die Futtermittelaufnahme erklärt werden. Denn die C57BL/6JRj Mäuse haben unter beiden Diäten, Standard und Hochfett, eine signifikant erhöhte Futtermittelaufnahme, wogegen sich die physische Aktivität zwischen beiden Stämmen nicht unterscheidet. Trotz der geringeren Futtermittelaufnahme der C57BL/6NTac Mäuse weist dieser Stamm eine erhöhte relative viszerale Fettmasse unter Standard- und Hochfettfutter auf. Weiterführende indirekte kalorimetrische Analysen sind notwendig, um die Differenz der Sensitivität einer Diät induzierten Adipositas zwischen den beiden Mausstämmen weiter aufzuklären.

Die hohe Sensitivität des Substammes C56BL/6JNTac eine Diät-induzierte Adipositas zu entwickeln und das Fehlen der DIO Reaktion des C57BL/6JRj Stamms, weist darauf hin, dass sich der C57BL/6J Stamm von Jackson Laboratory sich von dem hier analysierten C57BL/6JRj Stamm von Janvier unterscheidet. Dem Produktkatalog des Züchters zufolge wurden die C57BL/6JRj Mäuse vom „Centre de Service des Animaux de Laboratoire“ (Orleans, Frankreich) 1993 in der 172. Inzuchtgeneration bei Janvier eingeführt. Seit errechnet wurde, dass mindestens drei rezessive Mutationen homozygot in jeder Inzuchtgeneration vorliegen müssen [93], sind in beiden Stämmen (C57BL/6J und C57BL/6JRj) weitere Experimente nötig, um weitere genetische Differenzen zu identifizieren, die die unterschiedliche Reaktion auf eine Diät – induzierte Adipositas erklären können. Des Weiteren kann die genetische Abweichung aus der verbliebenen Heterozygotie innerhalb des ursprünglichen Inzuchtstammes resultieren oder aus spontanen Keimzellmutationen, die sich innerhalb des Substammes etablieren [94].

Die in dieser Arbeit ermittelten genetischen Daten zeigen übereinstimmend zu vorausgehenden Arbeiten [75] genetische Unterschiede zwischen den untersuchten C57BL/6 Substämmen. Es konnten 11 SNPs nachgewiesen werden [Tabelle 1].

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass sich die untersuchten Substämme, C57BL/6NTac und C57BL/6JRj, sich phänotypisch, hinsichtlich einer Ausprägung einer Diät-

induzierten Adipositas, und genetisch, in wenigstens 11 SNPs, unterscheiden. Die aus dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse zeigen wie wichtig es ist für jede neue Fragestellung das am besten geeignete Modelltier zu wählen. Schließlich hebt die vorliegende Studie die Wichtigkeit der kontinuierlichen Überwachung des genetischen Hintergrundes und des Substamm Status nicht nur von C57BL/6 Mäusen hervor.



## 7. Literatur

1. Hauner H, Buchholz G, Hamann A et al. Prävention und Therapie der Adipositas. Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Adipositas-Gesellschaft, der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, der Deutschen Gesellschaft für Ernährung und der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin, ergänzte Version 2007
2. With A, Hauner H (Hg) Das Metabolische Syndrom. Urban & Vogel, München 2007
3. <http://www.adipositas-gesellschaft.de>
4. Blüher M, Hamann A. Adipositas und metabolisches Syndrom. *Diabetologie* 2008; 3: R1–R18
5. Rice T, Bouchard C, Pérusse L, Rao DC. Familial clustering of multiple measures of adiposity and fat distribution in the Québec Family Study: a trivariate analysis of percent body fat, body mass index, and trunk-to-extremity skinfold ratio. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1995 Dec;19(12):902-8
6. Vogler GP, Sørensen TI, Stunkard AJ, Srinivasan MR, Rao DC Influences of genes and shared family environment on adult body mass index assessed in an adoption study by a comprehensive path model. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1995 Jan;19(1):40-5
7. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 2007 May 11;316(5826):889-94. Epub 2007 Apr 12.
8. Hinney A., Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter AK, Brokamp B., Goldschmidt H, Siegfried W, Renschmidt H, Schäfer H, Gudermann T., Hebebrand J. Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Sep;88(9):4258-67.
9. O'Rahilly S. et al. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med.* 2003 Mar 20; 348(12):1085-95.

- 
10. Wirth A. Lebensstiländerung zur Prävention und Therapie von arteriosklerotischen Krankheiten. *Deutsch Ärztebl* 2004; 101: A1745-1752
  11. Billington CJ and Levine AS: Appetite regulation: Shedding new light on obesity. *Current Biology* 1996; 6: 920-923
  12. Stephens TW and Caro JF. To be lean or not to be lean. Is leptin the answer? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998; 106: 1-15
  13. DeFronzo R, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173-194
  14. Kylin E. Studien über das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrom. *Zentralbl Inn Med* 1923; 44: 105-127
  15. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome - a new world-wide definition. A consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23: 469-80
  16. Vague J. The degree of masculine differentiation of obesities. A factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr* 1956; 4: 20-34
  17. Vague J. La différenciation sexuelle. Facteur determinant des formes de l'obésité. *Press Med* 1947; 30: 339-340
  18. Blüher M et al. The biology of visceral fat *Der Internist* 2007 Volume 48, Number 2, 126-133, DOI: 10.1007/s00108-006-1781-x
  19. Blüher M, Paschke R. Visceral adipose tissue and metabolic syndrome. *Dtsch Med Wochenschr.* 2003 Oct 31;128(44):2319-23.
  20. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000 Dec;21(6):697-738

- 
21. Bouchard C, Tremblay A, Després JP, Nadeau A, Lupien PJ, Thériault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S, Fournier G. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med*. 1990 May 24;322(21):1477-82.
22. Rice T, Pérusse L, Bouchard C, Rao DC. Familial clustering of abdominal visceral fat and total fat mass: the Québec Family Study. *Obes Res*. 1996 May;4(3):253-61
23. Rice T, Després JP, Daw EW, Gagnon J, Borecki IB, Pérusse L, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C. Familial resemblance for abdominal visceral fat: the HERITAGE family study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997 Nov;21(11):1024-31.
24. Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 25;103(17):6676-81. Epub 2006 Apr 14.
25. Vague J. The distinction of android and gynoid obesities as the base for their prognosis. *Sem Hop*. 1955 Nov 10;31(66):3503-9.
26. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, Lang CC, Rumboldt Z, Onen CL, Lisheng L, Tanomsup S, Wangai P Jr, Razak F, Sharma AM, Anand SS; INTERHEART Study Investigators. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. *Lancet*. 2005 Nov 5; 366 (9497):1640-9.
27. Ohlson LO, Larsson B, Svärdsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, Björntorp P, Tibblin G. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*. 1985 Oct;34(10):1055-8.
28. Zucker LM and Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat, *Journal of Heredity* 1961, vol. 52, no. 6, pp. 275–278,
29. Zucker LM and Antoniadou HN. Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty", *Endocrinology* 1972, vol. 90, no. 5, pp. 1320–1330

- 
30. Bray GA. The Zucker fatty rat: a review, *Federation Proceedings* 1977, vol. 36, no. 2, pp. 148–153
31. Friedman JE, De Vente JE, Peterson RG, and Dohm GL. Altered expression of muscle glucose transporter GLUT-4 in diabetic fatty Zucker rats (ZDF/Drt-fa), *American Journal of Physiology* 1991, vol. 261, no. 6, pp. E782–E788
32. Ikeda H, Shino A, Matsuo T, Iwatsuka H, and Suzuoki Z. A new genetically obese-hyperglycemic rat (Wistar fatty), *Diabetes* 1981., vol. 30, no. 12, pp. 1045–1050
33. Matsui H, Suzuki M, Tsukuda R, Iida K, Miyasaka M, and Ikeda H. Expression of ICAM-1 on glomeruli is associated with progression of diabetic nephropathy in a genetically obese diabetic rat, Wistar fatty, *Diabetes Research and Clinical Practice* 1996, vol. 32, no. 1-2, pp. 1–9
34. Imai G, Satoh T, Kumai T et al. Hypertension accelerates diabetic nephropathy in Wistar fatty rats, a model of type 2 diabetes mellitus, via mitogen-activated protein kinase cascades and transforming growth factor- $\beta$ 1, *Hypertension Research* 2003, vol. 26, no. 4, pp. 339–347
35. Imai K, Kudo N, Koyama M, and Kawashima Y. Effects of dehydroepiandrosterone on oleic acid accumulation in rat liver, *Biochemical Pharmacology* 2003, vol. 65, no. 10, pp. 1583–1591
36. Berti-Mattera LN, Lowery J, Day SF, Peterson RG, and Eichberg J. Alteration of phosphoinositide metabolism, protein phosphorylation, and carbohydrate levels in sciatic nerve from Wistar fatty diabetic rats, *Diabetes* 1989, vol. 38, no. 3, pp. 373–378
37. Carroll L, Voisey J, van Daal A. Mouse models of obesity. *Clin Dermatol.* 2004 Jul-Aug;22(4):345-9.
38. Bultman SJ, Michaud EJ, and Woychik RP. Molecular characterization of the mouse agouti locus, *Cell* 1992, vol. 71, no. 7, pp. 1195–1204
39. Michaud EJ., Bultman SJ, Stubbs LJ, and Woychik RP. The embryonic lethality of homozygous lethal yellow mice (A(y)/A(y)) is associated with the disruption of a novel RNA binding protein, *Genes and Development* 1993, vol. 7, no. 7 A, pp. 1203–1213

- 
40. Duhl DMJ, Stevens ME, Vrieling H et al. Pleiotropic effects of the mouse lethal yellow (A(y)) mutation explained by deletion of a maternally expressed gene and the simultaneous production of agouti fusion RNAs, *Development* 1994, vol. 120, no. 6, pp. 1695–1708
41. Michaud EJ, Bultman SJ, Klebig ML et al. A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (A(y)) mutation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, vol. 91, no. 7, pp. 2562–2566
42. Mynatt RL, Miltenberger RJ, Klebig ML et al. Combined effects of insulin treatment and adipose tissuespecific agouti expression on the development of obesity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, vol. 94, no. 3, pp. 919–922
43. Kwon HY, Bultman SJ, Löffler C et al. Molecular structure and chromosomalmapping of the human homolog of the agouti gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, vol. 91, no. 21, pp. 9760–9764
44. Wilson BD, Ollmann MM, Kang L, Stoffel M, Bell GI, and Barsh GS. Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene, *Human Molecular Genetics* 1995, vol. 4, no. 2, pp. 223–230
45. Smith SR, Gawronska-Kozak B, Janderová L et al. Agouti expression in human adipose tissue: functional consequences and increased expression in type 2 diabetes, *Diabetes* 2003, vol. 52, no. 12, pp. 2914–2922
46. Kanasaki K, Koya D Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:197636. Epub 2011 Jan 5.
47. Herberg L and Coleman DL. Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes, *Metabolism* 1977, vol. 26, no. 1, pp. 59–99

- 
48. Jürgens HS, Schürmann A, Kluge R et al. Hyperphagia, lower body temperature, and reduced running wheel activity precede development of morbid obesity in New Zealand obese mice, *Physiological Genomics* 2006, vol. 25, no. 2, pp. 234–241
49. Nakamura M and Yamada K. Studies on a diabetic (KK) strain of the mouse, *Diabetologia* 1967, vol. 3, no. 2, pp. 212–221
50. Igel M, Taylor BA, Phillips SJ, Becker W, Herberg L, and Joost HG. Hyperleptinemia and leptin receptor variant Asp600Asn in the obese, hyperinsulinemic KK mouse strain, *Journal of Molecular Endocrinology* 1998, vol. 21, no. 3, pp. 337–345
51. Shike T, Hirose S, Kobayashi M, Funabiki K, Shirai T, and Tomino Y. Susceptibility and negative epistatic loci contributing to type 2 diabetes and related phenotypes in a KK/Ta mouse model, *Diabetes* 2001, vol. 50, no. 8, pp. 1943–1948
52. Ikeda H. KK mouse, *Diabetes Research and Clinical Practice* 1994, vol. 24, supplement, pp. S313–S316
53. Okazaki M, Saito Y, Uda Y et al. Diabetic nephropathy in KK and KK-A mice, *Experimental Animals* 2002, vol. 51, no. 2, pp. 191–196
54. Hummel KP, Dickie MM, and Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 1966 153: 1127–1128
55. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, and Morganstern JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell* 1996, 84:491–495
56. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadah JG, Lee GI, and Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996, 379: 632–635
57. Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the *db/db* mouse. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Jun;284(6):F1138-44

- 
58. Lee SM and Bressler R. Prevention of diabetic nephropathy by diet control in the *db/db* mouse. *Diabetes* 1981, 30: 106–111
59. Lee SM, Tutwiler G, Bressler R, and Kircher CH. Metabolic control and prevention of nephropathy by 2-tetradecylglycidate in the diabetic mouse (*db/db*). *Diabetes* 1982, 31: 12–18
60. Hummel KP, Coleman DL, and Lan PW. The influence of genetic background on expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. I. C57BL/KsJ and C57BL/6J strains. *Biochem Genet* 1971, 7: 1–13
61. Ingalls AM, Dickie MM, and Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.* 1950, 41, 317–318
62. Lindström P, The physiology of obese-hyperglycemic mice [*ob/ob* mice]. *Scientific WorldJournal* 2007 May 29;7:666-85.
63. Mayer J, Russel E, Bates MV, and Dickie MM. Metabolic, nutritional and endocrine studies of the hereditary obesity-diabetes syndrome of mice and mechanism of its development. *Metabolism* 1953, 2, 9–21
64. Garthwaite TL, Martinson DR, Tseng LF, Hagen TC, and Menahan, LA  
A longitudinal hormonal profile of the genetically obese mouse. *Endocrinology* 1980 107, 671–676
65. Westman S. Development of the obese-hyperglycemic syndrome in mice. *Diabetologia* 1968 4, 141–149
66. Edvell A, and Lindström P. Development of insulin secretory function in young obese hyperglycemic mice (Umeå *ob/ob*). *Metabolism* 1995 44, 906–913
67. Edvell A, and Lindström P. Initiation of increased pancreatic growth in young normoglycemic mice (Umeå+/?). *Endocrinology* 1999 140, 778–783
68. Mayer J, and Silides N. A quantitative method of determination of the diabetogenic activity of growth hormone preparations. *Endocrinology* 1953 52, 54–56

- 
69. Coleman DL, and Hummel KP. The influence of genetic background on the expression of the obese (*ob*) gene in the mouse. *Diabetologia* 1973 9, 287–293
70. Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 1978 14, 141–148
71. Ranheim T, Dumke C, Schueler KL, Cartee GD, and Attie AD. Interaction between BTBR and c57Bl/6J genomes produces an insulin resistance syndrome in [BTBnr x C57Bl/6J] F1 mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997 17, 3286–3293
72. Stoehr JP, Byers JE, Clee SM, Lan H, Boronenkov OIV, Schueler KL, Yandell BS, and Attie AD. Identification of major quantitative trait loci controlling body weight variation in *ob/ob* mice. *Diabetes* 2004 53, 245–249
73. Reuveni E. The genetic background effect on domesticated species: a mouse evolutionary perspective. *Scientific WorldJournal*. 2011 Feb 14;11:429-36
74. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57Bl/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav.* 2004 Apr;81(2):243-8
75. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, Obata Y, Yoshiki A. Genetic differences among C57Bl/6 substrains. *Exp Anim.* 2009 Apr;58(2):141-9
76. Festing MF. Inbred Strains in Biomedical Research, *The Macmillan Press Ltd.*, London and Basingstoke 1979
77. Festing MF. Origins and Characteristics of Inbred Strains of Mice. Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse, pp.1537-1567, Lyon, M.F., Rastan, S., and Brown, S.D.M. eds, *Oxford University Press*, Oxford 1996
78. Eppig JT. Mouse strain and genetic nomenclature: an abbreviated guide. pp.79-98 in: *The Mouse in Biomedical Research. History, wild Mice, and Genetics*, 2<sup>nd</sup> ed., Volume 1 (Fox, J.G., Barthold, S.W., Davisson, M.T., Newcomer, C.E., Quimby, F.W., and Smith, A.L. eds) Elsevier, inc., London 2007



- 
79. Altman PL, and Katz D eds. Inbred and Genetically Defined Strains of Laboratory Animals: Part I, Mouse and Rat., *Fed. Amer. Soc. Exp. Biol* 1979, Bethesda
80. Bailey DW. Sources of subline divergence and their relative importance for sublines of six major inbred strains of mice. Pp. 197-215. In: Origins of Inbred Mice (Morse III, H.C. ed.), *Academic Press*, New York
81. Janvier, Produktkatalog 2009, Seite 9
82. Mayorga AJ. and Lucki I. Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. *Psychopharmacology* 2001 (Berl) 155: 110-112
83. Radulovic J, Kammermeier J, and Spiess J. Generalization of fear responses in C57BL/6N mice subjected to one-trial foreground contextual fear conditioning. *Behav. Brain Res* 1998. 95: 179-189
84. Siegmund A, Langnaese K, and Wotjak CT. Differences in extinction of conditioned fear in C57BL/6 substrains are unrelated to expression of alpha-synuclein. *Behav. Brain Res* 2005. 157: 291-298
85. Huang TT, Naeemuddin M, Elchuri S, Yamaguchi M, Kozy HM, Carlson EJ, and Epstein CJ. Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Hum. Mol. Genet.* 2006 15: 1187-1194
86. Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, Mijat V, Goldsworthy M, Moir L, Haynes A, Quarterman J, Freeman HC, Ashcroft FM, and Cox RD. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia* 2005 48: 675-686
87. Green ML, Singh AV, Zhang Y, Nemeth KA, Sulik KK, and Knudsen TB. Reprogramming of genetic networks during initiation of the Fetal Alcohol Syndrome. *Dev. Dyn* 2007 236: 613-631
88. Khisti RT, Wolstenholme J, Shelton KL, and Miles MF. Characterization of the ethanol-deprivation effect in substrains of C57BL/6 mice. *Alcohol* 2006 40: 119-126

- 
89. Diwan BA, and Blackman KE. Differential susceptibility of 3 sublines of C57BL/6 mice to the induction of colorectal tumors by 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.* 1980 9: 111-115
90. Roth DM, Swaney JS, Dalton ND, Gilpin EA, and Ross Jr. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am. J. Physiol. J.* 2002 Heart Circ. Physiol. 282: H2134-H2140
91. Botstein D, White RL, Skolnick M, and Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980 32, 314-331
92. Nicholson A, Reifsnyder PC, Malcolm RD, Lucas CA, MacGregor GR, Zhang W, Leiter EH. Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Oct;18(10):1902-5. Epub 2010 Jan 7
93. Bailey D. How pure are inbred strains of mice, *Immunol. Today* 1982 3, pp. 210–214
94. Mulligan MK, Ponomarev I, Boehm II SL, Owen JA, Levin PS, Berman AE *et al.* Alcohol trait and transcriptional genomic analysis of C57BL/6 substrains, *Genes Brain Behav.* 2008 7, pp. 677–689

## 8. Anlagen

### 8.1 Lebenslauf

#### Persönliche Angaben

Name: Kern  
Vorname: Matthias  
Geburtsdatum: 31. Juli 1980  
Geburtsort: Leipzig  
Nationalität: deutsch

#### Bildungsweg

– **02/2012** Abschließende Bearbeitung der wissenschaftlichen Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum medicinarum (Dr. rer. med.), Medizinische Klinik III, Universität Leipzig

**11/2006 – 12/2011** Promotionsstudent unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. M. Blüher, Medizinische Klinik III, Universität Leipzig und Frau Dr. N. Klötting, IFB Adipositas Erkrankungen, NWG2 „*Tiermodelle der Adipositas*“, Universität Leipzig

**09/2005 – 08/2006** Diplomarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. med. M. Blüher und Dr. N. Klötting, Medizinische Klinik III, Universität Leipzig

**10/1999 – 08/2006** Biologie – Studium, Universität Leipzig

#### Förderungen

1. formel.1–Programm der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig  
01/2010 – 12/2010, “Die Rolle der genetischen Varianz im Replikationsinitiator 1 (Repin1) – Gen bei Adipositas und Hypertriglyzeridämie”, 35.350€
2. Deutsche Diabestes Gesellschaft (DDG)  
02/2008 – 02/2009 Untersuchung von Interaktionen von subkutanem und viszeralem Fettgewebe, 7000€

## Publikationsliste

### Publikation 1

Kosacka J, Nowicki M, Klötting N, **Kern M**, Stumvoll M, Bechmann I, Serke H, Blüher M

COMP-Angiopoietin-1 Recovers Molecular Biomarkers of Neuropathy and Improves Vascularisation in Sciatic Nerve of ob/ob Mice.

*PLoS One*. 2012;7(3):e32881. Epub 2012 Mar 6.

### Publikation 2

Engel KM, Schröck K, Teupser D, Holdt LM, Tönjes A, **Kern M**, Dietrich K, Kovacs P, Krügel U, Scheidt HA, Schiller J, Huster D, Brockmann GA, Augustin M, Thiery J, Blüher M, Stumvoll M, Schöneberg T, Schulz A.

Reduced Food Intake and Body Weight in Mice Deficient for the G Protein-Coupled Receptor GPR82.

*PLoS One*. 2011;6(12):e29400. Epub 2011 Dec 28.

### Publikation 3

**Kern M**, Knigge A, Heiker JT, Kosacka J, Stumvoll M, Kovacs P, Blüher M, Klötting N.

C57BL/6JRj mice are protected against diet induced obesity (DIO).

*Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 13;417(2):717-20. Epub 2011 Dec 8.

### Publikation 4

Chakaroun R, Raschpichler M, Klötting N, Oberbach A, Flehmig G, **Kern M**, Schön MR, Shang E, Lohmann T, Dreßler M, Fasshauer M, Stumvoll M, Blüher M.

Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity.

*Metabolism*. 2011 Dec 1 Epub ahead of print

### Publikation 5

Klötting N, Kovacs P, **Kern M**, Heiker JT, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, Beck-Sickingher AG, Blüher M.

---

Central vaspin administration acutely reduces food intake and has sustained blood glucose-lowering effects.

Diabetologia. 2011 Jul;54(7):1819-23. Epub 2011 Apr 5.

#### Publikation 6

Ruschke K, Illes M, **Kern M**, Klötting I, Fasshauer M, Schön MR, Kosacka J, Fitzl G, Kovacs P, Stumvoll M, Blüher M, Klötting N.

Repin1 maybe involved in the regulation of cell size and glucose transport in adipocytes.

Biochem Biophys Res Commun. 2010 Sep 17;400(2):246-51

#### Publikation 7

Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schön MR, **Kern M**, Stumvoll M, Blüher M.

Insulin-sensitive obesity.

Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010 Sep;299(3):E506-15

#### Publikation 8

Fritzsche K, Blüher M, Schering S, Buchwalow IB, **Kern M**, Linke A, Oberbach A, Adams V, Punkt K.

Metabolic profile and nitric oxide synthase expression of skeletal muscle fibers are altered in patients with type 1 diabetes.

Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2008 Nov;116(10):606-13.

#### Publikation 9

Klötting N, Koch L, Wunderlich T, **Kern M**, Ruschke K, Krone W, Brüning JC, Blüher M.

Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth.

Diabetes. 2008 Aug;57(8):2074-82.

## Publikation 10

Berndt J, Kralisch S, Klötting N, Ruschke K, **Kern M**, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, Blüher M.

Adipose triglyceride lipase gene expression in human visceral obesity.

Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2008 Apr;116(4):203-10.

## **Poster Präsentationen**

**Kern M**, Heiker JT, Kosacka J, Knigge A, Stumvoll M, Kovacs P, Blüher M, Klötting N  
Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) is related to obesity in mice and humans  
*47<sup>th</sup> German Diabetes Association (2012), Stuttgart, Germany*

**Kern M**, Klötting N, Hebebrand J, Stumvoll M, Blüher M  
Effects of frequent weight cycling on longevity in C57BL/6 and 129Sv mice  
*10<sup>th</sup> Leipzig Research Festival for Life Science 2011*

**Kern M**, Klötting N, Hebebrand J, Stumvoll M, Blüher M  
Effects of frequent weight cycling on longevity in C57BL/6 and 129Sv mice  
*47<sup>th</sup> EASD Annual Meeting 2011, Lissabon, Portugal*

**Kern M**, Klötting N, Hebebrand J, Stumvoll M, Blüher M.  
Auswirkungen von „Weight cycling“ auf die Lebenserwartung bei Mäusen.  
*46<sup>th</sup> German Diabetes Association 2011, Leipzig, Germany*

**Kern M**, Dietrich K, Schleinitz D, Breiffeld J, Müller I, Enigk B, Kosacka J, Stumvoll M, Tönjes A, Blüher M, Kovacs P, Klötting N.  
Replication Initiator 1 Gene (Repin1) is Involved in the Pathophysiology of Human Obesity.  
*9<sup>th</sup> Leipzig Research Festival for Life Science 2010*

**Kern M**, Berthold S, Klötting N, Dietrich A, Ruschke K, Stumvoll M, Blüher M.  
Analyse von TRPV1 mRNA Level im humanen Fettgewebe von gesunden und Typ-2-Diabetikern.  
*7<sup>th</sup> Leipzig Research Festival for Life Science 2008*

## **Vorträge**

**Kern M**, Kovacs P, Fasshauer M, Klötting I, Fitzl G, Blüher M, Stumvoll M, Klötting N.  
Defizienz des Replikationsinitiator 1 in der Leber führt zur Ausprägung einer Dyslipidämie in vivo.  
*45<sup>th</sup> German Diabetes Association (2010), Stuttgart, Germany*

## **8.2 Danksagung**

Für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei Professor Dr. med. Matthias Blüher bedanken. Außerdem gilt ein besonderer Dank Frau Dr. Nora Klötting für die zahlreichen Anregungen bei der Bearbeitung der Fragestellungen, die stets konstruktive Kritik, Motivation und interessanten Diskussionen.

Bei Eva Böge möchte ich mich bedanken für die Tierzucht und den stetigen Überblick der Tierbestände.

Der gesamten AG Blüher danke ich für die stets liebevolle Unterstützung und sehr gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie und meiner Freundin danke ich für die Unterstützung und Motivation über den gesamten Zeitraum.

### **8.3 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, den 11. April 2012