



Die Rolle der IGF2-mRNA-bindenden Proteine in der Kontrolle der Glucosehomöostase und des Wachstums von transgenen Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

angefertigt am Institut für Molekulare Medizin
der Medizinischen Fakultät,

vorgelegt von

Frau Britta Mühleck

geboren am 10. Januar 1987 in Halberstadt

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Stefan Hüttelmaier

Prof. Dr. med. Michael Gekle

Prof. Dr. rer. nat. Mario Mörl

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14. November 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Eukaryotische Genregulation.....	1
1.2	RNA-bindende Proteine.....	2
1.3	Die IGF2BP-Proteinfamilie	2
1.3.1	Struktur und Funktion der IGF2BPs	2
1.3.2	Expression und Rolle der IGF2BPs in Tumoren.....	4
1.4	IGF2BP2 und dessen Funktion in der Stoffwechselkontrolle.....	8
1.4.1	Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) und das Risiko für einen Diabetes mellitus.....	8
1.4.2	Regulation der Expression von IGF2BP2	13
1.4.3	Erste <i>in vivo</i> Analysen des IGF2BP2-Proteins	14
1.5	Der Glucose- und Energiestoffwechsel.....	16
1.5.1	Fehlregulation und pathologische Folgen.....	19
1.6	Die transgene Maus als Modellorganismus.....	21
1.7	Zielstellung der Arbeit	23
2	Material	25
2.1	Reagenzien, Primer und tierexperimentelle Materialien.....	25
2.2	Kit-Systeme.....	25
2.3	Geräte und Software	25
3	Versuchstiere und Methoden	27
3.1	Versuchstiere	27
3.1.1	Herkunft, Zucht und Haltung.....	27
3.1.2	Genotypisierung	27
3.2	Tierexperimentelle Methoden.....	29
3.2.1	Narkose	29
3.2.2	Oraler Glucosetoleranztest (OGTT).....	30
3.2.3	Intraperitonealer Insulintoleranztest (IPITT).....	31
3.2.4	Analyse der Körper- und Organgewichte	31
3.2.5	Erfassung der Nahrungsaufnahme	32
3.2.6	Messung der Körpertemperatur.....	32
3.2.7	Probengewinnung.....	33
3.2.7.1	Blutabnahme, Blutglucosebestimmung und Serumgewinnung.....	33
3.2.7.2	Kot und Urin	33

3.2.8	Klinisch-chemische Analysen.....	34
3.2.8.1	HbA1c-Wert	34
3.2.8.2	Bestimmung des Glykogengehaltes in Leber und Skelettmuskel	34
3.2.8.3	Messung weiterer Parameter	34
3.2.9	Hochfetttdiät (HFD).....	35
3.3	Kalorimetrische Verbrennung.....	36
3.4	Berechnungen.....	38
3.4.1	Verbrennungsenthalpie	38
3.4.2	Energieumsatz	41
3.4.3	Oberflächen-Volumen-Verhältnis.....	41
3.4.4	HOMA-IR und HOMA-%B	42
3.5	Zellbiologische Methoden	42
3.6	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.6.1	RNA-Isolation.....	43
3.6.2	Quantifizierung der RNA	44
3.6.3	Reverse Transkription	44
3.6.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
3.6.4.1	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	45
3.6.4.2	<i>Real Time quantitative</i> PCR (qPCR)	46
3.6.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA.....	48
3.7	Proteinbiochemische Methoden	49
3.7.1	Proteinisolation	49
3.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	50
3.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	50
3.7.4	<i>Western Blot</i> Analyse.....	50
3.7.5	Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern	51
3.7.6	Detektion und Auswertung	51
3.7.7	Immunpräzipitation (IP)	52
3.7.8	ELISA.....	52
3.8	Transkriptomanalysen.....	53
3.9	Statistische Analysen und Nomenklatur.....	54
4	Ergebnisse.....	55
4.1	Expression der IGF2BPs im Wildtyp-Mausstamm C57BL/6	55
4.2	Transgenes Mausmodell.....	57

4.2.1 Übersicht der erhaltenen transgenen Stämme	59
4.3 Analyse der Vererbung der Fremd-DNA	59
4.4 Expression der IGF2BPs im transgenen Mausmodell	60
4.4.1 Expression der transgenen Proteine unter Kontrolle eines Ubiquitin-Promotors	60
4.4.2 Expression des Transgens unter Kontrolle eines Albumin-Promotors	64
4.5 Phänotypische Charakterisierung der transgenen IGF2BP-Mäuse	66
4.5.1 Untersuchungen zum Wachstum	66
4.5.1.1 Analyse der Körper- und Organgewichte.....	66
4.5.1.2 Messung der Menge Insulinähnlicher Wachstumsfaktoren (IGFs)	70
4.5.2 Ermittlung des Energieumsatzes	72
4.5.2.1 Erfassung der Nahrungsaufnahme	72
4.5.2.2 Analyse der Ausscheidungen	72
4.5.2.3 Berechnung des Energieumsatzes.....	73
4.5.3 Regulation der Blutglucosekonzentration.....	74
4.5.3.1 Blutglucose und HbA1c-Werte	74
4.5.3.2 Orale Glucosetoleranztest (OGTT)	76
4.5.3.3 Insulinkonzentrationen während des OGTT	78
4.5.3.4 Intraperitonealer Insulintoleranztest (IPITT)	80
4.5.3.5 Glykogengehalt in Leber und Skelettmuskel.....	80
4.5.4 Messung klinisch-chemischer Parameter.....	82
4.5.5 Zusammenfassung der Phänotypen	83
4.6 Veränderungen des Stoffwechsels der UbC-IGF2BP2-Tiere nach einer Hochfettdiät	84
4.6.1 Wachstum und Energieumsatz unter HFD-Bedingungen.....	84
4.6.1.1 Analyse der Gewichtsentwicklung	84
4.6.1.2 Nahrungsaufnahme.....	85
4.6.1.3 Analyse der Ausscheidungen	86
4.6.1.4 Berechnung des Energieumsatzes.....	86
4.6.2 Regulation der Blutglucosekonzentration unter HFD-Bedingungen	88
4.6.2.1 Blutglucose- und HbA1c-Werte.....	88
4.6.2.2 Orale Glucosetoleranztest (OGTT)	88
4.6.2.3 Insulinkonzentrationen während des OGTT	89
4.6.2.4 Intraperitonealer Insulintoleranztest (IPITT)	91
4.6.3 Messung klinisch-chemischer Parameter.....	92
4.6.4 Zusammenfassung der Phänotypen der UbC-IGF2BP2-Mäuse	93
4.7 Transkriptomanalysen in verschiedenen Geweben der UbC-Mäuse.....	94

5 Diskussion.....	99
5.1 Transgenes Mausmodell.....	99
5.2 Beeinflussung des Glucose- und Energiestoffwechsels durch IGF2BP2.....	102
6 Zusammenfassung.....	115
7 Literaturverzeichnis.....	117
8 Anhang.....	V
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	V
8.2 Tabellenverzeichnis.....	VII
8.3 Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
8.4 Weitere Abbildungen und Ergebnistabellen.....	XIV
8.5 Eidesstattliche Erklärung.....	XXXV
8.6 Danksagung.....	XXXVII
8.7 Lebenslauf.....	XXXIX
8.8 Publikationsliste.....	XLI

1 Einleitung

1.1 Eukaryotische Genregulation

Die Regulation der Expression eukaryotischer Gene umfasst eine Vielzahl von Prozessen, angefangen von der Aktivierung der Gene über die Bildung von mRNA bis hin zu deren Verwendung in der Zelle. Eine gezielte Steuerung dieser komplexen Abläufe erfolgt auf mehreren Ebenen, ist neben den endogenen auch von exogenen Faktoren abhängig und gewährleistet stets eine optimale Anpassung des zellulären Stoffwechsels an die bestehenden Bedingungen. Eine präzise Genregulation ist zudem Voraussetzung für den koordinierten Ablauf verschiedener Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse des Organismus sowie unabdingbar zur Aufrechterhaltung der spezifischen Zell- und Gewebekomöostase. Neben den bisher gut charakterisierten Regulationsmechanismen der Transkription sowie diverser posttranslationaler Vorgänge, die z.B. durch Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitylierung oder Glykosylierung vor allem die Aktivität und Lebensdauer von Proteinen modifizieren, können auch posttranskriptionelle Mechanismen die Regulation der Gene entscheidend beeinflussen.

Die Genregulation auf transkriptioneller Ebene beinhaltet nicht nur die Synthese bestimmter mRNA-Moleküle, sondern auch in welcher Menge diese mRNAs in einem bestimmten Zelltyp benötigt werden. Die Steuerung der Aktivität der Gene hängt neben den epigenetischen Modifikationen des Chromatins auch von verschiedenen cis-regulatorischen Elementen der DNA (Promotoren, *Enhancer* oder *Silencer*) sowie von einer Vielzahl DNA-bindender Proteine, sogenannter Transkriptionsfaktoren, ab. Das Zusammenspiel all dieser Faktoren, welche in der Summe einen fördernden oder hemmenden Einfluss auf das entsprechende Gen haben, entscheidet letztlich darüber, ob und mit welcher Intensität dieses Gen transkribiert wird.

Bei der posttranskriptionellen Kontrolle der Genexpression erfolgt neben der Prozessierung der prä-mRNA im Zellkern durch z.B. 5'-Capping, 3'-Polyadenylierung, RNA-Editierung und Spleißen auch eine Regulation auf Ebene der bereits in das Zytoplasma exportierten reifen mRNA-Moleküle. Dabei wird mithilfe von RNA-bindenden Proteinen (RBPs) sowie nicht-codierenden RNAs (ncRNAs) wie bspw. microRNAs (miRNAs) gesteuert, ob und in welcher Menge diese mRNAs in ein funktionelles Protein translatiert oder letztlich abgebaut werden. Eng mit der posttranskriptionellen Genregulation verbunden ist die Kontrolle wichtiger zellulärer Prozesse wie der Proliferation, Differenzierung und Zellmotilität, aber auch die Adaptation an sich verändernde Umwelteinflüsse im Allgemeinen. Neben der korrekt synthetisierten und prozessierten mRNA sind dafür auch eine normale Expression und Regulation der RBPs und ncRNAs notwendig. Demzufolge kann eine veränderte Regulation von RBPs oder ncRNAs einen gestörten mRNA-Umsatz und somit eine Deregulierung der mRNA-Translation verursachen.

Die eukaryotische Genregulation basiert auf einem präzise aufeinander abgestimmten Wechselspiel verschiedener komplexer Prozesse. Diese schließen sowohl die Transkription und Prozessierung sowie die posttranskriptionelle und posttranslationelle Kontrolle der Genexpression mit ein und führen in ihrer Gesamtheit zu einer für den jeweiligen Organismus spezifischen phänotypischen Ausprägung. Dabei können Gene sowohl vollständig an- oder abgeschaltet werden als auch eine Art Feinjustierung stattfinden, welche die Expression der Gene lediglich verstärkt oder vermindert.

1.2 RNA-bindende Proteine

Die Synthese, Lebensdauer und der Abbau von mRNA-Molekülen werden nicht nur von cis-regulatorischen Sequenzbereichen innerhalb des Moleküls, sondern auch entscheidend von RNA-bindenden Proteinen (RBPs) bestimmt. RBPs enthalten spezielle RNA-Bindedomänen, die eine direkte Bindung an die Ziel-mRNAs, meist in deren 3'-untranslatiertem Bereich (3'UTR), ermöglichen [Lunde *et al.* 2007, Glisovic *et al.* 2008]. Die Bindung der mRNA kann entweder permanent wie z.B. im Ribosom oder temporär wie bspw. während der Initiation der Translation stattfinden und führt zur Rekrutierung weiterer Translationsfaktoren. Die so entstandenen Ribonukleoprotein-Komplexe, auch mRNPs oder RNPs genannt, variieren stark in ihrer Größe und können abhängig von den enthaltenen Proteinen die Ziel-mRNAs z.B. in ihrer Stabilität, ihrer Translation oder ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle kontrollieren [Lunde *et al.* 2007, Glisovic *et al.* 2008].

1.3 Die IGF2BP-Proteinfamilie

Eine wichtige Klasse von RBPs stellen die IGF2-mRNA bindenden Proteine (IGF2BPs oder auch IMPs genannt) dar, die im Rahmen der posttranskriptionellen Genregulation verschiedene Ziel-mRNAs binden und somit sehr vielfältige Funktionen innerhalb der Zelle erfüllen. Die Familie der IGF2BPs besteht aus drei paralogen Proteinen, dem IGF2BP1, IGF2BP2 und IGF2BP3. Ihr Name IGF2BP (IGF2-mRNA Bindeprotein) begründet sich in ihrer Fähigkeit die mRNA des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors 2 (IGF2) zu binden [Nielsen *et al.* 1999]. Orthologe dieser Proteine wurden bereits in *Drosophila melanogaster* sowie in verschiedenen Vertebraten identifiziert, unterliegen jedoch bisher keiner einheitlichen Terminologie, was häufig zu Verwirrungen führt. Zu ihnen gehören das Vg1RBP/Vera (*Vg1 mRNA Binding Protein* oder Vera; *Xenopus leavis*), IGF2BP 1/2/3 (*IGF2 mRNA Binding Protein 1/2/3*; *Homo sapiens*), CRD-BP (*Coding Region Determinant Binding Protein*; *Mus musculus*), KOC (*KH domain containing protein Overexpressed in Cancer*; *Homo sapiens*) sowie ZBP1 (*Zipcode Binding Protein 1*; *Gallus gallus*) [Müller-Pillasch *et al.* 1997, Ross *et al.* 1997, Doyle *et al.* 1998, Havin *et al.* 1998, Nielsen *et al.* 1999]. Der Versuch dieser Proteinfamilie einen einheitlichen Namen, nämlich das Akronym VICKZ zu geben, setzte sich in der Literatur bisher nicht durch [Yisraeli 2005]. Daher werden zum besseren Verständnis die orthologen Proteine im weiteren Verlauf der Arbeit unter dem humanen Gensymbol IGF2BP1/2/3 zusammengefasst.

1.3.1 Struktur und Funktion der IGF2BPs

Der hohe Grad der Konservierung der IGF2BP-Familie erlaubt es die einzelnen Proteinmitglieder sowohl strukturell als auch funktionell miteinander zu vergleichen. Alle Vertreter besitzen untereinander eine 70 - 99 %ige Sequenzidentität, sind 58 - 66 kDa groß und gleichen sich vor allem in ihrem modularen Aufbau der RNA-Bindemotive [Yisraeli 2005]. N-terminal befinden sich zwei RRM-Domänen (*RNA Recognition Motifs*) und C-terminal vier KH-Domänen (*hnRNP K Homology domain*), welche jeweils in Dimeren funktionell zusammenwirken (RRM1+2, KH1+2 und KH3+4) und durch längere Proteinsequenzen (*Linker*) miteinander verbunden sind [Git und Standart 2002]. Dabei vermitteln in erster Linie die KH-Domänen die Bindung an die Ziel-RNAs [Git und Standart 2002]. Für IGF2BP1 aus dem Huhn (alias ZBP1) konnte eine effizientere RNA-Bindung durch die beiden KH-Domänen 3+4 verglichen zu den KH-Domänen 1+2 gezeigt werden [Nielsen *et al.* 2002, Farina *et al.* 2003, Bell *et al.* 2013, Wächter *et al.* 2013]. Im Gegensatz dazu wiesen die RRM-Domänen keine

Bindungsaffinität für RNA-Moleküle auf. Daher wird vermutet, dass sie vornehmlich der Stabilisierung des RNP-Komplexes durch Protein-Protein-Interaktionen sowie der intrazellulären Lokalisierung dienen [Nielsen *et al.* 2002, Farina *et al.* 2003, Wächter *et al.* 2013].

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene mRNA-Substrate der IGF2BPs identifiziert. Abhängig von der gebundenen Ziel-mRNA können die IGF2BPs in unterschiedliche zelluläre Prozesse wie die Proliferation, Migration, Differenzierung, Morphologie, den Stoffwechsel oder in die Ausprägung der Zellpolarität eingreifen. So konnte bspw. gezeigt werden, dass IGF2BP3 (alias Vg1RBP) in Oozyten von *Xenopus laevis* die intrazelluläre Lokalisierung der Vg1-mRNA an den vegetativen Pol vermittelt [Deshler *et al.* 1997, Havin *et al.* 1998]. Auch das in *Drosophila melanogaster* gefundene Homolog der IGF2BPs ist essentiell für die korrekte Lokalisierung der *oskar*-mRNA während der Embryonalentwicklung [Munro *et al.* 2006]. Die bisher am besten untersuchte RNA-Interaktion der IGF2BPs, vornehmlich gezeigt für IGF2BP1 in embryonalen Hühnerfibroblasten, ist die mit der β -Aktin (ACTB)-mRNA. Dabei bindet IGF2BP1 an einen 54 Nukleotide langen, als *Zipcode* bezeichneten Bereich im 3'UTR der ACTB-mRNA und verhindert dadurch die Translation der mRNA [Kislauskis *et al.* 1994, Ross *et al.* 1997, Hüttelmaier *et al.* 2005, Stöhr *et al.* 2012]. Bei dieser Bindung von Protein und RNA werden mRNP-Komplexe gebildet, die möglicherweise in der Lage sind die Translation und/oder den Transport der Zielmoleküle zu kontrollieren. IGF2BP1 verhindert also durch eine Bindung der ACTB-mRNA noch im Zellkern nicht nur die frühzeitige Translation der ACTB-mRNA, sondern rekrutiert diese gleichzeitig an ihren Bestimmungsort innerhalb der Zelle [Hüttelmaier *et al.* 2005]. Nur wenn der IGF2BP1-mRNA-Komplex diese korrekte Lokalisation erreicht hat und die Bindung an IGF2BP1 wieder gelöst wird, kann die Translation der ACTB-mRNA erfolgen. Die Freilassung der gebundenen mRNA bzw. der Zerfall des mRNP-Komplexes erfolgt dabei durch eine von der Proteinkinase Src katalysierte Phosphorylierung am Tyrosin 396 in der *Linker*-Region zwischen den KH-Domänen 2+3 [Hüttelmaier *et al.* 2005]. Diese sequentiellen Ereignisse ermöglichen die zeitliche und räumliche Kontrolle der Translation der ACTB-mRNA und modulieren auf diese Weise z.B. die Ausbildung von Neuriten in primären Neuronen [Zhang *et al.* 2001a, Farina *et al.* 2003, Hüttelmaier *et al.* 2005]. Eine Bindung von IGF2BP1 kann aber nicht nur im 3'UTR, sondern auch im 5'UTR erfolgen, was z.B. eine verstärkte Translation der HCV RNA oder eine verminderte Translation der mRNA des embryonalen Wachstumsfaktors IGF2 zur Folge hat [Nielsen *et al.* 1999, Liao *et al.* 2004, Weinlich *et al.* 2009]. Im Gegensatz zu IGF2BP1 resultiert eine Bindung von IGF2BP2 oder IGF2BP3 im 5'UTR der IGF2-mRNA in einer verstärkten Translation dieser mRNA [Liao *et al.* 2005, Dai *et al.* 2011]. Neben der Translation können die IGF2BPs auch die Stabilität der mRNA erhöhen, indem sie die RNA-Moleküle z.B. vor einem endonukleolytischen Abbau schützen. Dies konnte für die mRNAs des Onkogens MYC, der Phosphatase PTEN und des *multidrug resistance protein* MDR1 durch eine Bindung von IGF2BP1 an die CRD (*Coding Region Determinant*)-Sequenzen innerhalb des codierenden Sequenzbereiches der mRNAs nachgewiesen werden [Bernstein *et al.* 1992, Sparanese und Lee 2007, Stöhr *et al.* 2012]. Ebenso schützt IGF2BP1 auch den codierenden Bereich der Ubiquitin-Proteinligase β -TrCP (BTRC)-mRNA vor einem miRNA-vermittelten Abbau [Noubissi *et al.* 2006, Elcheva *et al.* 2009]. Dieser Schutzmechanismus wird erreicht, indem die IGF2BPs durch Bindung der zum Abbau notwendigen Zielsequenz der mRNA diese unzugänglich machen oder die mRNA-Moleküle in mRNP-Komplexen eingefangen werden und so für die Translation oder den Abbau nicht verfügbar sind (*caging*-Hypothese) [Bell *et al.* 2013, Jønson *et al.* 2014, Busch *et al.* 2016]. Obwohl die IGF2BPs hauptsächlich zytoplasmatisch sind weisen sie auch nukleäre Import- und Exportsignale auf [Nielsen *et al.* 2003]. Eine Bindung an naive RNA-Transkripte noch im Zellkern wird aufgrund der Assoziation der IGF2BPs mit Komponenten des *exon junction complex* sowie der Tatsache, dass IGF2BPs nicht mit

dem Translationsinitiationsfaktor EIF4E kopräzipitieren vermutet [Jønson *et al.* 2007, Weidensdorfer *et al.* 2009] und konnte für die ACTB-mRNA bereits gezeigt werden [Oleynikov und Singer 2003, Hüttelmaier *et al.* 2005, Pan *et al.* 2007]. Die IGF2BPs sind dennoch vornehmlich im Zytoplasma zu finden, wo sie in speziellen mRNP-Komplexen lokalisiert sind, welche als granuläre Strukturen vornehmlich in perinukleären Bereichen beobachtet werden können [Nielsen *et al.* 1999, Nielsen *et al.* 2002]. Die IGF2BP1-enthaltenden mRNP-Komplexe besitzen eine durchschnittliche Größe von 100 - 300 nm, bestehen aus ca. 10 - 30 verschiedenen mRNAs, wobei insgesamt bis zu 300 verschiedene mRNAs identifiziert werden konnten, und einer Vielzahl von Proteinen wie bspw. ribosomalen Proteinen und diversen RBPs [Jønson *et al.* 2007]. Ein mehrfaches Auftreten der IGF2BPs innerhalb eines mRNP-Komplexes ist dabei nicht selten. Die Transkripte der untranslatierten RNA H19 sowie von CD44 weisen multiple Bindungsstellen für IGF2BP1-Moleküle auf [Runge *et al.* 2000, Vikessa *et al.* 2006]. Die Stabilität der mRNP-Komplexe erhöht sich mit zunehmender Länge der initial gebundenen mRNA sowie in Abhängigkeit der Bildung von IGF2BP-Homo- oder möglicherweise auch -Heterodimeren [Git und Standart 2002, Nielsen *et al.* 2004, Wächter *et al.* 2013]. Dabei konnte eine sequentielle und kooperative Bindung von IGF2BP1 an die Ziel-mRNA gezeigt werden. Nach der lockeren Bindung des ersten IGF2BP1-Moleküls und Bildung eines zunächst instabilen Protein-RNA-Komplexes, bindet das zweite IGF2BP1-Molekül an anderer Stelle derselben RNA und stabilisiert den Komplex durch Wechselwirkungen der beiden Proteine [Nielsen *et al.* 2004]. Es wird angenommen, dass sowohl die RNA-Bindung als auch die Dimerisierung über die KH3+4-Domäne vermittelt werden. Strukturanalysen der humanen Domänen KH3 und KH4 des IGF2BP1-Proteins suggerieren eine durch Bindung an das Protein forcierte Konformationsänderung der Ziel-RNA in der Weise, dass beide KH-Domänen das RNA-Molekül binden können [Chao *et al.* 2010, Hafner *et al.* 2010, Patel *et al.* 2012]. Ein verstärktes Vorkommen von IGF2BP1 konnte z.B. in der Führungslamelle embryonaler Hühnerfibroblasten sowie in den Wachstumskronen sich entwickelnder Neuronen nachgewiesen werden und unterstreicht somit den Einfluss der IGF2BPs in der mRNA-Lokalisation und der neuronalen Entwicklung [Zhang *et al.* 2001a, Farina *et al.* 2003]. Die Assoziation von IGF2BP1 mit Komponenten des Zytoskeletts verdeutlichen weiterhin ihre Rolle in konkreten zytoplasmatischen Transportprozessen [Oleynikov und Singer 2003].

1.3.2 Expression und Rolle der IGF2BPs in Tumoren

Die IGF2BPs werden im Wesentlichen während der Embryogenese gebildet und sind während dieser Zeit in der Lage z.B. die Proteinsynthese des IGF2 durch Bindung im 5'UTR der IGF2-mRNA zu modulieren [Nielsen *et al.* 1999, Liao *et al.* 2005, Dai *et al.* 2011, Liao *et al.* 2011, Suvasini *et al.* 2011]. Das bedeutet, dass die IGF2BPs in die physiologische Regulation des vornehmlich embryonalen Wachstumsfaktors IGF2 eingreifen und somit für eine normale embryonale Entwicklung unerlässlich zu sein scheinen. Untersuchungen von unterschiedlichen Entwicklungsstadien in verschiedenen Organismen zeigten, vor allem für IGF2BP1 und IGF2BP3, ein erstes Auftreten der IGF2BPs bereits in der Oozyte und Zygote sowie einen deutlichen Anstieg der Expression ab dem embryonalen Tag 10,5 (E10,5; E - embryonales Alter in Tagen) mit einem Maximum an Tag E12,5, bevor die Menge der Proteine zur Geburt hin wieder abnimmt [Mueller-Pillasch *et al.* 1999, Nielsen *et al.* 1999, Zhang *et al.* 1999, Runge *et al.* 2000, Hansen *et al.* 2004]. In *in vivo* Analysen mit IGF2BP1-defizienten Mäusen (IGF2BP1^{-/-}) wurde erstmals die physiologische Rolle von IGF2BP1 in der Embryonalentwicklung untersucht [Hansen *et al.* 2004]. Dazu wurde ein retroviraler Vektor in das zweite Intron des IGF2BP1-Gens kloniert, was zur Expression eines biologisch inaktiven IGF2BP1-β-Galaktosidase-Neomycin-Fusionsproteins führte, welches lediglich noch die erste RRM-Domäne des nativen

IGF2BP1-Proteins enthält. Die IGF2BP1-knockout Mäuse wiesen neben einer erhöhten perinatalen Sterblichkeit auch eine beeinträchtigte Entwicklung des Darms sowie einen sogenannten Zwergenhänotyp auf. Eine signifikante 14 %ige Gewichtsreduktion konnte ab dem embryonalen Tag 17,5 beobachtet werden. Mittels immunhistochemischer Analysen wurden histologische Veränderungen im Dünn- und Dickdarm der IGF2BP1^{-/-}-Mäuse beobachtet [Hansen *et al.* 2004]. Dabei zeigten sich die bereits embryonalen Veränderungen noch deutlicher nach der Geburt. Im Dünn- als auch im Dickdarm waren die Muskelschicht sowie die Höhe und Breite der Darmzotten reduziert. Ebenso zeigten die Zotten eine unregelmäßige Form, jedoch keine veränderte Anzahl und im Dickdarm konnte eine veränderte Anordnung der schleimproduzierenden Becherzellen nachgewiesen werden. Genau wie der Darmphänotyp verstärkte sich auch die Diskrepanz im Körpergewicht der Tiere mit zunehmendem Alter, sodass die adulten IGF2BP1^{-/-}-Tiere rund 40 % kleiner waren. Das verminderte Wachstum betraf gleichermaßen auch die inneren Organe und führte zu der Vermutung, dass eine Hypoplasie die wahrscheinlichere Ursache sei als ein Zellverlust durch Apoptose [Hansen *et al.* 2004]. Diese Studie verdeutlicht die zentrale Rolle von IGF2BP1 für das Zellwachstum sowie essentielle Differenzierungsprozesse während der embryonalen und postnatalen Entwicklung. Eine weitere Analyse der IGF2BP1-knockout Mäuse bezüglich der RNA-Menge verschiedener Ziel-RNAs von IGF2BP1 wie z.B. der IGF2 *leader 2, 3* und *4*, MYC-, ACTB- oder H19-RNA im Stadium E12,5 ergab weder eine veränderte RNA-Menge noch für MYC und ACTB sowie für die beiden paralogen Familienmitglieder IGF2BP2 und IGF2BP3 eine veränderte Proteinmenge. Versuche mit Sucrose-Gradienten führten dennoch zu der Hypothese, dass die Translation der IGF2-mRNA durch den Verlust von IGF2BP1 vermindert wird, was durch eine leichte Verschiebung der IGF2-mRNA aus der polysomalen in die monosomale Fraktion des Gradienten geschlussfolgert wurde [Hansen *et al.* 2004]. Unterstützt wird diese These dadurch, dass auch eine unabhängige Inaktivierung der beiden Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2 zu einem durch reduzierte Zellbildung verursachten Minderwuchs führt, wie er auch für das Fehlen von IGF2BP1 gezeigt werden konnte [DeChiara *et al.* 1990, Liu *et al.* 1993]. Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2 vermitteln in erster Linie die Wirkung des von der Hypophyse ausgeschütteten Wachstumshormons Somatotropin (*Growth Hormone*, GH), welches essentiell für ein normales Wachstum ist. Eine verminderte bzw. verstärkte Ausschüttung des GH kann bekanntermaßen im Kindesalter zu hypophysärem Zwerg- respektive Riesenwuchs führen. Im Erwachsenenalter ruft eine Überproduktion des Wachstumshormons eine sogenannte Akromegalie hervor, welche durch eine Vergrößerung der Körperendglieder (z.B. von Händen, Fingern, Füßen usw.) sowie innerer Organe gekennzeichnet ist. Das humane IGF2-Gen gehört zu den *imprinting* Genen, wird daher ausschließlich vom paternalen Allel vererbt und bildet eine komplexe Transkriptionseinheit, welche vier verschiedene Promotoren enthält, aus denen insgesamt fünf verschiedene mRNAs hervorgehen [de Moor *et al.* 1995]. All diese mRNAs besitzen einen identischen 3'UTR, unterscheiden sich aber in ihrem 5'UTR, welcher als *leader* bezeichnet wird. Für alle drei IGF2BPs wurde bereits eine direkte Bindung an den stark strukturierten 5'UTR der IGF2 *leader 3*-mRNA gezeigt, wodurch sowohl eine Inhibierung (IGF2BP1) als auch eine Aktivierung (IGF2BP2 und IGF2BP3) der Translation der IGF2-mRNA erfolgen kann [Nielsen *et al.* 1999, Liao *et al.* 2005, Dai *et al.* 2011, Liao *et al.* 2011, Suvasini *et al.* 2011]. Die experimentell beschriebenen Folgen einer Bindung von IGF2BP1 an die IGF2-mRNA stehen bisher allerdings im Widerspruch. So konnte sowohl *in vitro* eine durch IGF2BP1 verursachte Hemmung der Translation der IGF2-mRNA beobachtet werden [Nielsen *et al.* 1999], als auch in Mäusen eine reduzierte IGF2-Translation in Folge eines IGF2BP1-Knockouts [Hansen *et al.* 2004]. Anhand der genannten Untersuchungen wird deutlich, dass eine funktionelle *in vitro* Analyse nicht zwangsläufig der *in vivo* Situation entsprechen muss und weitere *in vivo* Analysen dringend notwendig sind.

Der Großteil der bisherigen Studien über die IGF2BPs wurde zunächst in verschiedenen embryonalen Stadien in unterschiedlichen Organismen, jedoch vornehmlich in transformierten Zellen und Tumorzellen durchgeführt. Ursächlich dafür ist der signifikante Abfall der IGF2BP-Proteinexpression mit Beginn der Geburt und damit verbunden eine vergleichsweise geringe bis keine Expression der IGF2BPs in normalen adulten Geweben, mit Ausnahme von Organen für die Reproduktion [Hammer *et al.* 2005]. Eine erneute Induktion der Expression dieser Proteine erfolgt jedoch in einer Vielzahl maligner Tumore, wobei der genaue Mechanismus sowie die Funktion der IGF2BPs im Stoffwechsel des Tumors noch ungeklärt sind. Dabei wurde häufig für IGF2BP1 und IGF2BP3 eine Expression in malignen Tumoren z.B. der Leber, der Niere, des Pankreas und Kolons sowie der weiblichen Reproduktionsorgane nachgewiesen [Bell *et al.* 2013]. Auch in Tumoren der Brust, des Gehirns, der Lunge, des Kolons und Rektums, der Ovarien und Testikel sowie in verschiedenen Melanomen und Lymphomen konnte das IGF2BP1-Protein gefunden werden [Bell *et al.* 2013]. Ursächlich dafür sind nicht zuletzt die verschiedenen Ziel-mRNAs der IGF2BPs, welche häufig zu den klassischen Onkogenen gehören. Eine regulatorische Funktion des IGF2BP1 konnte für MYC, KRAS, MDR1, CTNNB1 (β -Catenin), CD44 und BTRC gezeigt werden [Noubissi *et al.* 2006, Vikessa *et al.* 2006, Sparanese und Lee 2007, Gu *et al.* 2008, Elcheva *et al.* 2009, Mongroo *et al.* 2011]. Dabei verhindert eine Bindung des IGF2BP1 z.B. den endonukleolytischen Abbau der MYC-mRNA sowie den miRNA-vermittelten Abbau der BTRC-mRNA und führt somit zur Stabilisierung der Transkripte und forciert deren Translation [Sparanese und Lee 2007, Elcheva *et al.* 2009]. In immunhistochemischen Analysen konnte ein verstärktes Vorkommen von IGF2BP1 und IGF2BP3 mit einer signifikant verschlechterten Überlebensrate von Patienten mit einem Ovarialkarzinom korreliert werden [Gu *et al.* 2004, Köbel *et al.* 2007; Köbel *et al.* 2009]. Viele dieser Untersuchungen suggerieren eine essentielle Rolle vor allem von IGF2BP1 in der Tumorentstehung und -progression aufgrund der Regulation daran entscheidend beteiligter Zieltranskripte. Anzumerken ist jedoch, dass die bisherigen Untersuchungen meist nur auf deskriptiven Studien beruhen oder sich rein auf funktionelle *in vitro* Analysen stützen. Lediglich eine Studie in transgenen Mäusen belegt bisher eindeutig die tumorfördernde Wirkung des IGF2BP1 [Tessier *et al.* 2004]. Dazu wurde die Expression von IGF2BP1 mittels eines WAP-Promotors (*Whey Acidic Protein*-Promotor) ausschließlich in den Epithelzellen der Brustdrüsen von laktierenden Mäusen induziert. Eine verstärkte IGF2BP1-Expression führte innerhalb von 60 Wochen zu Tumoren der Brust in 95 % der untersuchten Weibchen. Dahingegen zeigten bei einer vergleichsweise verminderten Expression des IGF2BP1 immer noch 60 % der Tiere einen Tumor. Die entstandenen Tumore waren meist multifokal und in der Lage Metastasen zu bilden. Interessanterweise blieb die Menge der Ziel-mRNAs von IGF2BP1 wie die von ACTB und MYC von der Überexpression unbeeinflusst. Dahingegen konnte eine signifikant erhöhte Menge sowohl der H19-RNA als auch der IGF2-mRNA nachgewiesen werden, was jedoch nicht zu einer vermehrten Proteinsynthese von IGF2 führte [Tessier *et al.* 2004]. Auch hier wird die Diskrepanz zwischen funktionellen *in vitro* Analysen und den tatsächlichen Vorgängen im Organismus deutlich. Der *in vitro* beschriebene Schutzmechanismus von IGF2BP1 gegenüber dem endonukleolytischen Abbau der MYC-mRNA konnte in der *in vivo* Situation nicht bestätigt werden. Das legt nahe, dass *in vivo* vermutlich weitere Regulationsmechanismen zum Tragen kommen. Für die IGF2-mRNA wurde neben der postulierten Bindung aller IGF2BPs ausschließlich an den 5'UTR der *leader 3*-mRNA noch eine weitere Bindungsstelle im 3'UTR identifiziert, welche in allen IGF2-Transkripten identisch ist [Hansen *et al.* 2004]. Möglicherweise führt eine Bindung mehrerer IGF2BP1-Moleküle *in vivo* letztlich nur zu einem Schutz der IGF2-mRNA [Nielsen *et al.* 2004]. Das bedeutet, dass neben der Bindung im 5'UTR eine zusätzliche Bindung im 3'UTR das zelluläre Schicksal der IGF2-mRNA deutlich beeinflussen könnte.

Im Vergleich zu IGF2BP1 ist die Funktion von IGF2BP3 bisher nur wenig untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IGF2BP3 auch über eine Bindung an die IGF2-mRNA agiert und dadurch das Wachstum und die Proliferation der Zellen positiv beeinflusst sowie zu einer Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung führt [Liao *et al.* 2011]. Eine weitere Ziel-mRNA von IGF2BP1 und IGF2BP3, welche die positive Wirkung der Proteine auf die Invasivität von Zellen sowie auf die Bildung von Zellausläufern erklären könnte, ist CD44. Durch Bindung im 3'UTR dieser mRNA stabilisieren die beiden IGF2BPs die CD44-mRNA und schützen sie vor dem Abbau [Vikessa *et al.* 2006]. Eine Korrelation der Expression von IGF2BP3 mit der Aggressivität von verschiedensten malignen Tumoren wird in einer Vielzahl von Veröffentlichungen seit 2007 beschrieben [zusammengefasst in Bell *et al.* 2013]. Über ein verstärktes Auftreten von IGF2BP3 wurde häufig in Tumoren der Lunge, des Gastrointestinaltraktes und der Eierstöcke berichtet. Dabei soll vor allem in Tumoren des Gastrointestinaltraktes die Expression von IGF2BP3 mit einer schlechten Prognose, verstärkter Aggressivität und einem erhöhten Metastasierungspotenzial des Tumors korrelieren. Daher wird das Vorkommen von IGF2BP3 in diversen Tumoren als prognostischer Biomarker zur Diskriminierung maligner von benignen Entartungen diskutiert bzw. herangezogen [Pryor *et al.* 2008, Lu *et al.* 2009, Walter *et al.* 2009, Findeis-Hosey und Xu 2011, Bell *et al.* 2013]. Zu beachten und kritisch zu hinterfragen ist hier jedoch, dass die Analysen von IGF2BP3 vornehmlich auf immunhistochemischen Untersuchungen beruhen und es aufgrund der hohen Sequenzidentität und -homologie der IGF2BPs sehr schwierig ist paralog-spezifische Antikörper zu generieren [Bell *et al.* 2013]. Studien in einem transgenen Mausmodell unterstützen die Hypothese der pro-onkogenen Funktion von IGF2BP3. In Mäusen führte eine ausschließlich im Pankreas mittels eines Metallothionein-Promotors induzierte Expression von IGF2BP3 zu einer neoplastischen Transformation des exokrinen Teils des Pankreas [Wagner *et al.* 2003]. Hierbei wurde eine drastische Umorganisation des Organs ersichtlich, welche mit einer erhöhten Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten wie Kollagen I und Fibronectin einherging. Auch wenn das IGF2BP3-Protein nicht unmittelbar zur Tumorbildung geführt hat, unterstreichen diese Studien das Potenzial von IGF2BP3 ein gesundes Organ transformieren zu können und somit eine mögliche und entscheidende Rolle bei der Entstehung bösartiger Tumore zu spielen [Wagner *et al.* 2003].

Für IGF2BP2 gibt es derzeit weniger starke Belege für eine Rolle in der Tumorentstehung. Bisherige Analysen zeigten jedoch eine Korrelation der IGF2BP2-Expression mit malignen Tumoren der Leber sowie des Endometriums und mit Liposarkomen [Lu *et al.* 2001, Cleynen *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2011]. Dabei wurde für das Hepatozelluläre Karzinom der Leber vorwiegend die Überexpression einer verkürzten Spleißvariante von IGF2BP2 (p62) beschrieben [Lu *et al.* 2001], verbunden mit dem Auftreten von Autoantikörpern gegen p62 [Zhang *et al.* 2001b]. Mehr als 10 % der Patienten mit Tumoren in Lunge, Ösophagus, Rachen, Uterus, Leber oder Lymphomen wiesen im Serum Autoantikörper gegen p62 auf. Diese Dysregulation bzw. vermehrte Expression des vornehmlich embryonalen RBPs p62 scheint nicht nur ursächlich für die ausgelöste Immunreaktion zu sein, sondern korreliert auch mit einer schlechten Prognose [Zhang *et al.* 2001b]. Neben der Isoform p62, welcher im Vergleich zur längsten IGF2BP2-Variante (p66, 66 kDa) durch alternatives Spleißen das zehnte Exon fehlt und diese somit ein Molekulargewicht von nur 62 kDa aufweist, existiert noch eine dritte Isoform des IGF2BP2, welche auch p58 (58 kDa) genannt wird. P58 entsteht aufgrund einer alternativen Translationsinitiation an einem zweiten Startcodon, dem Methionin 69, wodurch dieser Proteinvariante die erste RRM-Domäne fehlt [Le *et al.* 2012]. Außer einem beschriebenen Auftreten aller drei IGF2BP2-Varianten lediglich in transformierten Zellen oder Tumorzellen [Bell *et al.* 2013] gibt es bisher keine weiterführenden Untersuchungen dieser IGF2BP2-Isoformen bezüglich der Regulation ihrer Expression sowie zu Unterschieden in deren Funktion oder Aktivität.

Im Gegensatz zu IGF2BP1 und IGF2BP3 ist IGF2BP2 das einzige Familienmitglied, das fortwährend in gesunden Geweben aller Altersstadien exprimiert wird. IGF2BP1 und IGF2BP3 werden dahingegen nahezu ausschließlich während der Embryonalentwicklung gebildet und treten erst in malignen Entartungen der Zellen wieder auf. Dieses charakteristische Expressionsmuster ist ausschlaggebend für ihre Bezeichnung als „onkofetale“ Proteine. Dabei scheinen sie neben essentiellen Funktionen während der Embryonalentwicklung auch eine fundamentale Bedeutung für die Tumorprogression zu haben. Im Einklang mit der davon abweichenden Expression des IGF2BP2 wird diesem Protein eher eine Rolle in der posttranskriptionellen Regulation in gesunden Geweben als in Tumoren zugesagt [Christiansen *et al.* 2009].

1.4 IGF2BP2 und dessen Funktion in der Stoffwechselkontrolle

1.4.1 Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) und das Risiko für einen Diabetes mellitus

Die drei paralogen Mitglieder der IGF2BP-Proteinfamilie, welche im Laufe der Evolution durch zwei Genduplikationen aus einem gemeinsamen Ur-Gen entstanden sind, werden folglich von unterschiedlichen Genen codiert und weisen mit einer insgesamt 59 %igen Sequenzidentität einen hohen Verwandtschaftsgrad auf [Nielsen *et al.* 1999]. Der hohe Grad der Konservierung der IGF2BPs wird auch in der Exon-Intron-Struktur der Gene verdeutlicht. Die humanen Proteine für IGF2BP1 (63 kDa) und IGF2BP3 (64 kDa) werden durch 15 Exons codiert und IGF2BP2 (66 kDa) durch 16 Exons. Eine Besonderheit im IGF2BP2-Gen ist dessen zweites Intron mit einer Länge von 125 kb (Abb. 1).

In einer Vielzahl genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) wurden bislang mehr als 16 verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) im IGF2BP2-Gen beschrieben [Duesing *et al.* 2008], wobei die Mehrheit dieser Mutationen im zweiten Intron lokalisiert ist (siehe Abb. 1). Bei der Suche nach den genetischen Ursachen der komplexen Stoffwechselerkrankung Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) wurden zahlreiche GWAS durchgeführt und verschiedenste neue Prädispositionsgene identifiziert. IGF2BP2 war eines der ersten Gene, welches in drei GWAS mit einem erhöhten Diabetes-Risiko assoziiert wurde [Saxena *et al.* 2007, Scott *et al.* 2007, Zeggini *et al.* 2007]. Dabei sind die beiden in einem 50 kb langen Bereich des zweiten Introns identifizierten SNPs rs4402960 (G>T) und rs1470579 (A>C) die am häufigsten untersuchten und am stärksten mit T2DM assoziierten SNPs im IGF2BP2-Gen [Scott *et al.* 2007, Huang *et al.* 2010]. In einer Vielzahl umfangreicher Replikationsstudien konnte diese Korrelation für diverse Kohorten aus verschiedensten Bevölkerungsgruppen, wie z.B. Europäer, Asiaten, Amerikaner, Australier und Mexikaner bestätigt werden, jedoch zeigte sich in anderen Studien mit Teilnehmern aus teilweise denselben ethnischen Gruppen keine solche Assoziation [Christiansen *et al.* 2009]. Die Ursachen dieser widersprüchlichen Ergebnisse erklären sich einerseits durch Limitierungen im Studiendesign, d.h. aufgrund der unterschiedlichen Anzahl und des Alters der Probanden sowie der genutzten Kriterien zur Einteilung der Studienteilnehmer in die einzelnen Versuchsgruppen, aber auch aufgrund der ethnischen Unterschiede der Personen. Das Auftreten spezieller Gene, die mit einem erhöhten Krankheitsrisiko assoziiert sind, ist nicht nur von einem spezifischen genetischen Hintergrund, sondern auch von den unterschiedlichsten Umwelt- und Lebensbedingungen der einzelnen Bevölkerungsgruppen abhängig. So konnte z.B. in keiner der Untersuchungen von afrikanisch abstammenden Probanden ein Zusammenhang zwischen den in der kaukasischen Bevölkerung identifizierten SNPs mit einem T2DM gefunden werden [Lewis *et al.* 2008, Palmer *et al.* 2008]. In einer Studie mit Amerikanern afrikanischer Herkunft wurde sogar für das Auftreten des SNP

rs4402960 ein vermindertes Risiko einen T2DM zu entwickeln postuliert [Palmer *et al.* 2008]. In drei unabhängige Metaanalysen kamen Forscher zu dem gleichen Ergebnis, dass beide genannten SNPs in der kaukasischen und asiatischen Bevölkerung mit einem erhöhten T2DM-Risiko assoziiert sind, jedoch nicht in Afrikanern [Jia *et al.* 2011, Wu *et al.* 2011, Zhao *et al.* 2011].

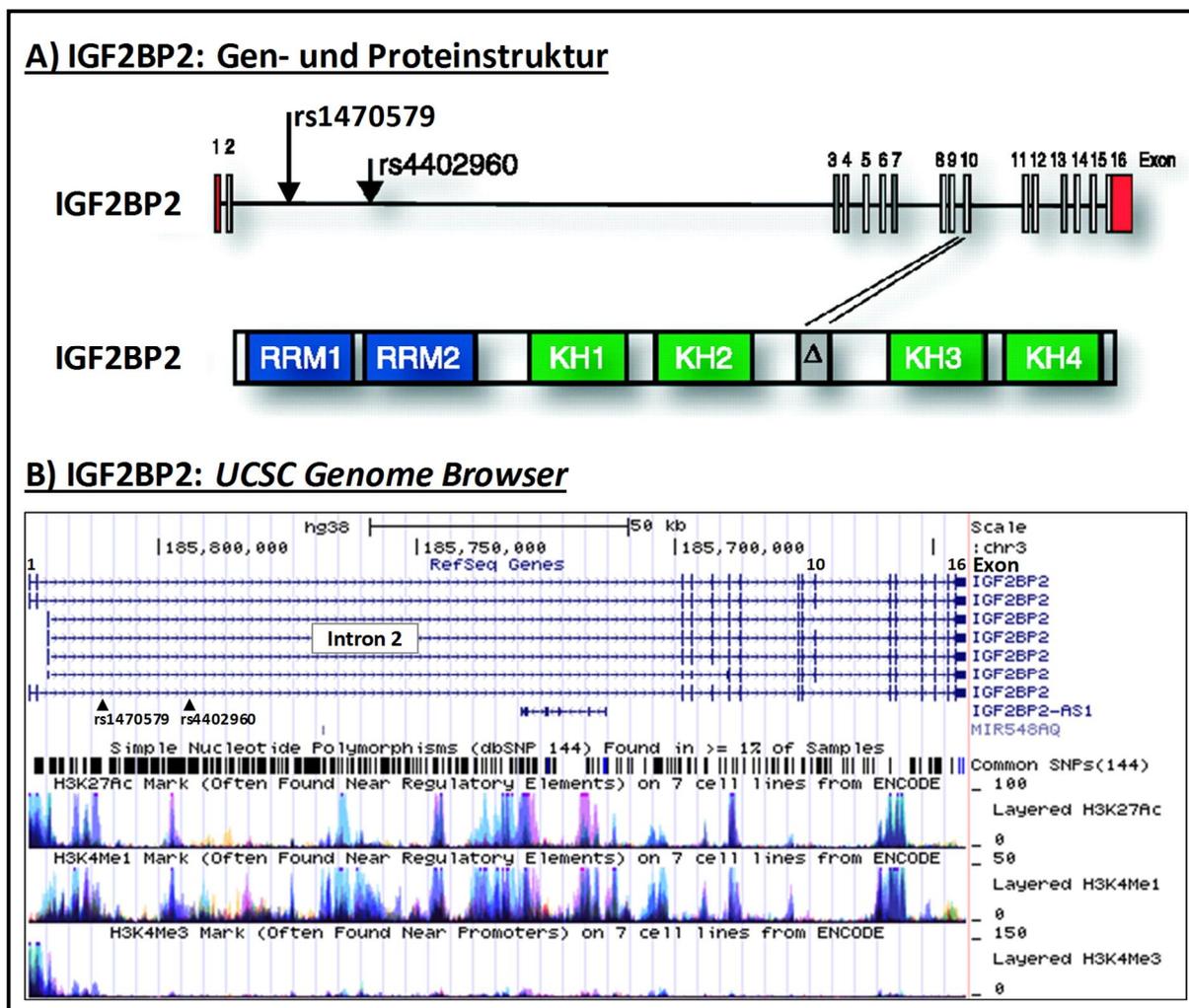


Abb. 1: Darstellung des IGF2BP2-Gens sowie der Domänenstruktur des Proteins

(A) Die 16 Exons des IGF2BP2-Gens sind als graue Boxen dargestellt und 5´ bzw. 3´UTR rot markiert. Durch alternatives Spleißen kann aus dem humanen IGF2BP2-Gen eine um Exon 10 (Δ) verkürzte Isoform namens p62 hervorgehen. Das zweite Intron ist mit 125 kb das längste Intron im IGF2BP2-Gen. Innerhalb dieses Introns wurden in Säugetieren unter anderem die beiden SNPs rs4402960 und rs1470579 identifiziert, welche in zahlreichen genomischen Korrelationsstudien untersucht und mit dem Auftreten eines T2DM assoziiert wurden. Das IGF2BP2-Protein ist aus zwei RRM- und vier KH-Domänen aufgebaut, welche jeweils als Didomänen funktionell zusammenwirken.

Modifiziert nach Christiansen *et al.* 2009

(B) Genomische Struktur von IGF2BP2 basierend auf den Referenzsequenzen der NCBI-Datenbank, dargestellt mithilfe des *UCSC Genome Browser*. Neben der Exon-Intron-Struktur verschiedener Varianten des IGF2BP2-Gens sind auch die annotierten SNPs sowie Histonmodifikationen (H3K27Ac, H3K4Me1 und H3K4Me3) dargestellt. Eine Modifikation von Histonen z.B. durch Acetylierung (Ac) oder Methylierung (Me) beeinflusst die Transkription von Genen. Ihr verstärktes Vorkommen im zweiten Intron von IGF2BP2 lässt das Vorhandensein alternativer Promotorbereiche vermuten.

UCSC Genome Browser: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>, Stand: 22.03.2016

Noch im selben Jahr der Identifizierung von IGF2BP2 als Risikogen wurde begonnen, die Versuchsteilnehmer der Studien auch in Bezug auf klinische Parameter zu untersuchen. Mehrere mit einem T2DM-assoziierte quantitative Merkmale wie z.B. der Nüchtern-Blutglucosewert, die Insulinsekretion, -sensitivität oder -resistenz sowie die Funktion der β -Zellen wurden im Zusammenhang mit dem Auftreten von Mutationen im IGF2BP2-Gen analysiert. Einige Studien belegen eine Assoziation der verschiedenen IGF2BP2-Genotypen mit abweichenden Werten der Nüchtern-Blutglucose [Ruchat *et al.* 2008, Sjögren *et al.* 2008, Wu *et al.* 2008, Webster *et al.* 2010], der Insulinsekretion [Grarup *et al.* 2007, Groenewoud *et al.* 2008, Palmer *et al.* 2008, Stančáková *et al.* 2009], der Insulinsensitivität [Ruchat *et al.* 2008] sowie der β -Zellfunktion [Groenewoud *et al.* 2008, Lyssenko *et al.* 2008, Palmer *et al.* 2008, Wu *et al.* 2008, Rodriguez *et al.* 2010]. Dabei ist jedoch anzumerken, dass nicht alle diese Merkmale eine signifikante Veränderung in all den verschiedenen Studien zeigten [Kirchhoff *et al.* 2008, Ng *et al.* 2008, Palmer *et al.* 2008, Ruchat *et al.* 2008, Rong *et al.* 2009]. Neben dem T2DM konnte vor allem bei asiatischen Frauen während der Schwangerschaft das Auftreten des SNP rs4402960 auch mit einem erhöhten Risiko für Gestationsdiabetes korreliert werden [Cho *et al.* 2008, Wang *et al.* 2011]. Dahingegen scheinen die SNPs rs4402960 und rs1470579 im IGF2BP2-Gen jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung eines Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) zu haben [Qu *et al.* 2008, Raj *et al.* 2009, Winkler *et al.* 2012]. Eine mögliche Ursache dafür liegt in den unterschiedlichen physiologischen Ursprüngen der beiden Erkrankungen. So konnte in einer chinesischen Population das gesteigerte T2DM-Risiko nur in Patienten mit einem erhöhten Körperfettanteil, welcher als Hauptrisikofaktor für einen T2DM gilt, bestätigt werden [Wu *et al.* 2014]. Eine kanadische Forschergruppe untersuchte das Ernährungsverhalten der Studienteilnehmer und fand heraus, dass homozygote Träger des Risikoallels des SNP rs4402960 durch eine verminderte tägliche Fettaufnahme (weniger als 30 % der täglichen Energiezufuhr im Vergleich zu mehr als 37 %) weniger abdominales Fett einlagerten und somit das Risiko für Komplikationen deutlich reduzieren konnten [Ruchat *et al.* 2009]. Im Einklang damit und unabhängig vom Diabetesstatus der Probanden zeigen auch aktuelle Analysen, dass Träger des Risikoallels zunächst ein vermindertes Risiko haben eine Fettleibigkeit (Adipositas) zu entwickeln, wobei ein bereits vorhandenes Übergewicht wiederum das T2DM-Risiko steigert [Lasram *et al.* 2015]. Diese Untersuchungen bestätigen eine enge Beziehung zwischen dem genetischen Hintergrund, also der sogenannten genetischen Prädisposition und den individuellen Umwelt- und Lebensbedingungen.

Obwohl in einer Vielzahl an Korrelationsstudien, das vermeintliche T2DM-Risiko nicht mit einer erhöhten Körperfettmasse in Verbindung gebracht werden konnte [Herder *et al.* 2008, Horikawa *et al.* 2008, Sjögren *et al.* 2008, Pecioska *et al.* 2010, Rodriguez *et al.* 2010, Hotta *et al.* 2012], wurde dennoch eine gesteigerte Menge an Triacylglycerinen im Blut der SNP-Träger beobachtet [Webster *et al.* 2010] sowie ein Zusammenhang der SNPs von IGF2BP2 mit dem Taille-Hüft-Verhältnis beschrieben [Liu *et al.* 2008]. Die einzigen Untersuchungen des SNP rs4402960 im IGF2BP2-Gen in Bezug auf das embryonale Wachstum zeigten keinerlei Effekte auf das Geburtsgewicht der Kinder, unabhängig davon, ob die Mutter oder das Neugeborene die Mutation trug [Freaty *et al.* 2009, Pulizzi *et al.* 2009, van Hoek *et al.* 2009, Zhao *et al.* 2009]. Van Hoek und Kollegen untersuchten die während der Zeit der holländischen Hungersnot im zweiten Weltkrieg geborenen Personen und fanden einen Zusammenhang einer mütterlichen Unterernährung mit den Glucosewerten während eines oralen Glucosetoleranztests. Probanden die den SNP im zweiten Intron des IGF2BP2-Gens aufwiesen und deren Mutter der Hungersnot ausgesetzt war (weniger als 1000 Kalorien pro Tag für einen unbestimmten Zeitraum während der Schwangerschaft von insgesamt 13 Wochen) zeigten verminderte Glucosewerte während des Tests. Daraus schlussfolgernd schien der SNP rs4402960 im

IGF2BP2-Gen den Probanden einen gewissen Schutz gegenüber den negativen Konsequenzen eines fetalen Kalorienmangels bezüglich der Glucosetoleranz im Erwachsenenalter zu verleihen [van Hoek *et al.* 2009]. Das Vorhandensein verschiedener IGF2BP2-Varianten wird zwar in erster Linie mit negativen Auswirkungen im Hinblick auf die Ausprägung eines T2DM assoziiert, kann aber für Betroffene abhängig von ihrer individuellen Lebensweise auch durchaus positive Folgen haben.

Trotz der zahlreichen Korrelationsstudien von IGF2BP2 und dem möglichen Risiko an einem T2DM zu erkranken, ist bisher nur wenig über die physiologischen Funktionen des Proteins bekannt und Untersuchungen in der klinischen Praxis fehlen gänzlich. Anzumerken ist weiterhin, dass die mittels GWAS identifizierte Kandidatengene meist nicht auf der Liste der funktionellen T2DM-Kandidaten zu finden sind und daher unabhängig von klinischen Risikofaktoren identifiziert wurden [Horikawa *et al.* 2008, Lyssenko *et al.* 2008]. Zudem machen die aus den GWAS erhaltenen Risikogene nur einen sehr geringen Anteil von etwa 5 % am vererbaren Risiko für einen T2DM aus [Altshuler *et al.* 2008]. Bisher ist auch nichts darüber bekannt, inwieweit ein solcher SNP im Intron die Proteinfunktion des funktionellen IGF2BP2 beeinflusst, da Introns zu den nicht-codierenden Bereichen zählen und somit die codierende Sequenz des Proteins unverändert bleibt. Durch einen intronischen SNP verursachte Veränderungen in der Genfunktion könnten daher möglicherweise durch alternatives Spleißen, diverse miRNAs, lange nicht-codierende RNAs (lncRNAs) oder eine *anti-sense* mRNA Transkription hervorgerufen werden [Zhang *et al.* 2014]. In Untersuchungen von IGF2BP1 in Brustdrüsenzellen wurde bereits eine N-terminal verkürzte Isoform, der beide RRM-Domänen fehlen, identifiziert [Fakhraldein *et al.* 2015]. Der dafür potenzielle Transkriptionsstart wurde im zweiten und ebenso längsten Intron des IGF2BP1-Gens identifiziert. Neben dem gehäuftem Auftreten von CpG-Inseln und Histonmarkern innerhalb hoch konservierter Bereiche im zweiten IGF2BP1-Intron [Fakhraldein *et al.* 2015] konnten auch vornehmlich im zweiten Intron des IGF2BP2-Gens aktivierende Histonmodifikationen am Histon 3 identifiziert werden (siehe Abb. 1). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es vermutlich mehrere alternative Promotorbereiche in den IGF2BP-Genen gibt und die transkriptionelle Regulation der IGF2BPs wesentlich komplexer scheint als zunächst angenommen [Fakhraldein *et al.* 2015]. Durch das Auftreten verschiedener SNPs können diese Sequenzbereiche möglicherweise so beeinflusst werden, dass die Genexpression von IGF2BP2 und seiner Varianten moduliert wird.

In einer Studie aus Island wurden neben IGF2BP2 auch SNPs im IGF2BP1- und IGF2BP3-Gen untersucht [Rodriguez *et al.* 2010]. Ein erhöhtes Risiko für den üblichen SNP rs4402960 im IGF2BP2-Gen konnte in Verbindung mit einer gestörten β -Zellfunktion bestätigt werden, jedoch zeigten sich für die beiden anderen Familienmitglieder IGF2BP1 und IGF2BP3 weder eine genomische Korrelation noch Veränderungen die quantitativen Merkmale eines T2DM betreffend [Rodriguez *et al.* 2010]. Daher ist auch die chromosomale Lokalisation des IGF2BP2-Gens in Bezug auf seine spezifischen Funktionen nicht außer Acht zu lassen. So konnten z.B. Gene die eine wichtige Funktion im Stoffwechsel sowie in der Regulation der Insulinwirkung haben, wie das für die Insulinsensitivität wichtige Fettgewebshormon Adiponektin (ADIPOQ), die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP3K13), die Lipase H (LIPH), die Diacylglycerolkinase γ -1 (DGKG), die regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 1 (PPP1R2) und das α -2-HS-Glycoprotein (AHSG), welches als potenzieller Inhibitor des Insulinsignalweges wirkt, in der Nähe des auf Chromosom 3q lokalisierten IGF2BP2-Gens identifiziert werden [Doria *et al.* 2008]. Ob die intronischen SNPs Auswirkungen auf die Expression des IGF2BP2 selbst haben oder die benachbarten Gene den beobachteten Effekt hervorrufen gilt es weiterhin zu untersuchen. Studien mit Mexikanern, dem Volk mit der weltweit höchsten Zahl an Übergewichtigen (rund 70 % Betroffene, das entspricht jedem dritten Einwohner), konnten neben der Assoziation des am häufigsten untersuchten und im Intron gelegenen SNP rs4402960 mit einem T2DM [Gamboa-

Meléndez *et al.* 2012] noch einen weiteren im Promotorbereich des IGF2BP2-Gens vorhandenen SNP rs11705701 (G>A) identifizieren [Li *et al.* 2009]. Dieser SNP korreliert nicht nur mit dem Körperfettanteil der Probanden, sondern beeinflusst folglich auch die Insulinsensitivität und damit das T2DM-Risiko [Li *et al.* 2009]. Interessanterweise konnte das Auftreten dieses SNP erstmals auch mit einer verstärkten Expression der vermutlich funktionell unterschiedlichen p58-Isoform des IGF2BP2, vornehmlich im Fettgewebe und den pankreatischen Inselzellen, assoziiert werden [Prokunina-Olsson *et al.* 2008]. Auch in der russischen Bevölkerung wurde das Auftreten des SNP rs11705701 mit einem gesteigerten T2DM-Risiko korreliert, indem in gesunden SNP-Trägern eine verschlechterte β -Zellfunktion sowie eine erhöhte Insulinresistenz festgestellt wurden [Chistiakov *et al.* 2012]. Expressionsanalysen wiesen in T2DM-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen neben einer vermehrten Menge an IGF2BP2-mRNA auch einen zweifachen Anstieg der IGF2BP2-Proteinmenge im Fettgewebe auf. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Menge an p58 im Fettgewebe von Mutationsträgern abnimmt und die Menge der längsten IGF2BP2-Isoform p66 ansteigt. Somit wird für das Auftreten von p58 eine protektive anti-diabetische Wirkung postuliert [Chistiakov *et al.* 2012]. In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass das Auftreten eines SNP im IGF2BP2-Gen eine veränderte Expression der funktionell verschiedenen Isoformen des IGF2BP2 bewirkt und auf diese Weise das Krankheitsrisiko modulieren kann. Wie diese Modulation quantitativer Risikofaktoren genau erfolgt und ob diese aus einer verstärkten oder verminderten Aktivität des IGF2BP2 resultiert ist weiterhin völlig unklar.

Expressionsanalysen in der Leber, dem Skelettmuskel sowie im Fettgewebe von 12 Wochen alten diabetischen Ratten ergaben lediglich im Fettgewebe eine verminderte mRNA-Menge des IGF2BP2 [Parikh *et al.* 2009]. Im Gegensatz dazu wurde im Pankreas von T2DM-Patienten verglichen zu nicht-diabetischen Probanden eine erhöhte Menge der IGF2BP2-mRNA analysiert [Marselli *et al.* 2010]. Diese *in vivo* Beobachtung sowie die Ergebnisse einiger GWAS, die IGF2BP2 eher mit einer verminderten Funktion der pankreatischen β -Zellen korrelieren, als mit einer veränderten Insulinsensitivität [Christiansen *et al.* 2009], legen die Vermutung nahe, dass IGF2BP2 an der Entwicklung sowie der Funktion des Pankreas entscheidend beteiligt ist. In T2DM-unabhängigen Untersuchungen wurde für IGF2BP3 bereits eine Rolle in der Entstehung des Pankreas im Krallenfrosch [Spagnoli und Brivanlou 2006] sowie in dem phänotypischen Erscheinungsbild im Pankreas der Maus beschrieben [Wagner *et al.* 2003]. Aufgrund der Bindung von IGF2BP2 an IGF2 wird vermutet, dass eine Interaktion zwischen den genetischen IGF2BP2-Varianten und T2DM vornehmlich über den IGF2- und somit auch den Insulinsignalweg erfolgt [Huang *et al.* 2010]. In der Niere, einem anderen für die Glucosehomöostase wichtigen Organ, konnte in diabetischen Mäusen eine erhöhte Bildung des IGF2BP2-Proteins in 5 Wochen alten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden, während 26 Wochen alte Mäuse keine Unterschiede mehr aufwiesen [Gu *et al.* 2012]. Gu und Kollegen konnten zeigen, dass der SNP rs4402960 im IGF2BP2-Gen mit der Ausprägung einer diabetischen Nierenfunktionsstörung assoziiert ist. Diese Korrelation trat jedoch nur bei männlichen Patienten mit einem T1DM auf. Obwohl dieser IGF2BP2-SNP keine Assoziation mit einem T1DM zeigt, wird dem IGF2BP2-Protein eine schützende Wirkung in Bezug auf die frühe Entwicklung einer diabetischen Nephropathie zugeschrieben [Gu *et al.* 2012]. Dennoch konnte bisher in Personen mit und ohne T2DM kein Zusammenhang zwischen dem SNP im IGF2BP2-Gen und Bluthochdruck, einer diabetischen Nephropathie sowie kardiovaskulären Risiken gefunden werden [Lasram *et al.* 2015].

Es bleibt also weiterhin völlig unklar, welche spezielle Funktion das zweite Mitglied der IGF2BP-Familie im Stoffwechsel einnimmt und wie sich quantitative T2DM-Merkmale und die Expression, Aktivität, Lokalisation und RNA-Bindungseigenschaften des Proteins gegenseitig beeinflussen.

1.4.2 Regulation der Expression von IGF2BP2

Neben diversen biochemischen Experimenten den modularen Aufbau und das RNA-Bindungs-potenzial der IGF2BPs betreffend sowie einer Vielzahl an deskriptiven Expressionsstudien vor allem in malignen Tumoren ist bisher wenig bekannt über die Regulation der Expression der IGF2BP-Proteine. Ausschließlich für das IGF2BP2 wird eine direkte Regulation der mRNA-Menge durch den architektonischen Transkriptionsfaktor HMGA2 (*high mobility group AT-hook 2*) in Kooperation mit NFκB (*nuclear factor kappaB*) beschrieben. In einer Studie mit HMGA2-defizienten „Mini“-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Transkription des IGF2BP2-Gens in 12,5 Tage alten Embryonen nahezu zum Erliegen kommt [Brants *et al.* 2004]. Weiterführende Untersuchungen bestätigten eine Bindung von HMGA2 an eine AT-reiche Region im ersten Intron des IGF2BP2-Gens, wodurch dessen Transkription verstärkt wird. Angrenzend an die HMGA2-Bindestelle wurde auch eine Bindungsstelle für NFκB identifiziert, welches ebenso die Transkription von IGF2BP2 in Kooperation mit HMGA2 steigert [Cleynen *et al.* 2007]. In neuronalen Vorläuferzellen des murinen Neocortex führt eine Überexpression von HMGA2 zu einer verstärkten Expression des IGF2BP2, welches wiederum das Differenzierungspotenzial dieser Zellen reguliert. Eine verminderte IGF2BP2-Menge induziert dabei die Differenzierung zu Astrozyten, wobei IGF2BP2 in den neuronalen Vorläuferzellen keinen proliferativen Effekt aufweist [Fujii *et al.* 2013]. Im Gegensatz zur vermuteten transkriptionellen Regulation von IGF2BP1 durch dessen Promotorbereich wird für die Expression des IGF2BP2-Gens eine Beteiligung von transkriptionsfördernden cis-regulatorischen Elementen im ersten Intron angenommen [Bell *et al.* 2013]. Eine zusätzliche und ebenso wichtige Rolle in der Kontrolle der Genexpression der IGF2BPs nimmt die posttranskriptionelle Regulation durch z.B. miRNAs oder lncRNAs ein. Für IGF2BP1 wurde bereits eine direkte Bindung der tumorsuppressiven miRNA let-7 im 3'UTR beschrieben, sodass eine verminderte Menge der miRNA let-7, wie sie häufig in aggressiven Tumorzellen beobachtet werden kann, mit einer Überexpression von IGF2BP1 korreliert [Boyerinas *et al.* 2008]. Auch für IGF2BP2 konnten zwei Bindungsstellen für die miRNA let-7 im 3'UTR gefunden werden [Zhu *et al.* 2011]. Da HMGA2 ebenso ein Zieltranskript der miRNA let-7b ist, erfolgt auch eine indirekte Regulation von IGF2BP2 durch diese miRNA. Während der Differenzierung von Podozyten der Niere konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion der let-7b-Menge kommt, wodurch die Expression von HMGA2 verstärkt und somit die Transkription von IGF2BP2 forciert wird [Schaeffer *et al.* 2012]. Interessanterweise wurde der gegenteilige Effekt unter diabetischen Bedingungen beobachtet. Eine erhöhte Glucosemenge führte zu einer vermehrten let-7b-Menge, verminderte das Level von HMGA2 und reduzierte auch die IGF2BP2-Menge [Schaeffer *et al.* 2012]. In dieser Studie wurde erstmals ein Einfluss von Glucose auf die Expression von IGF2BP2 *in vivo* bestätigt.

HMGA2 und IGF2BP2 zeigen ein vergleichbares Expressionsmuster während der embryonalen Entwicklung in der Maus [Brants *et al.* 2004], werden vermehrt in proliferierenden Myoblasten gebildet und ihre Translation während der terminalen Differenzierung in multinukleäre Muskelzellen schrittweise herunterreguliert [Li *et al.* 2012]. Folglich wird auch die Translation verschiedener Zieltranskripte von IGF2BP2, wie z.B. MYC, dem Transkriptionsfaktor SP1, NRAS und dem IGF1-Rezeptor (IGF1R) inhibiert, welche eine wichtige Funktion für das Zellwachstum haben [Li *et al.* 2012, Gong *et al.* 2015]. Eine mögliche Ursache der verminderten Expression von IGF2BP2 liegt neben der Bindung von Transkriptionsfaktoren wie HMGA2 auch in der zeitlich regulierten und verstärkten Expression von miRNAs und lncRNAs. Die intergenische lncRNA lncMyoD wird während der Myoblastendifferenzierung gebildet und inhibiert durch direkte Bindung an IGF2BP2 die IGF2BP2-vermittelte Translation von proliferativen Genen wie NRAS und MYC [Gong *et al.* 2015]. In Überein-

stimmung mit den Ergebnissen von Fujii *et al.* 2013 und Li *et al.* 2012 geht auch hier eine verminderte Expression des IGF2BP2 mit einer Induktion der Differenzierung einher und unterstreicht damit die bedeutende Rolle von IGF2BP2 für das Zellwachstum und die embryonale Entwicklung. IGF2BP2 beeinflusst aber nicht nur Wachstum und Proliferation, sondern zeigt auch einen Effekt auf das Zytoskelett der Zellen und moduliert damit deren Motilität. Diese Funktion vermittelt IGF2BP2 über die direkte Bindung von mRNAs, die für Proteine des Zytoskeletts codieren. PINCH-2 ist an der Ausbildung von fokalen Zell-Matrix-Kontakten und MURF-3 an der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt. Eine Depletion von IGF2BP2 führt in murinen und humanen Muskelzellen zu einer Überexpression von PINCH-2 sowie zu einer Reduktion von MURF-3 und ist folglich für die Beweglichkeit, Migration und Stabilität der Mikrotubuli und damit für die Muskelzellmotilität entscheidend [Boudoukha *et al.* 2010]. Unabhängig von IGF2BP2 führt auch die miRNA let-7g zu einer verminderten Expression von PINCH-2 [Boudoukha *et al.* 2014]. Im Hepatozellulären Karzinom wurde eine weitere tumorsuppressive IGF2BP2-bindende miRNA identifiziert, welche im Tumor vermindert exprimiert wird, was zu einer verstärkten Expression von IGF2BP2 führt und damit die Proliferation der Zellen positiv beeinflusst [Liu *et al.* 2015]. Die miRNA 216b inhibiert durch Modulation der Expression von IGF2BP2 die Aktivierung des AKT/ERK-Signalweges. Eine Depletion dieser miRNA 216b verbunden mit einer erhöhten IGF2BP2-Menge verursacht folglich das Ansteigen der Menge des Wachstumsfaktors IGF2, welcher durch Bindung an extrazelluläre Rezeptoren verschiedene Signalwege aktivieren kann. So werden folglich die Proteinkinase B (PKB oder auch AKT genannt) und die Serin/Threonin-Kinasen mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) und ERK (*extracellular signal regulated MAPK*) verstärkt phosphoryliert und damit aktiviert [Liu *et al.* 2015]. Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg nimmt eine zentrale Rolle im Metabolismus ein und regelt zahlreiche essentielle Funktionen wie den Zellzyklus, die Translation, Proliferation, Zellwachstum und Apoptose und wird durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen, Energieäquivalenten und Wachstumsfaktoren wie IGFs, aber auch Insulin, reguliert. Alle drei IGF2BPs können durch die Kinase mTOR phosphoryliert werden [Dai *et al.* 2011, Dai *et al.* 2013]. Der mTOR-Komplex 1 (mTORC1) phosphoryliert IGF2BP2 an den Serinen 162 und 164 und forciert damit dessen Bindung an die IGF2 *leader* 3-mRNA, was zu einer *cap*- und EIF4EBP1-unabhängigen Initiation der Translation dieser IGF2-mRNA führt [Dai *et al.* 2011]. Die doppelte Phosphorylierung von IGF2BP2 erfolgt zudem in Abhängigkeit von der Aminosäureverfügbarkeit und scheint daher eine Verbindung zwischen der embryonalen IGF2-Expression und der Nährstoffverfügbarkeit herzustellen, welche essentiell für das fetale Wachstum ist. Das adulte Vorkommen von phosphoryliertem IGF2BP2 und die damit verbundene Modulation der Expression oder Regulation von IGF2BP2 durch mTORC1 wird dahingegen mit dem Risiko für einen T2DM assoziiert [Dai *et al.* 2011].

1.4.3 Erste *in vivo* Analysen des IGF2BP2-Proteins

Bislang gibt es nur sehr wenige funktionelle Analysen von IGF2BP2 im adulten Organismus, die einen Zusammenhang mit der Glucosehomöostase bestätigen. Untersuchungen der verkürzten IGF2BP2-Spleißvariante p62 zeigten, dass eine leberspezifische Überexpression in transgenen Mäusen zur Bildung einer Steatose (Fettleber) sowie einer verbesserten Glucosetoleranz führte [Tybl *et al.* 2011]. Die Tiere wiesen jedoch keine Entzündung oder Schädigung des Lebergewebes auf, aber eine verminderte Glykogenmenge, was ebenso auf erste Veränderungen im Stoffwechsel hindeutet. Eine durch p62 induzierte vermehrte RNA-Expression konnte für IGF2 und H19 nachgewiesen werden [Tybl *et al.* 2011]. Weiterführende Analysen in Patienten mit Hepatozellulärem Karzinom zeigten

nicht nur, dass eine erhöhte Expression von p62 mit einer schlechteren Prognose, sondern auch positiv mit der RNA-Expression von IGF2 korreliert [Kessler *et al.* 2013]. In Zellkulturversuchen konnte beobachtet werden, dass p62 eine anti-apoptotische Wirkung hat, indem es die Phosphorylierung und damit die Aktivität der Kinase ERK1/2 steigert [Kessler *et al.* 2013]. Trotz der erhöhten IGF2-mRNA-Menge zeigte sich keine veränderte Aktivität der Kinase AKT, sodass geschlussfolgert wurde, dass kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem anti-apoptotischen Effekt und einer durch IGF2 ausgelösten Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges besteht [Kessler *et al.* 2013]. Dennoch bestätigen diese Analysen, dass p62 eine kritische Rolle in der Pathophysiologie der Leber einnimmt [Tybl *et al.* 2011, Kessler *et al.* 2013]. Zwei aktuelle Studien untersuchten die Auswirkungen des Fehlens der längsten Variante des IGF2BP2-Proteins in der Maus bzw. des orthologen Proteins dIMP in *Drosophila melanogaster*. Kawasaki und Kollegen konnten eine erhöhte Glucose- bzw. Trehalosemenge in Fliegen ohne funktionellem IGF2BP-Protein analysieren sowie eine höhere Lebenserwartung und eine verminderte Toleranz gegenüber einem Nahrungsentzug feststellen [Kawasaki *et al.* 2015]. Diese Ergebnisse decken sich nur teilweise mit denen aus der Maus. IGF2BP2-defiziente Mäuse (IGF2BP2^{-/-}) besaßen neben einer erhöhten Lebensdauer signifikant verminderte Glucose- und Insulinlevel [Dai *et al.* 2015]. Die Tiere wiesen in verschiedenen Altersstadien eine reduzierte Nüchtern-Blutglucosekonzentration auf im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Während eines Glucosetoleranztests zeigten sie eine verbesserte Glucosetoleranz, einhergehend mit verminderten Insulinkonzentrationen und aus einem Insulintoleranztest konnte eine verbesserte Insulinsensitivität geschlussfolgert werden. Eine verstärkte Phosphorylierung der Proteinkinase AKT in der Leber, dem Muskel und im Fettgewebe sowie der S6-Kinase (S6K) in Leber und Muskel bestätigten diese Befunde in Bezug auf eine Beeinflussung des intrazellulären Insulinsignalweges [Dai *et al.* 2015]. Neben der Verstoffwechslung der Glucose waren die IGF2BP2-knockout Mäuse auch signifikant kleiner verbunden mit einer reduzierten Fettmasse sowie einer Resistenz gegenüber einer diätinduzierten Fettleibigkeit und der Entwicklung einer Steatose. Als mögliche Ursache des verminderten Wachstums wurde in den IGF2BP2^{-/-}-Mäusen ein um 10 % erhöhter Energieumsatz festgestellt, welcher vermutlich aus einer gesteigerten Translation des in den Mitochondrien zur Wärmeproduktion benötigten *uncoupling proteins* UCP1 im braunen Fettgewebe resultiert. Um diese Hypothese weiter belegen zu können, wurde auch die Körpertemperatur der Tiere gemessen. Obwohl die IGF2BP2-defizienten Mäuse im unbehandelten Zustand keine veränderte Körperkerntemperatur aufwiesen, besaßen sie die Fähigkeit über einen Zeitraum von 24 Stunden ihre Körpertemperatur bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C länger aufrecht halten zu können als die Kontrolltiere [Dai *et al.* 2015].

Diese Studien belegen damit erstmals eine funktionelle und spezifische Rolle des zweiten Familienmitglieds IGF2BP2 im Glucosestoffwechsel in gesunden adulten Organismen. Weiterhin wird seine zentrale Stellung im Rahmen des Zellwachstums verbunden mit der Regulation wichtiger Stoffwechselwege wie z.B. dem Insulinsignalweg deutlich. Trotz der Identifizierung einzelner Zieltranskripte von IGF2BP2 sind die molekularen Mechanismen sowie die dafür ursächlichen Effektoren, über die IGF2BP2 seine vielfältigen Funktionen ausübt, weitestgehend unerforscht.

1.5 Der Glucose- und Energiestoffwechsel

Energie ist eine grundlegende Voraussetzung für das Leben und wird für mechanische, chemische, osmotische und elektrische Arbeit benötigt. Damit dem Körper die notwendige Energie zur Aufrechterhaltung essentieller Lebensprozesse wie bspw. Herzschlag, Atmung, Gehirntätigkeit, Körpertemperatur, Verdauung sowie zur Ausübung körperlicher Aktivität überhaupt zur Verfügung steht, muss diese Energie von außen zugeführt werden. Die mit der Nahrung aufgenommenen Nährstoffe werden zur Energiegewinnung im Körper schrittweise oxidiert. 60 % der dabei entstehenden Energie werden zur Wärmeproduktion genutzt und dienen der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur. Die restlichen 40 % werden in chemische Energie in Form von ATP umgewandelt und stehen dem Körper als Energiequelle für diverse Stoffwechselfvorgänge sowie Muskelarbeit zur Verfügung [Heinrich *et al.* 2014, Kapitel 56.1]. Während der Verdauungsvorgänge werden die aufgenommenen Nährstoffe mithilfe verschiedenster Enzyme in ihre molekularen Bestandteile zerlegt und zur Energiegewinnung nutzbar gemacht. Kohlenhydrate werden in erster Linie zu Glucose abgebaut, Proteine zu Aminosäuren und Fette zu Fettsäuren und Glycerin, welche letztlich über den Blutkreislauf zu den Körperzellen transportiert und dort zur Energiegewinnung genutzt werden. Überschüssige Energie in Form von Glucose kann der Körper in Form von Glykogen in Leber und Muskelzellen sowie überschüssiges Fett vor allem im Unterhautfettgewebe oder als Bauchfett speichern und bei Bedarf wieder mobilisieren. Glucose kann dabei sehr schnell verwertet werden und liefert rasch neue Energie während der Körper erst bei längerfristigem Energiebedarf auf die Fettreserven zurückgreift.

Das Monosaccharid Glucose ist für alle Zellen des Organismus der wichtigste Energielieferant. Glucosepflichtige Organe wie das zentrale Nervensystem (ZNS), die Erythrozyten aber auch das Nierenmark decken ihren Energiebedarf nahezu ausschließlich durch den aeroben Abbau der Glucose und sind deshalb auf eine kontinuierliche Glucosezufuhr angewiesen [Heinrich *et al.* 2014, S. 183]. Die aufgenommenen Kohlenhydrate werden im Verlauf der Verdauungsprozesse in Einfachzucker, vor allem in Glucose, gespalten, im Intestinaltrakt resorbiert und gelangen über die Pfortader in die Leber. In den Hepatozyten wird die Glucose entweder zur Bildung von Bausteinen für die Biosynthese von weiteren Monosacchariden, Heteroglycanen, Lipiden und Aminosäuren genutzt, in das Blut abgegeben oder in Glykogen umgewandelt und zur Auffüllung der Speichervorräte genutzt. Die Leber nimmt somit eine zentrale Rolle in der Glucosehomöostase ein [Heinrich *et al.* 2014, S. 772]. Sie ist sowohl in der Lage Glucose zu produzieren, zu verbrauchen oder in Form eines Polymers als Glykogen zu speichern und auf diese Weise Veränderungen aufgrund zeitlicher Schwankungen in der Aufnahme und im Verbrauch (Schlaf versus Muskelarbeit) jederzeit auszugleichen [König und Holzhütter 2014]. Durch die Abgabe einer definierten Menge Glucose in den Blutkreislauf gewährleistet die Leber die Aufrechterhaltung des Blutglucosespiegels. Dieser ist für eine beständige Versorgung der Körperzellen mit Glucose notwendig und wird daher streng kontrolliert und innerhalb eines definierten Bereiches konstant gehalten.

Die Hauptregulatoren des Glucosestoffwechsels sind zwei von den endokrinen Zellen des Pankreas in den Blutkreislauf sezernierte Hormone. Das Peptidhormon Insulin aus den β -Zellen, welches eine blutglucosesenkende Wirkung hat und sein Gegenspieler das Peptidhormon Glucagon aus den α -Zellen, was zur Erhöhung der Glucosemenge im Blut führt. Die Konzentration der beiden Hormone im Blut ändert sich dabei als direkte Reaktion auf Schwankungen der Blutglucose, auf die das Pankreas mit der Ausschüttung des jeweiligen Hormons reagiert [König und Holzhütter 2014]. An den Zielorganen binden Insulin und Glucagon an spezielle Rezeptoren, setzen auf diese Weise verschie-

dene zelluläre Signalwege in Gang und modulieren so den Verbrauch und die Produktion von Glucose in den einzelnen Organen. Die zelluläre Aufnahme der Glucose erfolgt passiv durch erleichterte Diffusion mithilfe sogenannter Glucosetransporter (GLUT). Die 14 verschiedenen GLUTs lassen sich in drei Klassen einteilen und besitzen eine zell- und gewebespezifische Expression [Heinrich *et al.* 2014, S. 199]. Für die Glucoseaufnahme in die β -Zellen ist im Menschen z.B. GLUT1, in der Maus oder Ratte jedoch GLUT2 verantwortlich [Heinrich *et al.* 2014, S. 445]. Insulin ist das wichtigste anabole Hormon und fördert neben der Senkung der Blutglucosekonzentration auch die Bildung von Energiespeichern wie des Glucosepolymers Glykogen und von Triacylglycerinen sowie das Wachstum von Zellen. Es beeinflusst den Stoffwechsel nahezu aller Gewebe. Zu den wichtigsten insulinabhängigen, also empfindlich auf Insulin reagierenden peripheren Organen gehören die Leber, der Skelettmuskel und das Fettgewebe [Behrends *et al.* 2010, S. 400].

Damit die im Blut zirkulierende Glucose von Muskel und Fettgewebe aufgenommen und zur Energiegewinnung genutzt werden kann, bedarf es der Anwesenheit von Insulin. Der Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration infolge des Glucoseabbaus löst in der pankreatischen β -Zelle eine Depolarisation der Zellmembran und folglich eine calciumvermittelte Sekretion von Insulin in das Blut aus [Heinrich *et al.* 2014, S. 445]. An den Zielzellen angelangt bindet es an seinen Rezeptor. Der Insulinrezeptor gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase und wird durch Bindung des Insulins phosphoryliert und aktiviert [Heinrich *et al.* 2014, S. 449]. Eine Reihe weiterer Phosphorylierungsreaktionen setzt verschiedene Signalkaskaden in Gang, die sowohl eine wachstumsstimulierende als auch metabolische Wirkung ausüben [Behrends *et al.* 2010, S. 399]. Zu den metabolischen Wirkungen des Insulins gehört z.B. die Senkung der Glucosekonzentration im Blut. Das wird erreicht indem Insulin sowohl die Aufnahme von Glucose in Skelettmuskel- und Fettzellen als auch deren Verwertung in Leber und Skelettmuskulatur stimuliert.

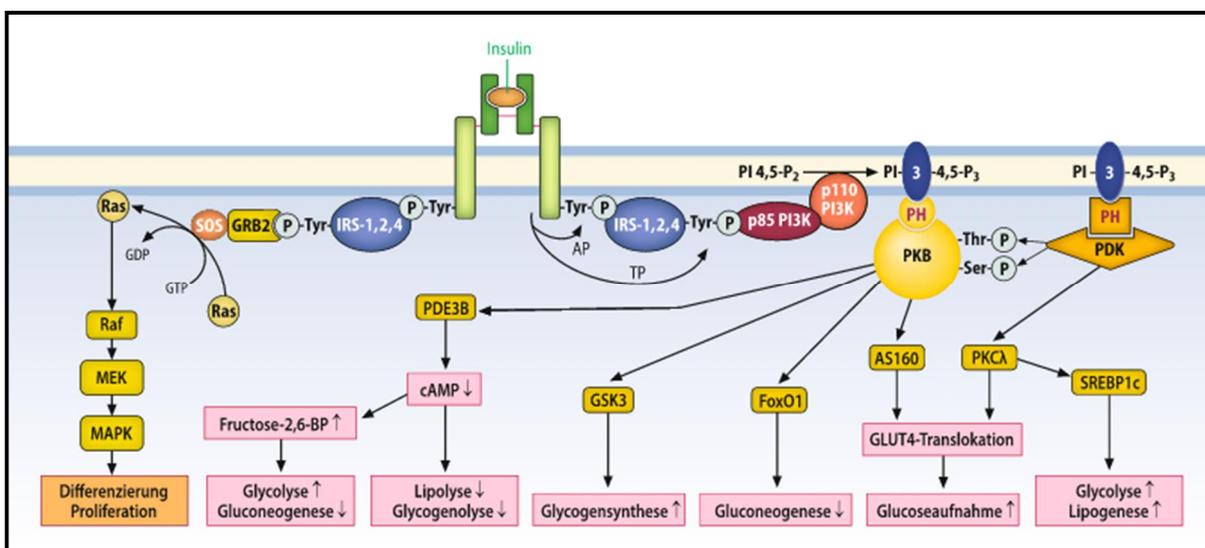


Abb. 2: Intrazelluläre Signalübertragung des Insulins (Erläuterungen siehe Text.)

Quelle: Heinrich/Müller/Graeve 2014, S. 450

Als Reaktion auf die Bildung des Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinase-Komplexes wird der sogenannte PI3K/AKT/mTOR-Signalweg aktiviert (ein Ausschnitt dessen siehe Abb. 2). Dabei wird durch mehrere vorgeschaltete Phosphorylierungsschritte die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert das Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-

3,4,5-Triphosphat (PIP₃), welches durch Bindung die Proteinkinase B (AKT) an die Zellmembran rekrutiert. Gleichzeitig wird AKT durch die Serin/Threonin-Kinase PDK1 (Phosphoinosit-abhängige Kinase) phosphoryliert und auf diese Weise aktiviert. Mithilfe der von AKT ausgelösten Aktivierung des Rab-GTPase-aktivierenden Proteins AS160 kann die Translokation von GLUT4 aus intrazellulären Vesikeln an die Zellmembran erfolgen und damit die Glucoseaufnahme aus dem Blut in Skelettmuskel- und Fettzellen gesteigert werden. Auch eine PDK1-abhängige Aktivierung der Proteinkinase C Isoform λ (PKC λ) ist für die GLUT4-Translokation entscheidend.

In der Leber, dem Skelettmuskel und Fettgewebe stimuliert Insulin den Glucosestoffwechsel, indem es einerseits die glucoseverbrauchenden Prozesse wie die Glykolyse und Glykogenbiosynthese fördert und gleichzeitig die Freisetzung aus Speichern (Glykogenolyse) sowie in der Leber die Neubildung von Glucose (Gluconeogenese) unterdrückt. Diese Wirkungen werden in erster Linie durch Änderungen der Aktivität von Schlüsselenzymen der genannten Stoffwechselwege erlangt [Behrends *et al.* 2010, S. 401]. Jedoch bewirkt allein die Aufnahme von Glucose in die Hepatozyten der Leber schon Veränderungen im Stoffwechsel. So aktiviert die vermehrt aufgenommene Glucose die Glucokinase (Hexokinase IV), was zu einer gesteigerten Phosphorylierung zu Glucose-6-Phosphat führt und dieses wiederum neben der Insulinsekretion auch die Glykogensynthese stimuliert. Ein erhöhter Insulinspiegel führt weiterhin zur Induktion der Glucokinase und reprimiert gleichzeitig den Gegenspieler, die Glucose-6-Phosphatase [Heinrich *et al.* 2014, S. 208]. Auch für diese Effekte des Insulins nimmt der PI3K/AKT-Signalweg eine zentrale Stellung ein. Die Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) wird durch AKT phosphoryliert und infolgedessen gehemmt, wodurch die Glykogensynthese in einem dephosphorylierten und somit aktiven Zustand verbleibt und in Leber und Skelettmuskel die Synthese von Glykogen fördert. Ein Absinken der intrazellulären cAMP-Spiegel wird durch die AKT-vermittelte Aktivierung der Phosphodiesterase 3B (PDE3B) verursacht und stimuliert in Leber und Fettgewebe die Glykolyse. Das Fehlen des sekundären Botenstoffes cAMP resultiert außerdem in einer Hemmung der Glykogenolyse, der Gluconeogenese sowie der Lipolyse im Fettgewebe. Diese als Folge der veränderten Phosphorylierungszustände auftretenden Aktivitätsveränderungen der vorhandenen Proteine ermöglichen eine schnelle Aufnahme der Glucose sowie eine rasche Anpassung des Stoffwechsels [Heinrich *et al.* 2014, S. 450]. Längerfristige Regulationsmechanismen schließen jedoch auch Änderungen auf der Genexpressionsebene mit ein. Eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FoxO1 inaktiviert diesen, sodass im Zellkern die Expression von Genen z.B. für die Gluconeogenese nicht mehr aktiviert werden kann. Ein weiterer durch Insulin modulierter Transkriptionsfaktor ist SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*). Dieser wird über PKC λ aktiviert und ist an der Induktion der Glucokinase, der Acetyl-CoA-Carboxylase und der Fettsäuresynthese in Leber und Fettgewebe beteiligt [Heinrich *et al.* 2014, S. 451]. Sowohl Insulin als auch Glucose tragen zur Induktion dieser Enzyme bei. Die Acetyl-CoA-Carboxylase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Biosynthese von Fettsäuren. Die stimulierende Wirkung auf die Enzyme der Fettsäuresynthese erlaubt bei einer überschüssigen Zufuhr von Nährstoffen, in erster Linie durch eine kohlenhydratreiche und fettarme Ernährung, eine Speicherung dieser Nährstoffe in Form von Fettsäuren und Triacylglycerinen und somit eine wirkungsvolle Anpassung der Lipogenese an das Nahrungsmittelangebot.

Neben den metabolischen Wirkungen von Insulin konnten bereits auch Effekte des Hormons auf Wachstums- und Differenzierungsprozesse aufgeklärt werden. Diese werden über einen weiteren Signalweg, die sogenannte mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade, moduliert. Dabei bindet die durch Insulin aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinase den GRB2-SOS-Proteinkomplex, der über die Aktivierung des membranständigen G-Proteins Ras zur Aktivierung der Kinasen Raf, MEK und ERK

führt, die wiederum Transkriptionsfaktoren modulieren können [Heinrich *et al.* 2014, S. 451]. Neben Insulin binden auch die IGFs an den Insulinrezeptor und sind somit an der Stimulation der Zelldifferenzierung und Proliferation entscheidend beteiligt [Denley *et al.* 2005]. Diese wachstumsfördernde Wirkung wird durch Hemmung apoptotischer Prozesse, z.B. über Regulation der FoxO-Proteine, unterstützt. Neben der Glucose als zentralem Regulator können auch zahlreiche weitere Faktoren, wie Aminosäuren, freie Fettsäuren, Enterohormone wie z.B. das glucagonähnliche Peptid 1 (GLP1), Adrenalin oder eine Aktivierung des Parasympathiko- bzw. Sympathikotonus die Insulinsekretion fördern oder hemmen [Behrends *et al.* 2010, S. 398].

1.5.1 Fehlregulation und pathologische Folgen

Gerät das System der Glucosehomöostase aus dem Gleichgewicht, kommt es infolge von Fehlregulationen zunächst zu Abweichungen in der Blutglucosekonzentration. Dabei wird eine zu hohe Konzentration an Glucose im Blut als Hyperglykämie und ein Unterschreiten des physiologischen Wertes als Hypoglykämie bezeichnet. Beide Formen sind für den Organismus ungünstig und sollten rasch behandelt werden. In den meisten Fällen werden sie durch eine verminderte oder verstärkte Insulinsekretion verursacht. In engem Zusammenhang mit einem Mangel an Insulin steht die Volkskrankheit Diabetes mellitus. Dabei handelt es sich um eine chronische Stoffwechselerkrankung, bei der im Wesentlichen zwei verschiedene Formen Typ 1 und Typ 2 unterschieden werden [Heinrich *et al.* 2014, S. 451]. Ursächlich für einen T1DM ist eine immunologisch durch Autoantikörper ausgelöste pathologische Veränderung der insulinproduzierenden β -Zellen, wodurch es mit fortschreitendem Krankheitsbild zu einem absoluten Insulinmangel kommt. Im Gegensatz dazu steht der T2DM, welcher durch einen relativen Insulinmangel verbunden mit einer verminderten Wirkung des Insulins gekennzeichnet ist. Trotz einer im Blutkreislauf vorliegenden physiologischen Insulinkonzentration zeigt der Organismus beim T2DM keine ausreichende Antwort darauf. Die ausbleibende oder zumeist unzureichende Reaktion auf die Ausschüttung von Insulin wird auch als Insulinresistenz bezeichnet. In beiden Formen des Diabetes mellitus kann die Glucose nicht mehr von den Körperzellen aufgenommen werden, wodurch eine Unterversorgung der Zellen mit dem wichtigsten Energiesubstrat Glucose besteht. Die Zahl der Erkrankten wächst stetig, allein in Deutschland waren im Jahr 2013 rund 7,6 Millionen Menschen von einem Diabetes mellitus betroffen [IDF Diabetes Atlas 2013, S. 13]. Mit mehr als 95 % stellt der T2DM die Haupterkrankungsform dar. Weltweit leiden rund 415 Millionen erwachsene Menschen (rund 8,8 % der Bevölkerung) an dieser Stoffwechselstörung [IDF Diabetes Atlas 2015, S. 50].

Der klinische Verlauf des T2DM ist verglichen zum T1DM eher schleichend, wobei zunächst eine milde Hyperglykämie verbunden mit einer erhöhten Insulinkonzentration im Blut (Hyperinsulinämie) auftritt. Aufgrund der Insulinresistenz von Leber, Skelettmuskel, Fettgewebe und auch dem Gehirn kommt es trotz erhöhter Insulinspiegel zu einer Hyperglykämie [Heinrich *et al.* 2014, S. 453]. Die Ursachen der Insulinresistenz sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird die Störung nicht auf Ebene der Insulinrezeptoren, sondern auf Postrezeptorebene vermutet. Das kontinuierliche Überangebot an Glucose versucht der Körper durch die verstärkte Ausschüttung von Insulin in den Blutkreislauf zu kompensieren, mit dem Ziel eine normoglykämische Stoffwechsellage zu erreichen [Behrends *et al.* 2010, S. 403]. Infolgedessen erschöpft sich die Sekretionsleistung des Pankreas und es kommt nach einiger Zeit neben der Insulinresistenz auch zu einer gestörten Insulinsekretion mit weitreichenden gesundheitlichen Folgen. Bei der Entstehung eines T2DM spielen neben der genetischen Prädisposition vor allem äußere Faktoren wie Fehlernährung, Bewegungsmangel und

Übergewicht eine entscheidende Rolle. Das spiegelt auch die Tatsache wider, dass rund 70 % aller Typ-2-Diabetiker übergewichtig sind [Heinrich *et al.* 2014, S. 453]. Das Auftreten einer Insulinresistenz und erhöhter Glucosekonzentrationen im Blut korreliert neben einer Adipositas typischerweise noch mit weiteren Erkrankungen, wie z.B. arterieller Hypertonie und einem gestörten Fettstoffwechsel, welcher zu einer Dyslipidämie führt [Heinrich *et al.* 2014, S. 453]. Diese vier Krankheitsbilder charakterisieren gemeinsam das sogenannte metabolische Syndrom. Der moderne Lebensstil in den Industrienationen, häufig verbunden mit ungesunden Lebens- und Ernährungsgewohnheiten, ist der Hauptgrund für die Zunahme des metabolischen Syndroms in der heutigen Gesellschaft. Es steigert nicht nur enorm das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, sondern trägt auch entscheidend zur Manifestation eines T2DM bei. Verdeutlicht wird dieser Zusammenhang auch dadurch, dass Erkrankungen des Herzens und der Blutgefäße in Deutschland die häufigste Todesursache darstellen [Statistisches Bundesamt 2014]. Dreiviertel aller Diabetes-Patienten sterben an einem Herzinfarkt oder Schlaganfall [diabetesDE 2016, S. 51]. Das größte Risiko ein metabolisches Syndrom zu entwickeln stellt die Zunahme des viszeralen bzw. abdominalen Fettgewebes dar. Dieses ist maßgeblich an der Entstehung einer Insulinresistenz beteiligt. Die viszeralen Adipozyten reagieren empfindlich auf lipolytisch wirksame Katecholamine, wodurch es zu einem Anstieg nicht-veresterter freier Fettsäuren im Blutplasma kommt [Heinrich *et al.* 2014, S. 453]. Diese inhibieren die Insulinwirkung in Skelettmuskel und Leber und die Folge ist eine verminderte Glucoseaufnahme in den Muskel, eine erhöhte Abgabe von Glucose aus der Leber sowie eine gestörte Insulinsekretion der β -Zellen. Aber nicht nur der Fettanteil im Bauch, sondern auch in den Organen wie Leber und dem Skelettmuskel kann sich durch vermehrte Nahrungszufuhr erhöhen und zur Entstehung einer Insulinresistenz beitragen. Dabei haben die erhöhten Fettsäurespiegel im Plasma vermutlich eine toxische Wirkung auf metabolisch aktive Zellen wie die Hepato- und Myozyten (Lipotoxizität) und auch die dauerhaft erhöhte Glucosekonzentration kann zur Induktion von metabolischem Stress führen (Glucotoxizität) und somit die Insulinsekretion negativ beeinflussen [Heinrich *et al.* 2014, S. 454]. Neben der Fettspeicherung hat das Fettgewebe im Körper noch eine weitere wichtige Rolle als Hormonproduzent [Halberg *et al.* 2008]. Die endokrine Funktion des Fettgewebes und die damit verbundene Ausschüttung von Fettgewebshormonen, den sogenannten Adipokinen stellt ein weiteres Bindeglied zwischen einem erhöhten Körpergewicht und der Entstehung einer Insulinresistenz dar. Adipokine beeinflussen maßgeblich den Energiestoffwechsel indem sie den Glucose- und Fettstoffwechsel sowie das Hungergefühl modulieren. Zu ihnen gehören neben Adiponektin, Leptin und Resistin auch Mediatorstoffe wie z.B. Interleukin 6 (IL6), der Tumornekrosefaktor α (TNF α) sowie das Monozyten-Chemoattractant-Protein 1 (MCP1) [Halberg *et al.* 2008]. Durch Aktivierung verschiedener Kinasen führt z.B. TNF α zu einer Konformationsänderung der Insulinrezeptorsubstrate (IRS) und folglich zur Inaktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase [Heinrich *et al.* 2014, S. 450]. Das vermehrt im fehlregulierten Stoffwechsel anfallende Diacylglycerin aktiviert die Proteinkinase C, welche ebenso eine hemmende Phosphorylierung der IRS-Moleküle katalysiert [Heinrich *et al.* 2014, S. 449]. Die Weiterleitung des Insulinsignals ist somit unterbunden. Das Fettgewebshormon Adiponektin ist der wichtigste Antagonist von TNF- α im Rahmen der Entstehung einer Insulinunempfindlichkeit. Es wird ausschließlich von Adipozyten im Fettgewebe produziert und liegt in ungewöhnlich hoher Konzentration im Blut vor [Heinrich *et al.* 2014, S. 453]. Seine Wirkung vermittelt es über eine Aktivierung der AMP-Kinase (AMPK), welche den oxidativen Abbau von Glucose und Fettsäuren stimuliert. Adiponektin reduziert dadurch die Menge an freien Fettsäuren im Blut und verbessert so die Insulinsensitivität der peripheren Organe. Überraschenderweise korreliert die Menge an Adiponektin in Erwachsenen negativ mit dem Körperfettanteil. Übergewichtige und Patienten mit metabolischem Syndrom haben daher eine signifikant verminderte Adiponektin-

konzentration im Blut und dasselbe konnte auch bei T2DM-Patienten beobachtet werden [Weyer *et al.* 2001]. Das komplexe Zusammenspiel der Expression und Sekretion einer Vielzahl von Signalmolekülen, verbunden mit der verstärkten Bildung von TNF- α und dem Abfall der Adiponektinkonzentration in adipösen Patienten, führen letztlich zu einer Verminderung der insulininduzierten Glucoseverwertung im Muskel sowie zu einer Reduktion der hemmenden Einflüsse auf die hepatische Glucoseproduktion [Heinrich *et al.* 2014, S. 454]. Eine Hyperglykämie ist die Folge, die unbehandelt chronisch werden kann und schwerwiegende gesundheitliche Folgen mit sich bringt. Sogenannte Spätkomplikationen betreffen den gesamten Organismus, angefangen vom Sehvermögen über die Nierenfunktion bis hin zu Schädigungen des gesamten Nerven- und Gefäßsystems. Ursächlich für das Auftreten von Katarakt, Retino-, Nephro-, Neuro- und Angiopathien sind verschiedene Stoffwechselprozesse, die vor allem durch die vermehrte Blutglucose ausgelöst werden und normalerweise eine untergeordnete Rolle spielen [Heinrich *et al.* 2014, S. 454]. Dazu zählt unter anderem die nicht enzymatische Glykierung von Proteinen unter Ausbildung sogenannter *advanced glycation endproducts* (AGEs). Dabei kommt es durch Glucose oder ihrer Derivate zu Proteinmodifikationen, die dazu führen, dass die Proteine in ihrer Struktur bzw. Funktion verändert werden und ihre eigentliche Aufgabe im Stoffwechsel nicht mehr erfüllen können. Das Auftreten und Ausmaß dieser chronischen Begleiterkrankungen entscheidet letztlich über das individuelle Schicksal der Patienten. Eine Umstellung der Ernährungs- und Lebensgewohnheiten ist im Frühstadium des metabolischen Syndroms meist die wirksamste Therapie.

1.6 Die transgene Maus als Modellorganismus

Die Hausmaus (*Mus musculus*) ist einer der beliebtesten Modellorganismen zur Untersuchung erblich bedingter und pathologischer Mechanismen in der biomedizinischen Forschung. Sie ist neben dem Menschen der genetisch am besten charakterisierte Säuger und weist sowohl genetische als auch entwicklungsbiologische, physiologische und anatomische Ähnlichkeiten zum Menschen auf [Boguski 2002]. Durch ihre Größe und die schnelle Generationszeit, verbunden mit einer hohen Anzahl an Nachkommen pro Wurf sind Mäuse ideale und leicht zu haltende Versuchstiere. Ihr Einsatz in der Forschung hat mit der Entwicklung transgener Technologien immens an Bedeutung gewonnen. Transgene Tiere zeichnen sich dadurch aus, dass ihr Erbgut durch eine gezielte Mutation verändert wurde und diese Mutation stabil an die Nachkommen weitervererbt wird. Dabei kann entweder ein zusätzliches Gen eingefügt werden um (über-)exprimiert zu werden, was zu einem Funktionsgewinn (*gain of function*) führt oder aber ein Gen z.B. durch Unterdrückung der Synthese von Genprodukten herab reguliert (knockdown oder *gene silencing*), durch Genmodifikationen verändert (*knock-in*) oder durch Inaktivierung der entsprechenden Gensequenzen (knockout) ganz ausgeschaltet werden, was zu einem Verlust der spezifischen Funktion führt (*loss of function*). Das zusätzlich in das Genom eingebrachte Gen stammt in der Regel aus einer anderen Spezies und wird daher als „Transgen“ bezeichnet. In der medizinischen Forschung ist das Transgen meist humanen Ursprungs, um mithilfe dessen Funktionsanalyse im Organismus die Entwicklung therapeutischer Verfahren für die Humanmedizin vorantreiben zu können. Der Begriff „transgene“ Tiere wurde in den frühen 80iger Jahren von Gordon und Ruddle geprägt, als es erstmals gelang transgene Mäuse zu generieren [Gordon und Ruddle 1981]. Mit dem Einfügen des Wachstumshormongens aus der Ratte in die Keimbahn der Maus wurde 1982 ein wesentlicher Durchbruch im Verständnis, der Anwendung und der Erzeugung transgener Tiere erzielt [Palmiter *et al.* 1982]. Die Entwicklung der Technologie des Integrierens zusätzlicher Gene in ein Säugetier erweiterte nicht nur das Spektrum der möglichen Manipulationen

im Mausgenom, sondern ermöglichte es den Forschern nun Genfunktionen auch im Zusammenhang des Gesamtorganismus, also *in vivo*, zu untersuchen und somit komplexe Fragestellungen in der genetischen, biologischen und medizinischen Grundlagenforschung zu beantworten. Darunter zählt auch die Klärung der Frage, welcher Phänotyp durch eine gezielte Modifikation des Erbguts hervorgerufen wird und nicht mehr länger die wesentlich aufwändigere Suche nach den zugrundeliegenden Mutationen der durch Mutagenese hervorgerufenen Phänotypen.

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche unterschiedliche Techniken zur Erzeugung transgener Tiere entwickelt. Zu den zwei am häufigsten angewendeten, aber grundlegend verschiedenen Methoden, gehören die Mikroinjektion (auch als Vorkern- oder Pronukleusinjektion bezeichnet) und die homologe Rekombination (*gene targeting*). Obwohl die erste Beschreibung des Verfahrens der Mikroinjektion bereits 1966 publiziert wurde [Lin 1966], gelang es erst 14 Jahre später diese auch Erfolg versprechend anzuwenden. Dabei wird ein artifizielles DNA-Konstrukt etwa 12 Stunden nach der Kopulation (E0,5) meist in den größeren männlichen Vorkern der befruchteten Eizelle injiziert [Gordon *et al.* 1980]. Durch einen bisher unbekanntem Mechanismus wird diese fremde DNA an nicht vorhersehbaren Stellen in das Empfängergenom integriert und mit den folgenden Zellteilungen der Zygote weitergegeben. Daher besitzen bei einer erfolgreichen genomischen Integration alle Zellen des sich entwickelnden Organismus das fremde DNA-Konstrukt, was die Wahrscheinlichkeit der Weitergabe an die Nachkommen deutlich erhöht. Eine oder mehrere Kopien der transgenen DNA können dabei zufällig in das Genom integrieren. Die manipulierten Zygoten werden anschließend in die Eileiter eines scheinträchtigen Empfängertieres transferiert und ausgetragen. Bei der homologen Rekombination erfolgt mithilfe von DNA-Vektoren eine gezielte Manipulation von zuvor isolierten embryonalen Stammzellen [Capecchi 1989]. Im Gegensatz zur ungerichteten, aber schnellen und meist auch erfolgreichen Methode der Mikroinjektion ist die Anwendung der homologen Rekombination technisch sehr aufwendig und zeitintensiv. Weitere Verfahren beinhalten die retrovirale oder lentivirale Infektion von frühen Embryonen [Soriano *et al.* 1986, Lois *et al.* 2002, Pfeifer *et al.* 2002] sowie die intrazytoplasmatische Spermieninjektion [Perry *et al.* 1999]. Dabei können die einzelnen Methoden auch kombiniert angewendet werden. Das ist besonders dann von Bedeutung, wenn homozygot inaktivierte Gene zur Letalität der Versuchstiere führen. Zur Umgehung des Problems wurden konditionelle Tiermodelle etabliert die z.B. mithilfe des bakteriellen Rekombinationssystems *Cre/loxP* generiert werden und somit eine Regulierbarkeit der Transgenexpression ermöglichen [Nagy *et al.* 2003].

1.7 Zielstellung der Arbeit

Die Proteine der IGF2BP-Familie gehören zu den RNA-bindenden Proteinen und besitzen essentielle regulatorische Eigenschaften im Rahmen der posttranskriptionellen Genregulation. Während die Rolle der IGF2BPs in der embryonalen Entwicklung sowie in Tumoren recht zahlreich untersucht ist [Bell *et al.* 2013], ist kaum etwas über ihre Funktion in normalen adulten Zellen und Geweben bekannt. Für IGF2BP2 wurde in einer Vielzahl von genomischen Korrelationsstudien von einer meist negativen Assoziation mit dem Risiko einen T2DM zu entwickeln berichtet. Wenige *in vivo* Studien konnten bisher einen tatsächlichen Einfluss des Proteins auf den Stoffwechsel, insbesondere den Glucosemetabolismus, nachweisen [Kawasaki *et al.* 2015, Dai *et al.* 2015]. Erste arbeitsgruppeninterne Untersuchungen im Zellkulturmodell bestätigten diesen Effekt. Eine Reduktion von IGF2BP2 ging mit einer veränderten mRNA-Expression von Enzymen, welche z.B. in der Glykolyse oder Gluconeogenese eine Rolle spielen und eine Überexpression von IGF2BP2 mit einer Verringerung der Glucosekonzentration im Medium der Zellen einher [unveröffentlichte Daten von Marlen Mrotzek und Kristin Wächter]. Diese Ergebnisse belegen eine Beteiligung des IGF2BP2 an der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels.

Um die physiologische Funktion des Proteins *in vivo* analysieren zu können, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals ein transgenes Überexpressionsmodell für IGF2BP2 etabliert und phänotypisch charakterisiert werden. Dazu wurde die längste Variante des IGF2BP2-Proteins ausgewählt, welche in Tumoren scheinbar am häufigsten exprimiert wird und somit möglicherweise die für den Stoffwechsel entscheidende der IGF2BP2-Isoformen darstellt. Eine Besonderheit des hier untersuchten Modells ist zudem die Überexpression des humanen IGF2BP2 in der Maus. Damit soll die Frage geklärt werden, welchen Einfluss das humane Protein auf den Stoffwechsel der Tiere sowie deren Wachstum hat. Da es derzeit keine Belege dafür gibt, dass sich die IGF2BPs hinsichtlich ihrer RNA-Bindung oder Proteininteraktion stark unterscheiden und weiterhin ungeklärt ist, inwieweit es funktionelle Unterschiede zwischen ihnen gibt, sollten auch transgene Mäuse generiert werden, die IGF2BP1 bzw. IGF2BP3 überexprimieren. Neben der ubiquitären Expression der humanen Proteine sollten auch Tiere mit einer leberspezifischen Überexpression der einzelnen IGF2BPs in die Analyse miteingeschlossen werden. Ursächlich dafür ist neben der postulierten Funktion der IGF2BP2-Isoform p62 als Induktor einer Steatose [Tybl *et al.* 2011] auch die bereits nachgewiesene unterschiedliche Expression und Regulation von IGF2BP2 vor allem in den glucoserelevanten Organen [Marselli *et al.* 2010, Chistiakov *et al.* 2012].

Im Fokus der phänotypischen Charakterisierung der transgenen Mäuse stand neben der Analyse der Glucosehomöostase, verbunden mit der Durchführung verschiedener klinischer Methoden wie der Bestimmung der Blutglucosekonzentration sowie einem Glucose- und Insulintoleranztest, auch die Erfassung anthropometrischer Parameter der Tiere, deren Ernährungsverhalten und Energieumsatz. Da dabei ein signifikanter Einfluss von IGF2BP2 auf die Glucosetoleranz der Tiere festgestellt wurde, sollten die Mäuse im nächsten Schritt einer hochkalorischen Diät ausgesetzt werden. Ziel dieses Teilversuches war es, bei den Mäusen eine Fettleibigkeit zu induzieren verbunden mit ersten Anzeichen eines T2DM, um dabei eine positive oder negative Beeinflussung durch IGF2BP2 zu erfassen und somit IGF2BP2 als potenzielles metabolisches Zielmolekül für die klinische Relevanz einer Störung im Kohlenhydratstoffwechsel validieren zu können.

2 Material

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anderweitig aufgeführt, von den Firmen Sigma-Aldrich® (Taufkirchen) und Carl Roth® (Karlsruhe) bezogen. Für Produkte der Marken Invitrogen™, Gibco™, Novex™ und Applied Biosystems™ wurde Life Technologies™ (Darmstadt) als Bezugsquelle genutzt.

Petrischalen und Testplatten für die Zellkultur wurden von TPP® (Trasadingen, Schweiz) bezogen. Sterile Zellkulturösungen wie DMEM, GlutaMax™, Insulin-Transferrin-Selenium (ITS-G), FBS, Trypsin-EDTA, PBS und HEPES waren von der Marke Gibco™.

Die in der RT-Reaktion und der nachfolgenden RT-PCR verwendeten Reagenzien wurden von der Firma Promega (Mannheim) bezogen und der SYBR® Select Master Mix von Applied Biosystems™.

2.1 Reagenzien, Primer und tierexperimentelle Materialien

Blutzuckermessgerät: Accu-Chek® Performa	Roche, Mannheim
Blutzuckerteststreifen: Accu-Chek® Inform II	Roche, Mannheim
Isofluran/Forene®	Abbott, Wiesbaden
Keramikugeln, Precellys® Bulk Beads (zirconium oxide beads)	Peqlab, Erlangen
Precellys®24	Peqlab, Erlangen
Primer	Microsynth, Balgach (Schweiz)
Tuberkulinspritzen mit Spardorn (1 mL)	Dispomed, Gelnhausen

Eine Auflistung der Sequenzen für die verwendeten Primer befindet sich in Tabelle 4.

2.2 Kit-Systeme

DC™ (detergent compatible) protein assay Kit	Bio-Rad, München
Glycogen Assay Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
miRNeasy Kit	QIAGEN, Hilden
Mouse Hemoglobin A1c (HbA1c) Kit	Crystal Chem, Illinois USA
REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Hilden

Die verwendeten ELISA-Kits sind in Tabelle 6 gesondert aufgelistet.

2.3 Geräte und Software

Infinite® M200PRO Spektrometer	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Reinstwasseranlage SG Ultra Clear UV Plus	SG Wasseraufbereitung, Barsbüttel
DNASTAR Lasergene® 7.1	DNASTAR®, USA
EndNote® X7.1	Thomson Reuters, USA
Image Studio™	LI-COR®, Bad Homburg
Microsoft Office	Microsoft® Corporation, USA
SigmaPlot® 11.0	Systat Software GmbH, Erkrath

Die hier nicht aufgeführten Geräte und verwendete Software werden in dem jeweiligen Kapitel gesondert benannt.

3 Versuchstiere und Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Herkunft, Zucht und Haltung

Die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse gehören dem Inzuchtstamm C57BL/6J01aHsd an und stammen ursprünglich aus der Zucht des Max-Planck-Institutes für Molekulare Zellbiologie und Genetik (CBG) in Dresden. In der *Transgenic Core Facility* des CBG unter Leitung von Herrn Ronald Naumann wurden die zuvor in unserer Arbeitsgruppe, von Herrn Nikolaos Pazaitis und Herrn Dr. Marcell Lederer, klonierten DNA-Konstrukte erfolgreich in befruchtete Eizellen mikroinjiziert. Die aus den genetisch manipulierten Eizellen herangewachsenen Tiere wurden in der *Transgenic Core Facility* auf die genomische Integration und somit die Expression des jeweiligen DNA-Konstruktes mittels PCR getestet und die positiven Tiere nach Halle (Saale) gesandt. Die als positiv, die transgene DNA im Genom tragend, identifizierten Tiere werden im Allgemeinen als *Founder*- oder *Stammtiere* bezeichnet, da aus jedem dieser Tiere später ein individueller Mausstamm hervorgeht. Zu Beginn der Arbeiten wurde jedes *Stammtier* zunächst mit einem Wildtyp-Tier des gleichen Mausstammes verpaart, um sukzessive eine Zucht der verschiedenen transgenen Stämme aufbauen zu können. Die aus dieser ersten Verpaarung mit Wildtyp-Tieren erhaltenen Tiere der ersten Filialgeneration (F1) wurden genotypisiert (siehe Kapitel 3.1.2) und die genomisch positiven Tiere anschließend untereinander verpaart. Auf die gleiche Weise erfolgte die Zucht aller nachfolgenden Generationen. Dabei wurde das Verfahren einer polygamen und permanenten Verpaarung gewählt. Im Alter von 4 Wochen wurden die Mäuse abgesetzt und von jedem Tier mittels einer Schere ein ca. 2 - 3 mm langes Stück der Schwanzspitze für die Genotypisierung abgenommen.

Die Mäuse wurden in den Versuchsterräumen des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) im ZAMED in offenen Käfigsystemen (Typ II lang, maximal fünf Tiere pro Käfig) bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten. Zur Fütterung wurden pelletierte Standarddiäten für Labormäuse (#1324 - Haltungsfutter bzw. #1314 - Zuchtfutter der Firma Altromin) verwendet und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

3.1.2 Genotypisierung

Für eine erfolgreiche Identifizierung der transgenen Tiere ist es notwendig nachzuweisen, dass die genetische Manipulation der *Stammtiere* keimbahngängig ist und somit die fremde DNA auch an deren Nachkommen weitervererbt wird. Die Biopsien der Schwanzspitzen wurden dafür entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zu ihrer Nutzung bei -20 °C gelagert. Die Isolation der genomischen DNA erfolgte mit dem *REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit* (Sigma-Aldrich) gemäß den Angaben des Herstellers. Zum Sparen von Ressourcen wurde jedoch nur jeweils der halbe Ansatz sowohl für die DNA-Isolation als auch für die nachfolgende PCR-Reaktion (siehe Kapitel 3.6.4.1) pipettiert.

Als Ergebnis der in Abb. 3 beispielhaft gezeigten Genotypisierung wiesen die Mäuse 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10 und 11 die DNA für das BiPro-IGF2BP2-Konstrukt auf und konnten als genomisch positiv und folglich als transgen deklariert werden. Die Mäuse 3, 5 und 9 zeigten dahingegen lediglich die untere Kontrollbande der IGF2BP1-Intronsequenz und konnten somit eindeutig als genomisch negativ und damit als Wildtyp-Tiere identifiziert werden.

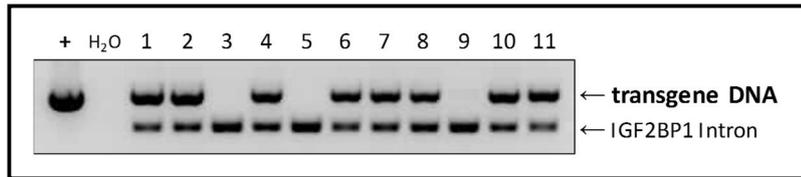


Abb. 3: Genotypisierungs-PCR genomischer DNA aus der Schwanzspitze verschiedener Mäuse
Gezeigt ist das Ergebnis einer Multiplex-PCR zur Genotypisierung am Beispiel von 11 Nachkommen der IGF2BP2-Stämme. Zur Kontrolle der erfolgreichen DNA-Isolation wurde ein zweites Primerpaar für eine genomische Intronsequenz des IGF2BP1-Gens zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Dieses kleinere PCR-Produkt diente als Kontrolle des Hinzufügens von DNA und sollte in jedem Ansatz zu sehen sein. Des Weiteren wurde als Positiv- und Größenkontrolle (+) das jeweilige transgene DNA-Konstrukt (hier: BiPro-IGF2BP2) in die PCR eingesetzt und Wasser diente als Negativkontrolle.

Der positive Nachweis der transgenen DNA lässt jedoch noch keinen Rückschluss auf eine adäquate Transkription sowie Translation dieser DNA-Bereiche zu. Der Integrationsort im Genom spielt dabei eine entscheidende Rolle. Ein Vorteil der Expression der transgenen Konstrukte unter Kontrolle des Ubiquitin-Promoters (UbC) bestand darin, dass nicht nur die transgene DNA, sondern auch das humane Protein in der Schwanzspitze der UbC-Mäuse nachweisbar war. Dieser Aspekt wurde genutzt und aus den Schwanzspitzen der UbC-Tiere keine DNA, sondern Gesamtprotein (siehe Kapitel 3.7.1) isoliert, um direkt die transgenen Proteine mittels *Western Blot* Analysen nachweisen zu können.

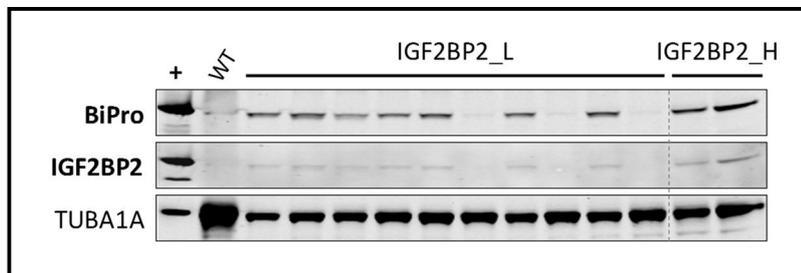


Abb. 4: Nachweis des transgenen BiPro-IGF2BP2-Proteins in der Schwanzspitze der Mäuse
Zur Identifizierung transgener UbC-IGF2BP2-Tiere wurde aus den Schwanzspitzenbiopsien dieser Mäuse Gesamtprotein isoliert. Gezeigt ist eine *Western Blot* Analyse am Beispiel der beiden IGF2BP2 überexprimierenden transgenen Stämme IGF2BP2_L und IGF2BP2_H. Als Positivkontrolle (+) diente Protein von HEK293T-Zellen, welche zuvor mit dem jeweiligen Konstrukt (hier: UbC-BiPro-IGF2BP2) transient transfiziert worden sind. Protein aus den Schwanzspitzen von Wildtyp-Mäusen (WT) diente als Negativkontrolle. Detektiert wurden sowohl das humane IGF2BP2-Protein mittels eines *Tag*-spezifischen BiPro-Antikörpers sowie das Protein an sich, wobei der verwendete Antikörper sowohl das murine als auch humane IGF2BP2 erkannte. α -Tubulin 1A (TUBA1A) diente als Ladekontrolle.

Von den zwölf Tieren des in der Abb. 4 gezeigten Beispiels konnte bei neun Mäusen die Expression des humanen IGF2BP2-Proteins mittels des BiPro-Tags nachgewiesen werden, wohingegen drei der zum IGF2BP2_L-Stamm gehörenden Tiere keine nennenswerte Proteinmenge aufwiesen. Das in diesen Proben schwach auftretende BiPro-Signal scheint aus einer Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen Proteinen zu resultieren, da es auch in den Wildtyp-Tieren detektiert werden konnte. Die Abwesenheit des IGF2BP2-Proteins ließ sich dennoch eindeutig bestätigen.

Mittels der zwei aufgeführten Methoden zur Genotypisierung erfolgte das Aussortieren der erhaltenen Stammtiere. Nur Mäuse, welche die transgene DNA an ihre Nachkommen weitergaben, wurden für die Zucht und Etablierung der transgenen Stämme genutzt. Eine Genotypisierung wurde anschließend für jedes einzelne Tier durchgeführt. Nach dem erfolgreichen Nachweis der Synthese der ubiquitär exprimierten Proteine in der Schwanzspitze der UbC-Mäuse wurde die Genotypisierung der weiteren Nachkommen dieser Stämme wieder auf das Durchführen einer RT-PCR reduziert.

3.2 Tierexperimentelle Methoden

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden gemäß §8 des Tierschutzgesetzes beim Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt beantragt und nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes sachgemäß durchgeführt.

Genehmigungsnummer/Aktenzeichen:

- Glucose- und Insulintoleranztests: 42502-2-1185 MLU
- Hochfettdiät inklusive metabolischer Tests: 42502-2-1262 MLU

Die Durchführung eines Großteils der Versuche erfolgte im Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der Martin-Luther-Universität unter Leitung von Tierärztin Frau Dr. Barbara Schreier. Daher wurden die zu untersuchenden Tiere zur Eingewöhnung mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn in die versuchsbegleitende Tierhaltung des Julius-Bernstein-Instituts überführt und dort untergebracht.

Anzumerken ist noch, dass die Untersuchungen als auch die Probengewinnung sowohl der IGF2BP-Versuchstiere als auch der dazugehörigen Kontrollstämme stets gleichzeitig in einer gemischten Analyse sowie möglichst auch zur selben Tageszeit durchgeführt wurden. Ebenso wurde gewährleistet, dass in molekularbiologischen Analysen wie z.B. bei der Isolation von RNA oder Protein als auch bei der Messung von klinisch-chemischen Parametern die Proben der Versuchs- sowie der Kontrolltiere stets in einem Durchgang gemeinsam behandelt wurden.

3.2.1 Narkose

Während der Durchführung eines Glucose- sowie Insulintoleranztests waren die Tiere narkotisiert. Dazu wurden ihnen auf das individuelle Körpergewicht (KGW) berechnet nach einer 6-stündigen Nahrungskarenz 0,05 mg/g KGW Pentobarbital und zehn Minuten später 0,5 mg/g KGW Urethan intraperitoneal (i.p.) gespritzt mit einem Injektionsvolumen von 1 µL/g KGW bzw. 1,25 µL/g KGW (Nadel: 26 G, B.Braun). Nach Ausfall des Schwanz- und Zwischenzehenreflexes wurden die Tiere für die Dauer des Versuches auf eine Heizmatte gelegt, um ihre Körpertemperatur aufrecht zu erhalten. Die Reflexe wurden während der mehrstündigen Versuche fortwährend kontrolliert, um den Tieren bei Bedarf Narkosemittel nach zu injizieren.

Die Untersuchung an narkotisierten Tieren ist daher sinnvoll, da jeglicher Stress für die Tiere durch das ungewohnte Hantieren sowie ausgeführte Bewegungen der Tiere selbst Veränderungen im Glucosestoffwechsel verursachen können. Der Anstieg von Katecholaminen würde bspw. eine vermehrte Insulinausschüttung in das Blut verursachen oder Muskelbewegungen einen erhöhten Energieverbrauch bedingen. Daher wurden die Tiere mindestens eine Stunde in tiefer Narkose

belassen, bevor mit den jeweiligen Versuchen begonnen wurde. Auf diese Weise konnten mögliche hormonelle Effekte resultierend aus der Überexpression der IGF2BPs nicht verfälscht und zudem eine Verfälschung der Versuchsergebnisse aus den genannten Gründen ausgeschlossen werden.

3.2.2 Oraler Glucosetoleranztest (OGTT)

Ein Glucosetoleranztest (OGTT) ist eine medizinisch anerkannte Methode zur Bestimmung der Glucoseverwertung im Organismus und zur Diagnose eines Diabetes mellitus. Getestet wird dabei, ob durch das Zusammenwirken von Glucose, Insulin und der peripheren Organe die zugeführte Glucosebelastung adäquat verstoffwechselt werden kann.

Für die medizinische Durchführung eines OGTT muss der Proband für mindestens zehn Stunden nüchtern sein. Nach der Bestimmung des Nüchtern-Blutglucosewertes nimmt er innerhalb von fünf Minuten eine in 250-300 mL Wasser aufgelöste Glucosemenge von meist 75 g zu sich [Kerner und Brückel 2012]. Nach einer zweistündigen Testdauer wird erneut der Blutglucosewert bestimmt und anhand vorhandener Referenzwerte eine Diagnose gestellt. Die physiologischen Abläufe während des OGTT spiegeln sich in den Veränderungen des Blutglucosewertes wider.

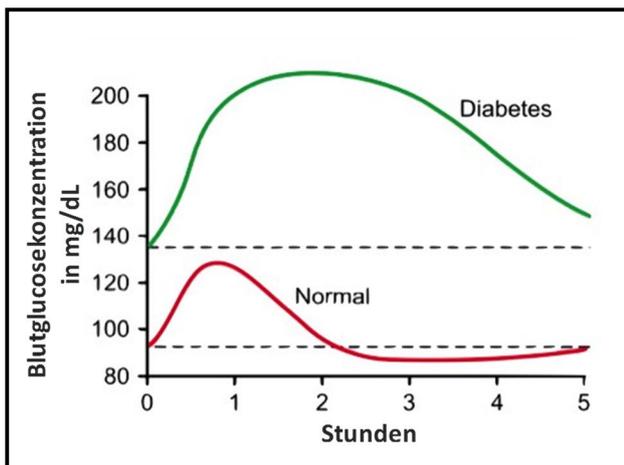


Abb. 5: Verlauf der Glucosekonzentration während eines OGTT in einem gesunden Probanden (Normal) und einem Patienten mit einem T2DM (Diabetes)

Bei Diabetes-Patienten ist der Nüchtern-Blutglucosewert bereits deutlich erhöht und sie zeigen allgemein einen unnormalen Kurvenverlauf. Ihre Blutglucosekonzentration steigt zunächst enorm an und erreicht erst nach über vier Stunden ihren Ausgangswert, wenn dies überhaupt der Fall ist. Ein Absinken unterhalb des Ausgangswertes bleibt meist aus.

Modifiziert nach Guyton/Hall 2006, S. 975

Ausgehend vom Nüchternwert kommt es durch die Aufnahme der Glucose zu einem Anstieg des Blutglucosewertes (Abb. 5). Dieser bewirkt eine Freisetzung des Hormons Insulin aus dem Pankreas, welches daraufhin seine physiologischen Funktionen ausübt und die Aufnahme, Speicherung und Verstoffwechslung der Glucose in den peripheren Organen ermöglicht. Folglich wird der Glucose-Spiegel im Blut wieder auf seinen Ausgangswert bzw. einen im physiologischen Bereich liegenden Wert eingestellt. Das sollte spätestens nach zwei Stunden erfolgt sein. Liegt die Konzentration der Glucose zu diesem Zeitpunkt in einem Wertebereich von 7,8 - 11,0 mM (140 - 199 mg/dL) ist die Glucosetoleranz des Patienten gestört. Werte über 11,1 mM (200 mg/dL) deuten bereits auf einen Diabetes mellitus hin [Kerner und Brückel 2012].

Die zugrundeliegende Ursache, ob es sich um eine verminderte Ausschüttung (T1DM) oder Wirksamkeit des Insulins (T2DM) handelt kann aus dieser Methode jedoch nicht geschlussfolgert werden. Eine Unterscheidung kann erst durch weitere Analysen wie z.B. einer Messung der Insulinmenge im Blut getroffen werden.

Bei der Durchführung des OGTT wurden die Tiere sechs Stunden vor Versuchsbeginn (von 6 Uhr morgens bis 12 Uhr mittags) nüchtern gesetzt [Pacini *et al.* 2013], Wasser stand während der ganzen Zeit *ad libitum* zur Verfügung. Nachdem die Tiere in tiefer Narkose lagen, wurde ihnen mit einem Skalpell ein ca. 2 mm langes Stück der Schwanzspitze amputiert und vorsichtig zwei bis drei Tropfen Blut entnommen. Anschließend wurde der Nüchtern-Blutglucosewert mithilfe eines Accu-Chek® Performa Blutzuckermessgerätes bestimmt. Der Test begann mit der oralen Applikation einer 20 %igen (w/v) Glucoselösung (2 mg/g KGW, Applikationsvolumen: 10 µL/g KGW) in den Magen. Dazu wurden die Mäuse mit einer Hand im Nacken und am Schwanz fixiert, der Kopf überstreckt und eine leicht gebogene Knopfkanüle (18 G, Fine Science Tools) vorsichtig über den Zungengrund in den Rachen und bis in den Magen vorgeschoben. Nachfolgend wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (15, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten) die Blutglucosewerte bestimmt. Auch hierfür wurden zu jedem Zeitpunkt vorsichtig zwei bis drei Blutstropfen aus dem Schwanz der Tiere heraus massiert. Dazu war es nicht notwendig neue Verletzungen an der Schwanzspitze zu setzen, da nach dem Entfernen des zuvor geronnenen Blutes jederzeit eine frische Blutprobe vermessen werden konnte. Zusätzlich zu den Bestimmungen des Blutglucosewertes wurden zu jedem Zeitpunkt kleine Mengen Serum gewonnen und für spätere molekularbiologische Analysen bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Intraperitonealer Insulintoleranztest (IPITT)

Bei einem IPITT wird durch die Gabe einer definierten Insulinmenge die Reaktionsfähigkeit und damit die Insulinsensitivität vornehmlich der peripheren Organe wie Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe getestet.

Der einzige Unterschied in der Versuchsdurchführung im Vergleich zum OGTT war, dass statt der oralen Gabe von Glucose in tiefer Narkose, den Tieren 0,5 I.E./kg KGW Insulin (Huminsulin® Normal 100, Lilly) i.p. mit einem Injektionsvolumen von 3,6 µL/g KGW injiziert wurde (Nadel: 26 G, B.Braun). Die Glucosekonzentration im Blut reduziert sich im Vergleich zum OGTT daraufhin schrittweise. Aus diesem Grund und der damit verbundenen Gefahr einer Hypoglykämie wurde die Dauer des Tests auf 120 Minuten beschränkt.

3.2.4 Analyse der Körper- und Organgewichte

Das Körpergewicht der Tiere wurde direkt vor bzw. im Anschluss an die durchgeführten Tests bestimmt. Dazu wurden die Mäuse kurzzeitig in einen bereits auf der Waage befindlichen und austarierten Messbecher gesetzt und ihr Gewicht auf 0,1 g genau gewogen.

Nach Abschluss der Versuche wurden die narkotisierten Tiere durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mittels einer kleinen Glaskapillare (minicaps®, Hirschmann) entblutet und durch zervikale Dislokation des Rückenmarks tierschutzgerecht getötet. Die fünf Tage alten Jungtiere wurden direkt nach der Trennung vom Muttertier durch Dekapitation getötet und entblutet. Anschließend wurde die Bauchhöhle der Tiere eröffnet und die einzelnen Organe und Gewebe entnommen, auf 0,1 mg genau gewogen, zerteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Bei den Messwerten der Niere handelt es sich stets um das Gewicht beider Nieren, denen zuvor die sie umgebende Nierenkapsel entfernt wurde. Der Schienbeinknochen (Tibia) wurde heraus präpariert und mit einer handelsüblichen digitalen Schieblehre dreimal auf 0,1 mm genau vermessen. Der aus den erhaltenen Messdaten gebildete Mittelwert repräsentierte die Länge

der Tibia. Aufgrund von nahrungsbedingten Gewichtsunterschiede sowie dem steten Wachstum der Tiere ist es üblich die Messwerte der einzelnen Gewichte nicht auf das Körpergewicht, sondern die individuelle Länge der Tibia zu normalisieren.

Für die Untersuchung der verschiedenen Entwicklungsstadien der Mäuse wurden diese in der Zeit von 7 bis 9 Uhr morgens zeitlich begrenzt verpaart. Ausgehend von diesem Zeitpunkt der möglichen Befruchtung wurden die Embryonen am gewünschten embryonalen Tag E12,5 bis E18,5 durch Sektion aus den tragenden Muttertieren entnommen und sofort durch Dekapitation getötet. Die Muttertiere wurden zuvor kurzzeitig mit Isofluran betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet.

3.2.5 Erfassung der Nahrungsaufnahme

Die Erhebung der Daten für die aufgenommenen Mengen an Futter und Wasser erfolgte während der üblichen Haltung der Tiere mit der Standarddiät sowie während der Behandlung mit der Hochfettdiät (HFD). Dabei wurde ein Teil der Kohorte für die HFD-Versuche zunächst unter Standardbedingungen analysiert und direkt im Anschluss, zusammen mit anderen Versuchstieren, während der HFD weiter beobachtet.

Unter der Standarddiät wurde die Futter- und Wasseraufnahme einmal wöchentlich über einen Zeitraum von 2 - 4 Wochen erfasst. Dies erfolgte jeweils beim Umsetzen der Tiere, indem das neue Futter eingewogen und eine Woche später die Menge des verbliebenen Futters von dem ersten Messwert abgezogen wurde. Die gleiche Vorgehensweise erfolgte auch für die Wasserflaschen der Tiere. Die so erhobenen wöchentlichen Messwerte wurden durch die Anzahl der in dem jeweiligen Käfig sitzenden Tiere, die Anzahl an Tagen sowie das wöchentlich erfasste Körpergewicht der Mäuse geteilt und die erhaltenen Werte der täglichen Nahrungs- bzw. Wasseraufnahme anschließend gemittelt. Bei der Ermittlung des absoluten Wasserverbrauchs wurde zudem berücksichtigt, dass auch die zuvor empirisch ermittelte Menge an auslaufendem Wasser beim Umdrehen der verwendeten Wasserflaschen (ca. 0,8 mL) in die Berechnung mit einbezogen wurde. Bezüglich der weiblichen IGF2BP2_H-Tiere ist anzumerken, dass in dem vorgesehenen Zeitraum nur ein einziges Tier analysiert werden konnte und somit insgesamt nur drei Werte in diese Datenerhebung einfließen.

Während der insgesamt 10-wöchigen Diätbehandlung wurde die Menge an aufgenommenem Futter und Wasser aufgrund der beschleunigten Verderblichkeit des fetthaltigen Futters dreimal pro Woche protokolliert. Dazu wurden ebenso wie bei der Standarddiät die Pellets bzw. das Wasser immer frisch eingewogen und die Differenz zur verbliebenen Futter- bzw. Wassermenge berechnet.

3.2.6 Messung der Körpertemperatur

Bei den transgenen Tieren erfolgte die Erfassung der Körperkerntemperatur rektal mittels einer Sonde an drei verschiedenen Tagen jeweils in einer Dreifachbestimmung. Dazu wurden die Mäuse mit einer Hand im Nacken und am Schwanz fixiert, die Sonde (Bioseb) vorsichtig in das Rektum eingeführt und einige Sekunden gewartet, bis der angezeigte Wert am Thermometer (Bioseb) konstant blieb. Dieser wurde dann notiert. Für die Dreifachbestimmung wurde der Messfühler nicht vollständig aus dem Rektum der Maus entfernt, sondern nur etwas herausgezogen und erneut eingeführt. Damit konnte sowohl die Belastung für die Tiere als auch die Dauer der Messung

minimiert werden. Zwischen den einzelnen Messtagen lagen mindestens zwei Ruhetage für die Mäuse. Insgesamt trug jedes gemessene Tier mit neun Messwerten zum Gesamtergebnis dieser Analyse bei.

3.2.7 Probengewinnung

3.2.7.1 Blutabnahme, Blutglucosebestimmung und Serumgewinnung

Die Blutabnahme erfolgte stets an zuvor narkotisierten Mäusen. Bei der Bestimmung der Glucosekonzentration im Blut wird in Abhängigkeit von der Nahrungszufuhr zwischen dem basalen und dem Nüchtern-Blutglucosewert unterschieden. Für die Messungen der basalen Blutglucosewerte wurden die adulten Tiere durch Inhalation einer gering dosierten Menge an Isofluran (ca. 3,5 % / L Sauerstoff) mithilfe eines speziellen Verdampfers (Ohmeda Isotec 4, Groppler) kurzzeitig narkotisiert. Das Blut wurde währenddessen mithilfe einer kleinen Glaskapillare (minicaps®, Hirschmann) retrobulbär entnommen. Die Bestimmung der basalen Blutglucosewerte erfolgte jeweils in der Zeit von 8 bis 10 Uhr morgens. Im Gegensatz dazu wurde der Nüchtern-Blutglucosewert vor der Durchführung eines OGTT bzw. IPITT nach einer 6-stündigen Fastenperiode der Tiere mittels Blut aus dem Schwanz bestimmt. In beiden Fällen wurde die Messung der Blutglucosewerte mit einem handelsüblichen Accu-Chek® Performa Blutzuckermessgerät (Roche) vorgenommen.

Die auf die oben genannte Weise zusätzlich abgenommenen Blutproben wurden zunächst in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gesammelt und bei Raumtemperatur einige Zeit stehen gelassen. Durch 3-minütiges Zentrifugieren der Proben bei 7000 rpm separierte sich das zuvor geronnene Blut vom serumhaltigen Überstand. Dieser wurde sorgfältig abgenommen, in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Serum bei -80 °C gelagert. Bei den nachfolgenden Analysen der Serumproben wurde die zugrundeliegende Behandlung der Tiere (OGTT, IPITT oder HFD) selbstverständlich berücksichtigt.

3.2.7.2 Kot und Urin

Das Sammeln von Kot wurde nach dem Umsetzen der Tiere in neue Käfige vorgenommen und dabei die Kotproben aus dem alten Käfig mittels einer Pinzette aufgenommen. Die Ausstattung des Käfigs wurde dafür nicht verändert (z.B. durch weniger Einstreu, um das Sammeln der Proben zu erleichtern), sodass die Mäuse unbeeinflusst blieben. Der Kot wurde für zwei bis drei Tage bei Raumtemperatur getrocknet und im Rahmen der HFD bis zu seiner Verwendung bei -20 °C gelagert. Lediglich für die unbehandelten Tiere wurde die gesamte Menge des abgesetzten Kotes aus dem Einstreu erfasst und auf 0,1 g genau gewogen.

Das Sammeln von Spontanurin erfolgte, indem die Tiere zügig mit einer Hand im Nacken und am Schwanz gegriffen wurden und der reflexartig abgesetzte Urin in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Die gesammelten Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Die Untersuchung der Proben erfolgte mit einem handelsüblichen Streifentest zur Harnanalyse (Multistix® 10 SG, Siemens) in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Marcel Köhn.

Während der HFD-Behandlung wurden die Kot- bzw. Urinproben jeweils am 52. Tag, sprich nach insgesamt 8-wöchiger Diätbehandlung bzw. 6-wöchiger HFD gesammelt (siehe Kapitel 3.2.9).

3.2.8 Klinisch-chemische Analysen

3.2.8.1 HbA1c-Wert

Ein weiterer Parameter, der im Rahmen von Störungen des Glucosestoffwechsels beurteilt wird ist der sogenannte HbA1c. Der HbA1c-Wert ist die Menge an rotem Blutfarbstoff (Hämoglobin, Hb), die von Glucosemolekülen nicht-enzymatisch gebunden (glykiert) ist und gibt Auskunft über die mittlere Blutglucosekonzentration der letzten 8 - 12 Wochen. Die Menge und Dauer der Glucose im Blut entscheidet dabei über das Ausmaß der Glykierung. Im Gegensatz zur Bestimmung des Blutglucosewertes hat der HbA1c-Wert den Vorteil, dass er unabhängig von einer Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr oder vom Bewegungszustand ist und eine grobe Beurteilung der Blutglucoseeinstellung der letzten Wochen erfolgen kann, was für eine erfolgreiche Diabetestherapie von großer Bedeutung ist. Wechseln sich erhöhte und verminderte Glucosewerte im Blut jedoch häufig ab, kann auch der im Mittel entstehende normale HbA1c-Wert keine zuverlässige Aussage liefern. Eine Kombination verschiedener klinischer Methoden ist daher für eine sichere Diagnose notwendig.

Für die Bestimmung des sogenannten Langzeitblutglucosewertes wurden während der üblichen Blutabnahme (siehe Kapitel 3.2.7.1) zusätzlich 5 µL des frischen Blutes in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das bei -80 °C gelagerte Vollblut wurde anschließend direkt mit Lysepuffer versetzt, vollständig resuspendiert, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die folgende Messung der Proben entsprechend den Herstellerangaben des *Mouse Hemoglobin A1c (HbA1c) Kits* (Crystal Chem) durchgeführt und der HbA1c-Wert wie vorgegeben berechnet.

3.2.8.2 Bestimmung des Glykogengehaltes in Leber und Skelettmuskel

Die Gewebe wurden zunächst in flüssigem Stickstoff manuell gemörsert und kleine Portionen in zuvor gewogene und vorgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße abgefüllt (jeweils ca. 20 - 40 mg, auf 0,1 mg genau). Durch erneutes Wiegen der gefüllten Reaktionsgefäße konnte die Menge der einzelnen Gewebeproben genau berechnet und durch Zugabe eines definierten Volumens an zweifach destilliertem Wasser eine Konzentration von 100 µg/µL eingestellt werden. Das noch gefrorene Gewebepulver wurde nach der Wasserzugabe gut gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock aufgekocht. Nach einer 5- bis 10-minütigen Zentrifugation bei 13.200 rpm wurde der erhaltene Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und davon 7,5 µL für die Messung eingesetzt. Die anschließende Durchführung des *Glycogen Assay Kits* (Sigma-Aldrich) erfolgte in Einfachbestimmung in einer durchsichtigen 96-well-Platte gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls. Die Konzentration an Glykogen wurde durch eine Messung der Absorption bei 570 nm mit einem Infinite® M200PRO Spektrometer (Tecan) bestimmt und anhand einer mitgeführten Standardkurve berechnet. Die Messungen im Lebergewebe der Tiere, die zuvor im OGTT analysiert wurden, wurden mittels des genannten Kitsystems von Frau Kristin Wächter durchgeführt.

3.2.8.3 Messung weiterer Parameter

Mithilfe des Fuji DRI-CHEM 4000i Analysegerätes des ZMG konnten verschiedene klinisch-chemische Testparameter im Serum und Gewebe der Tiere analysiert werden. Dazu wurden 10 µL der jeweiligen Probe auf ein für jeden Parameter spezifisches trockenchemisches Testplättchen (scilVet) pipettiert.

Die Aufbereitung der Gewebeproben erfolgte wie in Kapitel 3.2.8.2 beschrieben und das Serum wurde parameterabhängig entweder unverdünnt oder mit zweifach destilliertem Wasser verdünnt gemessen. Folgende Testparameter wurden auf diese Art und Weise analysiert: Harnstoff (*blood urea nitrogen*, BUN), Kreatinin, Pankreaslipase und Triacylglycerine.

3.2.9 Hochfettdiät (HFD)

Das Ziel einer solchen HFD-Behandlung ist es, in relativ kurzer Zeit bei den Tieren eine schnelle Gewichtszunahme verbunden mit der Ausbildung einer Fettleibigkeit sowie ersten Anzeichen eines Metabolischen Syndroms und T2DM zu erzielen. Je mehr Fett die Tiere dabei in kürzester Zeit zu sich nehmen, desto schneller entstehen pathologische Folgen der überhöhten Kalorienzufuhr. Für diesen experimentellen Zweck werden speziell gefertigte Futtermittel, sogenannte *diet induced obesity* (DIO) Diäten mit einem definierten und im Vergleich zur Standarddiät stark erhöhten Fettanteil hergestellt (4 % vs. 35 % Rohfett, Herstellerangaben der Firma Altromin). In dem in dieser Arbeit durchgeführten Diätversuch erhielten die Mäuse während der HFD Futterpellets, deren Anteil an umsetzbarer Energie aus dem enthaltenen Fett 60 % kcal % betrug. Dieses Futter wird im weiteren Verlauf der Arbeit als 60 %iges Fettfutter bezeichnet.

Tabelle 1: Übersicht der für die transgenen Mäuse verwendeten Futtermittel

Angegeben sind die % kcal % der einzelnen Nährstoffgruppen bezogen auf die insgesamt umsetzbare Energie pro Gramm des jeweiligen Futters.

Quelle: Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG

Übersicht des verwendeten Tierfutters			
	Standarddiät	10 % Fettfutter	60 % Fettfutter
Kohlenhydrate	65 %	66 %	23 %
Proteine	24 %	24 %	17 %
Fett	11 %	10 %	60 %
umsetzbare Energie	11,9 kJ/g	14,6 kJ/g	21,1 kJ/g

Zu Beginn der Diätphase wurde zunächst den noch unbehandelten Tieren Blut abgenommen und der Blutglucosewert bestimmt (siehe Kapitel 3.2.7.1). Anschließend bekamen die Tiere ein 10 %iges Fettfutter, welches zwar annähernd denselben Nährstoff- und Energiegehalt wie die Standarddiät aufweist (Tabelle 1), jedoch im Unterschied zu der auf natürlichen getreidebasierten Rohstoffen bestehenden Standarddiät eine im Labor artifiziell gefertigte Diät aus chemisch-definierten Rohstoffen darstellt. Daher ist es notwendig den Magen-Darm-Trakt der Tiere schrittweise an das neue Futter zu gewöhnen, um eine Diarrhö oder ähnliche Probleme im Vorfeld des Versuchs zu vermeiden. Nach der 1-wöchigen Behandlung mit dem neuen 10 %igen Fettfutter bekamen die Mäuse in der zweiten Woche der Diätphase einen Mix aus dem 10 %igen und dem 60 %igen Fettfutter und ab der dritten Woche dann ausschließlich das 60 %ige Fettfutter für einen Zeitraum von 8 Wochen. Die Gesamtdauer der Diätbehandlung betrug daher insgesamt 10 Wochen, während die eigentliche HFD nur für 8 Wochen durchgeführt wurde (Abb. 6). Um während der HFD auftretende Veränderungen in der basalen Blutglucosekonzentration feststellen zu können wurde den Tieren erneut zu Beginn der eigentlichen HFD und nach weiteren 4 Wochen Blut abgenommen

und die Glucosekonzentration bestimmt. Am Ende des Diätversuches wurde eine Hälfte der Tiere im OGTT und die andere Hälfte im IPITT untersucht (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.3).

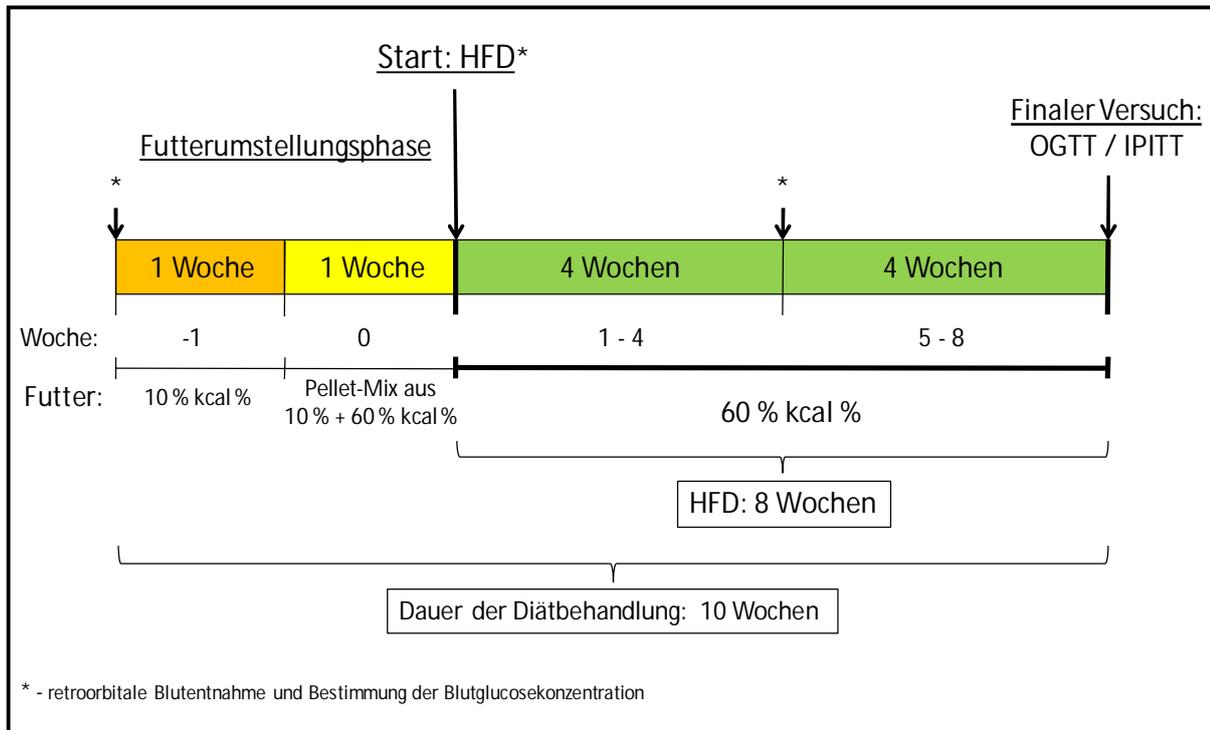


Abb. 6: Schema des Versuchsablaufs der Diätbehandlung (Erläuterungen siehe Text.)

Während der Durchführung der HFD befanden sich alle Versuchstiere in Einzelhaltung, um eine individuelle und unverfälschte Erfassung der Nahrungszufuhr zu gewährleisten. Zusätzlich wurde der Futterbereich im Gitter mit einem Trennblech deutlich minimiert, um einerseits die nur geringe und für zwei Tage ausreichende Menge an eingewogenem Futter für die Mäuse besser zugänglich zu machen und andererseits den möglichen Bereich, indem das Futter durch das Gitter in den Käfig fallen und somit nicht erfasst werden kann zu reduzieren. Die Messung des Futter- und Wasserverbrauchs erfolgte wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben und auch das Körpergewicht der Tiere wurde dreimal pro Woche protokolliert (siehe Kapitel 3.2.4).

3.3 Kalorimetrische Verbrennung

Die Untersuchungen des Energieinhaltes des Mäusekots erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Chemie der Martin-Luther-Universität in der Abteilung Physikalische Chemie unter Anleitung und mithilfe von Herrn Dr. Bob-Dan Lechner.

In einer kalorimetrischen Bombe nach Berthelot, auch als anisothermes Kalorimeter bezeichnet, kann in einer kontrollierten Verbrennungsreaktion die frei werdende Energie der verbrannten Substanz gemessen werden. Die vollständige Verbrennung einer definierten Substanzmenge wird dabei durch standardisierte Bedingungen und einen Überdruck an Sauerstoff erreicht. Der äußere Aufbau des Messsystems stellt adiabatische Bedingungen her, indem sich die kalorimetrische Bombe in einem Wasserbad befindet, welches wiederum von einem mit temperiertem Wasser (25 °C)

kontinuierlich durchströmten Wärmeschutzmantel umgeben wird (Abb. 7). Durch eine zwischen Wasserbad und Mantelgefäß befindliche Luftisolation wird ein Wärmeaustausch mit der Umgebung weitestgehend verhindert. Die bei der Verbrennung in der kalorimetrischen Bombe entstehende Wärme führt zur Erhöhung der Temperatur des Wasserbades und wird als Temperaturerhöhung des gesamten Messsystems mithilfe eines Beckmann-Thermometers auf 0,01 °C genau gemessen. Eine gleichmäßige Wärmeverteilung im Wasserbad wird dabei durch einen Rührer mit konstanter Geschwindigkeit sichergestellt. Um letztlich den Brennwert einer Substanz bestimmen zu können, muss neben der Temperaturerhöhung des Kalorimeters und der Menge der eingewogenen Substanz auch die Wärmekapazität des Messsystems bestimmt werden. Dazu wird das Kalorimeter zu Beginn der Messungen mithilfe einer Referenzsubstanz mit bekannter Verbrennungsenthalpie kalibriert. Durch die Eichmessung mit einer definierten Menge an z.B. Benzoesäure wird der sogenannte Wasserwert W bestimmt, mithilfe dessen alle darauffolgenden Messungen unbekannter Substanzen unter gleichen Bedingungen zu vergleichbaren Messwerten führen.

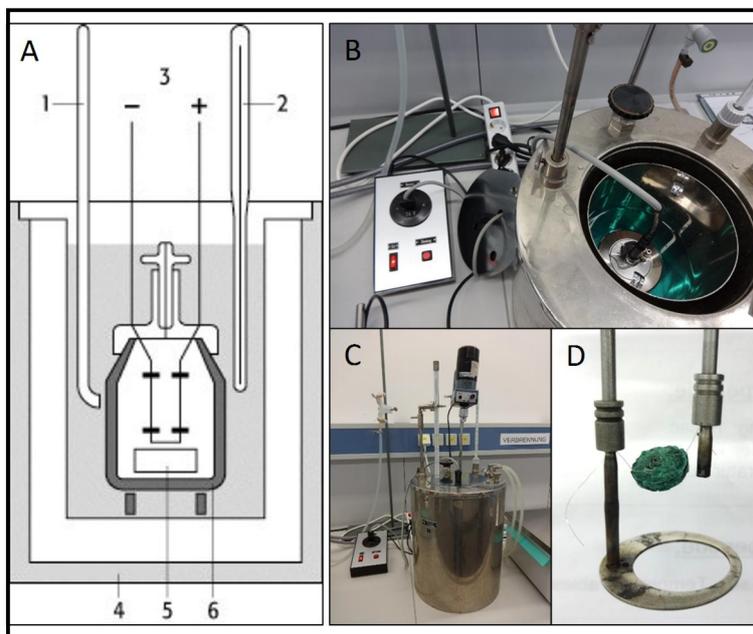


Abb. 7: Bombenkalorimeter
Gezeigt ist in (A) der schematische sowie in (B) und (C) der für die Analyse genutzte Versuchsaufbau zur kalorimetrischen Bestimmung der Verbrennungswärme. (D) zeigt eine zuvor mit einem Draht in Tablettenform gepresste Menge an Kot, welche bereits am Deckel der Bombe fixiert wurde. Die grüne Farbe des Kotes resultierte aus der Färbung des Fettfutters seitens des Herstellers.

1 - Rührer, 4 - Wärmeschutzmantel,
2 - Thermometer, 5 - Probe,
3 - elektrische Leitung, 6 - Bombe

Quelle (A): Copyright 1998

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Für die Verbrennung der Substanzen (Benzoesäure und Mäusekot) wurden zuvor ca. 200 - 300 mg dieser auf 0,1 mg genau eingewogen und mithilfe einer Tablettenpresse und einem zuvor ebenfalls abgewogenen ca. 10,5 cm langen Chrom-Nickel-Zünddraht (Durchmesser 0,1 mm, 140 Ω /m) ein Pressling erzeugt. Die in Tablettenform gepresste Substanz umschloss den Zünddraht und wurde mit den auf beiden Seiten herausschauenden Drahtenden an den entsprechenden Halterungen im Deckel der kalorimetrischen Bombe befestigt, die gleichzeitig als elektrische Zuführungen dienen (siehe Abb. 7, D). Der Deckel wurde anschließend auf den Bombenkörper gesetzt und verschraubt. Über ein Ventil im Deckel der kalorimetrischen Bombe wurde in dieser über eine spezielle Fülleinrichtung ein Sauerstoffüberdruck von 25 bar erzeugt. Die so vorbereitete und durch ein Rückschlagventil abgedichtete Bombe wurde nun in das Wasserbad eingesetzt, dieses mit vortemperiertem Wasser (25 °C) bis zur Oberkante aufgefüllt und der Rührer eingeschaltet. Die ordnungsgemäße Herstellung eines elektrischen Kontaktes der kalorimetrischen Bombe mit dem elektrischen Schaltkasten konnte durch das Aufleuchten einer roten Kontrolllampe sichergestellt werden. Nach Abschluss der Vorarbeiten konnte nun mit der Messung begonnen werden. Dazu

wurde mithilfe einer Lupe der Meniskus am Beckmann-Thermometer verfolgt und während der Vorperiode alle 15 Sekunden der abgelesene Wert notiert. Nach ca. acht Minuten stellte sich meist eine konstante Temperatur des Messsystems ein und die Zündung konnte erfolgen. Beim Betätigen des Zündknopfes floss durch den von der Tablette umschlossenen Zünddraht ein kurzzeitiger Heizstrom, der zu einer vollständigen Verbrennung der Substanz führte. In der folgenden Hauptperiode war ein Temperaturanstieg bis zum Erreichen eines Maximalwertes zu beobachten, welcher in der Nachperiode zunächst konstant blieb und später wieder abfiel. Auch in der Haupt- und Nachperiode wurde alle 15 Sekunden der entsprechende Wert am Thermometer abgelesen. Am Ende des Versuches wurden noch die lediglich verbliebenen Reste des Zünddrahtes zurückgewogen, um die Masse des verbrannten Drahtes bestimmen zu können. Die durch die Verbrennung des Drahtes verursachte Verfälschung der Wärmebilanz konnte somit berücksichtigt werden. Die abschließende Berechnung der Verbrennungsenthalpie ist in Kapitel 3.4.1 näher erläutert.

Die für diesen Versuch benötigten Geräte und Materialien wurden freundlicherweise vom Institut für Chemie zur Verfügung gestellt und stammen teilweise noch aus volkseigenen Betrieben (VEB) der DDR oder sind speziell angefertigt worden. Auf eine Angabe der Herkunft oder Bezeichnung der Geräte wurde daher verzichtet bzw. wird auf die Abteilung Physikalische Chemie des Institutes für Chemie der Martin-Luther-Universität verwiesen.

3.4 Berechnungen

3.4.1 Verbrennungsenthalpie

Die während der Verbrennung im Kalorimeter erhaltenen Temperaturwerte wurden für jede gemessene Probe in Abhängigkeit von der Zeit grafisch dargestellt (Abb. 8). Die während der Vor- und Nachperiode erhaltenen linearen Bereiche der Messkurve wurden verlängert und eine Vertikale so angelegt, dass die beiden entstandenen Flächen zwischen den eingefügten Geraden und der Messkurve den gleichen Flächeninhalt aufwiesen ($F_1 = F_2$, siehe Abb. 8). Auf der y-Achse konnte aus den so erhaltenen Schnittpunkten A und B eine für jede Probe spezifische Temperaturdifferenz (ΔT) während der Verbrennung abgelesen werden.

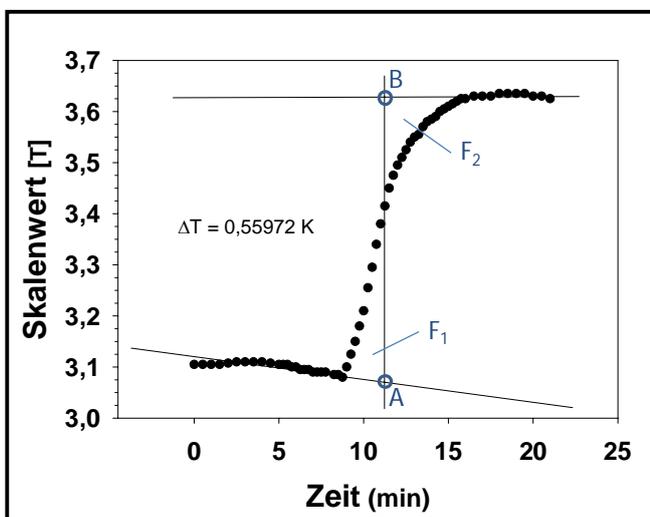


Abb. 8: Beispiel eines experimentell bestimmten Temperaturverlaufs während der kalorimetrischen Verbrennung einer Kotprobe

Die linearen Messbereiche der Kurve werden durch Einziehen von Hilfslinien extrapoliert und eine dritte vertikale Hilfslinie so angelegt, dass die beiden entstehenden Flächen F_1 und F_2 gleich groß sind. Die Endpunkte der Strecke AB können nun auf die Temperaturachse skaliert und so die gesuchte Temperaturdifferenz (ΔT) abgelesen werden.

Die Berechnung der Wärmekapazität des Kalorimeters erfolgte ausgehend von folgender Formel:

- W – Wärmekapazität/Wasserwert (J/K)
- ΔT – Temperaturdifferenz (K)
- EW – Einwaage bzw. verbrannter Draht (g)
- B – Benzoesäure
- $\Delta_v U$ – Verbrennungsenergie (J/mol o. J/g)
- M – Molare Masse (g/mol)

$$W \cdot \Delta T = \frac{EW_B \cdot \Delta_v U_B}{M_B} + EW_{\text{Draht}} \cdot \Delta_v U_{\text{Draht}} \quad (1)$$

- Umgestellt nach W

$$W = \frac{EW_B \cdot \Delta_v U_B}{M_B \cdot \Delta T} + \frac{EW_{\text{Draht}} \cdot \Delta_v U_{\text{Draht}}}{\Delta T} \quad (2)$$

- und unter Berücksichtigung, dass für die Verbrennung der Benzoesäure gilt,

- $\Delta_v H$ – Verbrennungsenthalpie (J/mol)
- $\Delta_v g$ – Stöchiometrikoeffizient der Gase
- R – molare Gaskonstante (J/mol · K)
- T – Temperatur des Wasserbades (K)

$$\Delta_v H_B = \Delta_v U_B + \Delta_v g \cdot R \cdot T \quad (3)$$

- ergibt sich folgende Gleichung zur Berechnung des Wasserwertes W:

$$W = \frac{EW_B \cdot (\Delta_v H_B - \Delta_v g \cdot R \cdot T)}{M_B \cdot \Delta T} + \frac{EW_{\text{Draht}} \cdot \Delta_v U_{\text{Draht}}}{\Delta T} \quad (4)$$

Da bei der Verbrennungsreaktion von 1 Mol Benzoesäure insgesamt 7,5 Mol Sauerstoff verbraucht werden und nur 7 Mol Kohlenstoffdioxid entstehen, ergibt sich aufgrund der Volumenarbeit ein Unterschied zwischen der Verbrennungsenthalpie $\Delta_v H$ und der Verbrennungsenergie $\Delta_v U$ für die Verbrennungsreaktion der Benzoesäure. Mithilfe des anhand der Reaktionsgleichung ermittelten Stöchiometrikoeffizienten v_g von -0,5 und unter Anwendung der Formel (3) kann eine Umrechnung der für die Benzoesäure bekannten Standardverbrennungsenthalpie $\Delta_v H$ in die Verbrennungsenergie $\Delta_v U$ erfolgen. Der daraus erhaltene Wert für die Wärmekapazität des Kalorimeters (W) kann nun für die Berechnung der Verbrennungsenthalpie $\Delta_v H$ der Kotproben genutzt werden. Dazu werden die gemessenen Werte für ΔT , für die Menge (EW, Einwaage) der abgewogenen Probe sowie für die Masse des verbrannten Drahtes in die nachfolgende Formel eingesetzt. Durch Anpassung der Formel (1) unter Vernachlässigung der unbekannt molaren Masse (M) der Kotproben und der Tatsache, dass $\Delta_v H$ gleich $\Delta_v U$ ist, ergibt sich:

$$W \cdot \Delta T_{\text{Kot}} = EW_{\text{Kot}} \cdot \Delta_v H_{\text{Kot}} + EW_{\text{Draht}} \cdot \Delta_v H_{\text{Draht}} \quad (5)$$

Durch Umstellung der Formel (5) konnte die Verbrennungsenergie $\Delta_v U$ bzw. -enthalpie $\Delta_v H$ des Mäusekots wie folgt berechnet werden:

$$\Delta_v H_{\text{Kot}} = \frac{W \cdot \Delta T_{\text{Kot}} - EW_{\text{Draht}} \cdot \Delta_v U_{\text{Draht}}}{EW_{\text{Kot}}} \quad (6)$$

Tabelle 2: Übersicht der Daten der kalorimetrischen Verbrennungsversuche

ΔT - experimentell ermittelte Temperaturdifferenz, EW - Einwaage, M - Männchen, W - Weibchen, $\Delta_v H$ - Verbrennungsenthalpie: Die negativen Werte resultieren aus der exothermen Verbrennungsreaktion. Ein zahlenmäßig kleinerer Wert bedeutet daher einen höheren Energieinhalt des Kotes.

Ergebnisse der kalorimetrischen Bestimmung der Verbrennungsenthalpie				
Physikalische Größen und Konstanten				
Molare Masse der Benzoesäure:		$M_B = 122,12 \text{ g/mol}$		
Standardverbrennungsenthalpie des Zünddrahtes:		$\Delta_v H_{\text{Draht}} = -3210 \text{ J/g}$		
Universelle Gaskonstante:		$R = 8,314 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$		
Standarddiät				
gemessene Wasserbadtemperatur während des Versuchs:		$T = 296,65 \text{ K}$		
errechnete Wärmekapazität des Kalorimeters:		$W = -12071,27 \text{ J/K}$		
Probe	ΔT (K)	EW (g)	$E_{\text{verbrannter Draht}} \text{ (g)}$	$\Delta_v H$ (kJ/mol)
Benzoessäure	0,73779	0,3361	0,0036	-3233
Probe	ΔT (K)	EW (g)	$E_{\text{verbrannter Draht}} \text{ (g)}$	$\Delta_v H$ (kJ/g)
Kontrolle 1 (M)	0,36870	0,3078	0,0089	-14,55
Kontrolle 2 (M)	0,44267	0,3299	0,0033	-16,23
Kontrolle 3 (W)	0,42814	0,2986	0,0025	-17,33
Kontrolle 4 (W)	0,41101	0,3104	0,0027	-16,01
IGF2BP2_H 1 (M)	0,42596	0,3060	0,0017	-16,82
IGF2BP2_H 2 (W)	0,47282	0,3180	0,0015	-17,96
IGF2BP2_H 3 (W)	0,47282	0,3170	0,0045	-18,05
IGF2BP2_H 4 (W)	0,49382	0,3231	0,0031	-18,48
Hochfettdiät				
gemessene Wasserbadtemperatur während des Versuchs:		$T = 297,15 \text{ K}$		
errechnete Wärmekapazität des Kalorimeters:		$W = -12684,72 \text{ J/K}$		
Probe	ΔT (K)	EW (g)	$E_{\text{verbrannter Draht}} \text{ (g)}$	$\Delta_v H$ (kJ/mol)
Benzoessäure	0,68552	0,3281	0,0040	-3233
Probe	ΔT (K)	EW (g)	$E_{\text{verbrannter Draht}} \text{ (g)}$	$\Delta_v H$ (kJ/g)
Kontrolle 1 (M)	0,62100	0,3097	0,0036	-25,47
Kontrolle 2 (M)	0,54233	0,2790	0,0039	-24,70
Kontrolle 3 (M)	0,43031	0,2637	0,0020	-20,72
Kontrolle 4 (W)	0,42100	0,2471	0,0034	-21,66
Kontrolle 5 (W)	0,51962	0,2995	0,0029	-22,04
Kontrolle 6 (W)	0,55972	0,3109	0,0027	-22,86
IGF2BP2_H 1 (M)	0,53918	0,2743	0,0027	-24,97
IGF2BP2_H 2 (M)	0,62433	0,3075	0,0023	-25,78
IGF2BP2_H 3 (M)	0,37200	0,1794	0,0026	-26,35
IGF2BP2_H 4 (W)	0,69517	0,3053	0,0043	-28,93
IGF2BP2_H 5 (W)	0,62700	0,3072	0,0025	-25,92
IGF2BP2_H 6 (W)	0,61394	0,3151	0,0041	-24,76

Eine Aussage darüber, auf welche Inhaltsstoffe im Kot sich der gemessene Energiewert bezieht, kann mit der angewendeten Methode nicht getroffen werden.

3.4.2 Energieumsatz

Anhand der erhobenen Daten für die gefressene Futtermenge der Mäuse sowie der vom Hersteller bekannten Angaben bezüglich des Energiegehaltes des jeweiligen Futtermittels (siehe Tabelle 1) konnte die Menge der täglich aufgenommenen Energie in kJ/g KGW für jedes Tier berechnet werden. Da aufgrund der Analyse des Energieinhaltes des Kots sowie der Gesamtmenge an Kot auch ermittelt werden konnte, welche Energiemenge von den Tieren wieder ausgeschieden wird, konnte eine grobe Abschätzung der im Körper verbliebenen Energie und somit des Energieumsatzes der Mäuse vorgenommen werden. Dazu wurde von dem berechneten relativen Wert der aufgenommenen Kalorienmenge jedes einzelnen Tieres der aus den kalorimetrischen Messungen erhaltene und zuvor gemittelte Energiewert in kJ/g KGW subtrahiert. Der Grund für die Rechnung mit den gemittelten Werten der ausgeschiedenen Energie lag in der geringen Anzahl an analysierten Kotproben.

3.4.3 Oberflächen-Volumen-Verhältnis

Die Regulation des Wärmehaushaltes eines Organismus erfolgt größtenteils über seine Körperoberfläche (KOF). Da die Wärmeabgabe proportional zur KOF ist und der Grundumsatz zu 80 - 90 % von der Wärmeabgabe bestimmt wird, ist folglich auch der Energieumsatz von der KOF des Individuums abhängig. Die KOF kann dabei mit der folgenden empirisch ermittelten Formel näherungsweise berechnet werden [Du Bois und Du Bois 1916]:

$$\begin{array}{l}
 \text{KOF} - \text{Körperoberfläche (m}^2\text{)} \\
 \text{KGW} - \text{Körpergewicht (kg)} \\
 \text{SSL} - \text{Scheitel-Steiß-Länge (cm)}
 \end{array}
 \quad
 KOF = KGW^{0,425} \cdot SSL^{0,725} \cdot 0,007184 \quad (7)$$

Die Körpergröße oder auch Scheitel-Steiß-Länge (SSL) der Tiere wurde mittels der Auswertung fotografischer Bildnachweise erhalten. Nach dem Töten der Tiere wurden diese für die Sektion der Organe rücklinks auf eine Unterlage gelegt und an den Extremitäten befestigt. Die dabei durchgeführte geringfügige Streckung der Tiere erfolgte für alle Mäuse auf dieselbe Art und Weise. Durch ein an die Tiere angelegtes Zentimetermaß konnte im Nachhinein die SSL ermittelt werden. Bei einem erwartungsgemäß proportionalen Größenwachstum, kann von der Länge der Tibia auch auf die SSL geschlossen werden. Anhand der erhaltenen Daten für die SSL sowie der vorhandenen Messwerte der Tibia wurde dieser Zusammenhang genutzt und ein Korrelationsfaktor x berechnet. Die Ursache für die auf diese Weise durchgeführte indirekte Bestimmung der SSL war der Tatsache geschuldet, dass solch ein fotografischer Nachweis nicht für alle Versuchstiere verfügbar war, jedoch die Messung der Tibia routinemäßig erfolgte.

$$\begin{array}{l}
 \text{TL} - \text{Tibiallänge (mm)} \\
 x - \text{Korrelationsfaktor}
 \end{array}
 \quad
 x = \frac{SSL}{TL} \quad \rightarrow \quad \boxed{SSL = x \cdot TL} \quad (8)$$

Die näherungsweise ermittelten Werte für x sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Berechnung der KOF konnte nun gemäß der Formel (7) für jedes Tier individuell durchgeführt werden. Um letztlich eine Aussage über das Oberflächen-Volumen-Verhältnis (kg/m^2) der Mäuse treffen zu können, wurde für jedes Tier das KGW zur KOF ins Verhältnis gesetzt. Trotz einer geschlechtsabhängigen Berechnung der SSL wurde das Oberflächen-Volumen-Verhältnis geschlechtsunabhängig ausgewertet.

Tabelle 3:
Übersicht der berechneten Werte
für den Korrelationsfaktor x
n - Anzahl der Tiere

Korrelationsfaktor x		
Stamm	Männchen (n)	Weibchen (n)
UbC-Kontrolle	6,37 ± 0,05 (10)	6,21 ± 0,05 (11)
UbC-IGF2BP2_H	6,39 ± 0,04 (8)	6,25 ± 0,12 (4)

3.4.4 HOMA-IR und HOMA-%B

Für die Berechnungen der Insulinsensitivität (HOMA-IR) und der β -Zellfunktion (HOMA-%B) mittels der HOMA-Methode (*Homeostasis Model Assessment*) wurden folgende zwei Formeln angewendet [Pacini und Mari 2003]:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Nüchtern-Glucose (mmol/L)} \cdot \text{Nüchtern-Insulin (mU/L)}}{22,5} \quad (9)$$

$$\text{HOMA-\%B} = \frac{20 \cdot \text{Nüchtern-Insulin (mU/L)}}{\text{Nüchtern-Glucose (mmol/L)} - 3,5} \quad (10)$$

3.5 Zellbiologische Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturarbeiten dienten in erster Linie der Erstellung von Referenzproben, welche bspw. in Form von RNA für die PCR oder als Positivkontrollen in der *Western Blot* Analyse genutzt wurden. Die verwendeten HuH7- und MEF-Zellen wurden bereits als gefrorenes Zellpellet freundlicherweise von Dr. Marcel Köhn zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T, kurz HEK293T sowie der murinen Hepatozytenzelllinie AML12 erfolgte im Brutschrank unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid und 90 % relativer Luftfeuchte in Petrischalen. Die HEK293T-Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) unter Zugabe von L-Alanin-L-Glutamin (GlutaMAX™) und 10 % fetalem Kälberserum (FBS) gehalten, während die AML12-Zellen mit DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12*) unter Zugabe von GlutaMax™, 10 % FBS, 0,005 mg/mL Insulin, 0,005 mg/mL Transferrin, 5 ng/mL Selenium und 40 ng/mL Dexamethason kultiviert wurden. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt und die verwendeten Reagenzien vor der Anwendung auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das Kulturmedium gewechselt und bei Konfluenz die Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen nach 2-maligem Waschen mit PBS (Gibco™) einige Minuten (je nach Zelllinie) mit Trypsin-EDTA (Gibco™) inkubiert. Durch Zugabe des doppelten Volumens des jeweiligen serumhaltigen Mediums wurde die enzymatische Wirkung des Trypsins beendet, anschließend die sich bereits größtenteils von der Petrischale gelösten Zellen vereinzelt und zur weiteren Kultivierung neu ausgesät.

Für die Isolation von RNA oder Protein aus den Zellen wurden diese nach dem Ablösen von der Zellkulturschale in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, 2- bis 3-mal mit PBS gewaschen, zentrifugiert und als Zellpellet sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die transiente Transfektion, bei der zeitweilig fremde DNA in eine eukaryotische Zelle eingebracht werden kann, wurde die Calciumchlorid-Methode angewendet. Dazu wurden die HEK293T-Zellen einen Tag zuvor auf einer 6-well-Platte ausgesät und der benötigte Reaktionsansatz wie folgt vorbereitet. Jeweils 4 µg des zu transfizierenden DNA-Plasmids wurden mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 150 µL aufgefüllt und mit 15 µL CaCl₂ (2,5 M) sorgfältig gemischt. Anschließend wurden 150 µL 2x HBS-Puffer tropfenweise unter leichtem Schwenken des Reaktionsgefäßes hinzu pipettiert und der gesamte Ansatz für 20 - 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der nochmals vollständig durchmischte und komplette Ansatz wurde abschließend tropfenweise auf die ca. 80 - 90 % konfluenten Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und das erhaltene Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2x HBS-Puffer (pH 7,05)

HEPES	50 mM
KCl	10 mM
Glucose	12 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM

3.6 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben diente als Lösungsmittel stets zweifach destilliertes Wasser, welches durch eine Reinstwasseranlage aufbereitet wurde und im Folgenden nur als Wasser bezeichnet wird.

3.6.1 RNA-Isolation

Zu dem gefrorenen Gewebe wurden zunächst einige Keramik-Kugeln (1,4 mm, Bertin Technologies) gegeben und alles in 1 mL Trizol bzw. *QIAzol Lysis Reagent* (QIAGEN) aufgenommen. Der Ansatz wurde anschließend sofort mit dem Precellys®24 (Bertin Technologies) für 20 Sekunden bei 5000 rpm vollständig homogenisiert. Aufgrund der Festigkeit des Skelettmuskels wurde dieser zuvor noch manuell in flüssigem Stickstoff gemörsert. Für das Aufschließen der Zellen genügte es diese mit dem Trizol bzw. *QIAzol Lysis Reagent* sorgfältig durch auf- und ab Pipettieren zu mischen.

Für die Isolation von RNA mittels Trizol und einer nachfolgenden Chloroform-Extraktion wurden nach dem Homogenisieren 200 µL Chloroform zum Ansatz pipettiert, das 1,5 mL Reaktionsgefäß kräftig geschüttelt, für einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für mindestens 15 Minuten bei 13.200 rpm zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe des doppelten Volumens an eiskaltem Isopropanol gefällt. Nachdem der Ansatz gut durchmischt wurde erfolgte eine Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur, bevor die Probe erneut für mindestens 15 Minuten bei 13.200 rpm zentrifugiert wurde. Das erhaltene RNA-Pellet wurde anschließend 3-mal mit jeweils 1 mL 70 %igem Ethanol gewaschen, kurzzeitig auf einem Heizblock (65 °C) getrocknet und in Wasser gelöst.

Die Isolation der RNA für die Transkriptomanalysen sowie die qPCR-Messungen aus der Leber, dem Skelettmuskel und dem Fettgewebe erfolgte unter Verwendung des *miRNeasy Kits* der Firma QIAGEN. Die im *QIAzol Lysis Reagent* homogenisierte Probe wurde anschließend gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls weiterbearbeitet, einschließlich der Durchführung des optionalen DNase-Verdau. Die Durchführung der RNA-Isolation aus dem Fettgewebe erfolgte nach den Vorgaben des speziell für Fettgewebeproben erstellten Protokolls des *RNeasy Lipid Tissue Kits* von QIAGEN, jedoch unter Verwendung des im *miRNeasy Kit* enthaltenen RWT-Puffers anstelle des RW1-Puffers.

Trizol

Guanidiniumthiocyanat	0,8 M
Ammoniumthiocyanat	0,4 M
Natriumacetat (pH ≤ 5,0)	0,1 M
Glycerin	5 % (w/v)
Roti®-Aqua-Phenol zur RNA-Extraktion (pH 4,5-5,0)	48 %

3.6.2 Quantifizierung der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und des Reinheitsgrades wurde die Absorption der RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm mit einem Infinite® M200PRO Spektrometer (Tecan) gemessen. Dazu wurden 2 µL der Probe pipettiert und direkt vermessen. Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurden 250 - 500 ng RNA auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 3.6.5).

3.6.3 Reverse Transkription

Das Umschreiben der RNA in die komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT). Für die RT-Reaktion wurden 2 µg RNA in einem 0,2 mL Reaktionsgefäß mit Wasser auf 13,25 µL aufgefüllt und 1 µL *random* Primer (150 ng) hinzugegeben. Die Denaturierung der RNA und somit die Anlagerung der Primer erfolgte für 5 Minuten bei 65 °C im Thermocycler. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und folgender Ansatz hinzugefügt:

5-fach RT-Puffer	4,0 µL
dNTP-Mix (je 10 mM)	1,0 µL
rRNasin® RNase Inhibitor (40 <i>units</i> /µL)	0,25 µL
M-MLV Reverse Transkriptase (200 <i>units</i> /µL)	0,5 µL
Wasser	<i>ad</i> 20,0 µL

Die reverse Transkription wurde im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

2 Stunden	42 °C
15 Minuten	75 °C

Nach beendeter Reaktion wurden die Proben mit Wasser maximal im Verhältnis 1 zu 7 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die für die PCR eingesetzten Primer wurden mithilfe der Primer3Plus sowie NCBI/Primer-BLAST Software generiert. Die Primer überspannen idealerweise Exon-Exon-Grenzen, um spezifisch die cDNA zu vervielfältigen und ihre Schmelztemperatur lag stets bei ca. 60 °C.

3.6.4.1 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die Methode der qualitativen PCR wurde im Rahmen der Genotypisierung der Tiere, zur Etablierung von Primern sowie für die semiquantitative Analyse der IGF2BP-Expression genutzt.

Neben den zu analysierenden Proben wurden noch zwei Negativ- sowie eine Positivkontrolle in der PCR mitgeführt. Zu den Negativproben gehören zum einen die Zugabe von Wasser anstelle der cDNA, um die Reinheit des Reaktionsansatzes zu überprüfen und zum anderen das Mitführen einer -RT-Probe, um eine Kontamination mit DNA ausschließen zu können. Diese wurde erhalten, indem zu jeder in cDNA umgeschriebenen RNA ein zweiter Ansatz pipettiert wurde, jedoch ohne die Zugabe der Reversen Transkriptase und dieser ebenso der gemeinsamen RT-Reaktion unterzogen wurde.

Für die RT-PCR wurden jeweils 2 - 5 µL cDNA eingesetzt und folgender Ansatz pipettiert:

Promega™ <i>PCR Master Mix</i> (2x)	7,5 µL
Primermix (je 100 µM, 1 zu 81 verdünnt)	2,5 µL
Wasser	ad 15,0 µL

Der fertige Ansatz wurde in den Thermocycler gestellt und folgendes Standardprogramm gestartet:

3 Minuten	94 °C	initiale Denaturierung	
30 Sekunden	94 °C	Denaturierung	} 15 bis 40 Zyklen
1 Minute	60 °C	Primerbindung	
1 Minute	72 °C	Kettenverlängerung	
10 Minuten	72 °C	finale Kettenverlängerung	
Pause	4 °C	Kühlung	

Im Anschluss an die RT-PCR wurden die Produkte, je nach zu erwartender Größe der Fragmente, auf ein 1 - 2 %iges Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 3.6.5).

3.6.4.2 Real Time quantitative PCR (qPCR)

Die Methode der *Real Time quantitative PCR* beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und bietet zusätzlich die Möglichkeit einer absoluten und relativen Quantifizierung der sich während der Reaktion ändernden DNA-Mengen. Die Vorteile gegenüber der RT-PCR liegen in der Effizienz, der Sensitivität, sowie im hohen Probendurchsatz und der Möglichkeit auch sehr geringe Mengen an Ausgangsmaterial zu erfassen. Die qPCR erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der vervielfältigten cDNA-Fragmente über die Messung von Fluoreszenzsignalen. Der dafür verwendete fluoreszierende Farbstoff *SYBR® Green* lagert sich interkalierend in doppelsträngige DNA ein, wobei die Zunahme der Ziel-DNA mit der Fluoreszenzintensität korreliert. Diese Zunahme der Fluoreszenz über die Zyklen der Reaktion wird gemessen.

Mittels der Methode der qPCR wurde die Menge der IGF2BP2-mRNA in verschiedenen Geweben untersucht. Analysiert wurde dabei die RNA aus den Geweben Leber, Skelettmuskel und Fett aus je sechs männlichen und sechs weiblichen Tieren der verschiedenen Stämme. Dazu wurde im Vorfeld die RNA geschlechtsabhängig zu gleichen Anteilen (Leber: je 4 µg, Skelettmuskel und Fett: je 2 µg) gemischt und in einer gemeinsamen RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 3.6.3).

Für die Bestimmung der mRNA-Menge wurden 5 µL cDNA eingesetzt und folgender Ansatz pipettiert:

<i>SYBR® Select Master Mix</i> (2x)	5,0 µL
Primer <i>sense</i> (100 µM)	0,02 µL
Primer <i>antisense</i> (100 µM)	0,02 µL
Wasser	ad 10,0 µL

Die Untersuchung der einzelnen Proben erfolgte in Dreifachbestimmung. Auch bei der qPCR wurden bei jeder Messung die unter 3.6.4.1 bereits genannten Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Im Anschluss an die eigentliche PCR-Reaktion wurde noch eine Schmelzpunktanalyse der vervielfältigten PCR-Produkte durchgeführt, um deren Spezifität sicherzustellen. Die qPCR wurde im 384-well-Format mit dem *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems™) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

2 Minuten	50 °C	Aktivierung der hitzelabilen Uracil-DNA Glycosylase	} 40 Zyklen
2 Minuten	95 °C	Aktivierung der <i>hot start</i> Taq-Polymerase	
15 Sekunden	95 °C	Denaturierung der cDNA	
15 Sekunden	58 °C	Primerbindung	
30 Sekunden	72 °C	Kettenverlängerung	

Das Prinzip der Quantifizierung nutzt die Kinetik der PCR-Reaktion aus. In den frühen Zyklen findet eine nahezu exponentielle Vermehrung der cDNA-Fragmente statt, während mit fortschreitender Zyklenzahl die störenden Einflüsse stetig zunehmen wie z.B. die Akkumulation von Produkten, der Verbrauch von Nukleotiden, die abnehmende Aktivität der Polymerase usw. und es zu einem linearen Anstieg kommt. Daraus ergibt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf des Fluoreszenzsignals. Als Richtwert wird daher die Zyklenzahl gewählt, bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant vom Hintergrund abhebt, weil auch zu diesem Zeitpunkt die Vermehrung noch exponentiell ist. Der so ermittelte Wert dieser Zyklenzahl wird als C_T -Wert (*Cycle Threshold*) bezeichnet.

Zur relativen Quantifizierung der qPCR wurde der C_T -Wert der einzelnen Proben ermittelt und die erhaltenen Daten mithilfe der ΔC_T - oder $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet.

$\Delta\Delta C_T$ -Methode zur Ermittlung der relativen murinen IGF2BP2-Menge:

C_{TA} – C_T -Wert Gewebe
 C_{TB} – C_T -Wert AML12
 x – Zielgen
 y – Referenzgen

$$\text{Relative Transkriptmenge} = 2^{-(C_{TA} - C_{TB})_x - (C_{TA} - C_{TB})_y} \quad (11)$$

Dazu wurde die Expression des murinen IGF2BP2-Gens (x) auf die Expression eines vermutlich nicht durch IGF2BP2 affizierten Referenzgens wie GAPDH, PPIA und/oder EEF2 (y) bezogen, wobei jeweils die Differenz der C_T -Werte zwischen dem untersuchten Gewebe (A) und den zur Normalisierung dienenden AML12-Zellen (B) gebildet wurde. Die erhaltenen Werte für die verschiedenen Referenzgene wurden abschließend gemittelt und grafisch dargestellt.

ΔC_T -Methode zur Ermittlung der relativen humanen/transgenen IGF2BP2-Menge:

$$\text{Relative Transgenmenge} = 2^{-(C_T \text{ IGF2BP2}_{\text{transgen}} - C_T \text{ IGF2BP2}_{\text{murin}})} \quad (12)$$

Um die Anreicherung der transgenen IGF2BP2-Expression kalkulieren zu können, wurde für jede Probe die Differenz der C_T -Werte zwischen dem humanen und murinen IGF2BP2-Gen gebildet.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primer

mmu - *Mus musculus*, hsa - *Homo sapiens*, bp - Basenpaare

Verwendete Primer			
für die Genotypisierung und RT-PCR:			
Primer	NCBI Referenz	Sequenz 5' → 3'	Länge in bp
β-Globin-Exon 3 (UbC/Alb-Konstrukt)	---	<i>sense</i> : GGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTG <i>antisense</i> : GATAGGCAGCCTGCACCTGAGGAGT	800
BiPro-GFP (Alb-Konstrukt)	---	<i>sense</i> : TCCTTCCCACAGTTTAAGCCTCAGG <i>antisense</i> : GCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCC	742
Flag-IGF2BP1 (UbC/Alb-Konstrukt)	---	<i>sense</i> : GACTACAAGGACGACGACGACAAGC <i>antisense</i> : GATGTCCACTTGCTGCTGCTTGGC	618
BiPro-IGF2BP2 (UbC/Alb-Konstrukt)	---	<i>sense</i> : TCCTTCCCACAGTTTAAGCCTCAGG <i>antisense</i> : CAGCGGAAATCAATCTGTCTGGCC	621
HA-IGF2BP3 (UbC/Alb-Konstrukt)	---	<i>sense</i> : GTACCCTACGACGTGCCCGACTACG <i>antisense</i> : CTGTTTGGTGATGTTCCGAATGGTGGC	706
mmu IGF2BP1 Intron 13	NC_000077	<i>sense</i> : GTGAGAGCCCCAACCCGTGG <i>antisense</i> : GGGGTGGGATACAAGACAAGAG	357
mmu/hsa IGF2BP1	NM_009951 NM_006546	<i>sense</i> : CTGGGCGATGAAGGCCATCG <i>antisense</i> : CAGTGATGGTCTCTCAGGG	842
mmu IGF2BP1	NM_009951	<i>sense</i> : AACCTGAAGAAGGTGGAGCA <i>antisense</i> : TCTCTCCCAGCTTCATCCA	250
mmu/hsa IGF2BP2	NM_183029 NM_006548	<i>sense</i> : CTGAAGCATGCCGCATGATTCTTG <i>antisense</i> : GCCTGGTTGGGATGAAGAG	559
mmu IGF2BP3	NM_023670	<i>sense</i> : CGGAAACGGCAGTTGTAAA <i>antisense</i> : TTTGTGATGTTGCGAATGGT	319
mmu 28S rRNA	NR_003279	<i>sense</i> : CCCGACGTACGCAGTTTTAT <i>antisense</i> : CCTTTTCTGGGGTCTGATGA	236
für die qPCR:			
Primer	NCBI Referenz	Sequenz 5' → 3'	Länge in bp
mmu IGF2BP2	NM_183029	<i>sense</i> : TAACCCCGAGAGAACCATCA <i>antisense</i> : GCACAGACAGTCCAGTCGAA	185
BiPro-IGF2BP2	---	<i>sense</i> : TCCTTCCCACAGTTTAAGCCTCAGG <i>antisense</i> : CAGCAGGACCTGTCCCGCCA	141
mmu GAPDH	NM_008084.2	<i>sense</i> : TCTTCCAGGAGCGAGACCCCA <i>antisense</i> : TTCAAGTGGGCCCCGGCCTT	112
mmu PPIA	NM_008907.1	<i>sense</i> : GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC <i>antisense</i> : AGATGCCAGGACCTGTATGC	235
mmu EEF2	NM_007907.2	<i>sense</i> : TCATCGACTCTCCAGGCCAT <i>antisense</i> : TGTTTCATCATCAGGACGGGC	171

3.6.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA

RNA und PCR-Produkte wurden nach Zugabe von Ladepuffer auf einem 1 - 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Die Auftrennung erfolgte der Größe nach bei ca. 120 - 200 V in einer horizontalen Gelkammer mit 1-fachem TAE-Puffer. Mittels Ethidiumbromid (0,3 µg/mL Agarose)

wurden die RNA bzw. PCR-Produkte unterm UV-Licht visualisiert und dokumentiert. Der Vergleich mit einer in der PCR mitgeführten Positivkontrolle ermöglichte die Größenbestimmung der aufgetrennten Fragmente.

Für die Qualitätskontrolle der zuvor isolierten RNA wurden die Gelkammer, der Gelschlitten sowie der Taschenkamm vor der Benutzung für ca. 15 Minuten in einer 3 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert, um vorhandene RNasen zu inhibieren.

50x TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA Puffer, pH 8,4)

TRIS	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	50 mM

6x Ladepuffer

Glycerin	30 %
Xylencyanol oder Bromphenolblau	0,25 %

3.7 Proteinbiochemische Methoden

3.7.1 Proteinisolation

Das gefrorene Gewebe bzw. die gefrorenen Schwanzstücke wurden zügig mit ca. 6 - 10 Keramik-Kugeln (1,4 mm, Bertin Technologies) versehen und eine angemessene Menge an kaltem Puffer hinzugegeben. Der Ansatz wurde anschließend sofort mit dem Precellys®24 (Bertin Technologies) bei 6000 rpm für 20 Sekunden vollständig homogenisiert. Je nach Festigkeit des zu homogenisierenden Gewebes wurde dieser Schritt noch 1- bis 2-mal wiederholt. Die Schwanzspitzen hingegen wurden 3-mal bei 6500 rpm für je 20 Sekunden homogenisiert. Für das Aufschließen der Zellen reichte es diese nach der Zugabe des Puffers mehrmals auf und ab zu pipettieren. Anschließend wurden die Ansätze für 20 - 30 Minuten auf Eis inkubiert und nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 13.200 rpm der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Bei Bedarf wurden die Gewebeproben noch ein zweites oder drittes Mal zentrifugiert, bis ein klarer Überstand erhalten wurde.

RIPA-Puffer

TRIS (pH 7,4)	50 mM
NaCl	150 mM
Natrium-Deoxycholat	0,5 %
Nonidet P-40	1 %
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
SDS	0,1 %

Totallyse-Puffer

TRIS (pH 7,4)	50 mM
NaCl	50 mM
MgCl ₂	2 mM
SDS	1 %

Vor der unmittelbaren Verwendung der Puffer erfolgte die Zugabe eines Proteinkinase-Inhibitor-Cocktails (Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1 zu 200.

3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Quantifizierung der Proteinmengen wurde das DC™ *protein assay Kit* von Bio-Rad gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die zugrundeliegende Reaktion basiert auf der Methode nach Oliver H. Lowry. Die Proteinmenge konnte anhand einer Eichkurve ermittelt werden, die mit bekannten Konzentrationen von BSA (*bovine serum albumin*) in RIPA- bzw. Totallyse-Puffer unmittelbar vor jeder Messung frisch hergestellt worden war.

3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels der Methode der SDS-PAGE können Proteine ihrer Molekülgröße nach elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Proben mit gleichen Proteinmengen wurden mit 4-fachem *NuPAGE® LDS Sample Buffer* (Novex™) versetzt, um im Ansatz eine Einfachkonzentrierung zu erreichen und für 3 Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Durch Bindung einer zum Molekulargewicht der Proteine proportionalen Menge des anionischen Detergenz SDS erhalten die Proteine eine einheitliche negative Ladung und damit eine vergleichbare elektrophoretische Mobilität. Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden die *NuPAGE® Novex™ 4-12 % Bis-Tris Gele* (Invitrogen™) in die Elektrophoresekammer *XCell SureLock®* (Novex™) eingespannt und diese mit *NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer* (Novex™) aufgefüllt. Vor der Auftragung der einzelnen Proben wurden die Lade-taschen gründlich mit dem Elektrophorese-Laufpuffer gespült. Zum Größenvergleich wurde der *SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard* (Novex™) auf jedem Gel mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei ca. 100 - 200 V.

3.7.4 Western Blot Analyse

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die auf dem Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham™ Hybond™-ECL, GE Healthcare) übertragen. Für den Aufbau des *Western Blots* wurden sechs Whatman®-Filterpapiere (0,34 mm dick) und die Nitrozellulosemembran auf die entsprechende Gelgröße zugeschnitten und für mindestens 20 Minuten in Towbin-Puffer (Bio-Rad) equilibriert. Auf drei Lagen Filterpapier wurde die Nitrozellulosemembran gelegt, darauf das Proteingel, gefolgt von drei weiteren Lagen Filterpapier. Das Übereinanderlegen der einzelnen Komponenten erfolgte luftblasenfrei. Die Übertragung der Proteine erfolgte für 45 Minuten bei 25 V und 1 A unter Nutzung des *Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems* (Bio-Rad) im *semidry*-Verfahren. Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran kurz in PBS gewaschen und mit Ponceau S angefärbt. Die Membran wurde durch Waschen in PBST wieder entfärbt.

Towbin-Puffer (pH 8,1 - 8,5)

TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
Wasser	500 mL
Methanol	10 %
SDS	0,1 %
Wasser	ad 1 L

PBS (pH 7,4) / PBST

NaCl	137 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,0 mM
Tween® 20	0,1 %

Ponceau S-Lösung

Essigsäure	5 %
Ponceau S	0,5 - 1 % (w/v)

3.7.5 Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern

Um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran abzusättigen, erfolgte eine mindestens 20-minütige Inkubation der Membran mit 5 % (w/v) Magermilchpulver gelöst in PBST. Anschließend wurde die Membran mit den in Tabelle 5 aufgeführten Primärantikörpern, verdünnt in 2,5 % (w/v) Magermilch/PBST, über Nacht bei 4 °C auf einer Rollapparatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit PBST gewaschen und anschließend der in 2,5 % (w/v) Magermilch/PBST verdünnte IRDye®-konjugierte Sekundärantikörper (siehe Tabelle 5) dazugegeben und für mindestens 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Membran erneut mit PBST gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper vollständig zu entfernen.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper

Verwendete Antikörper			
Primäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller (Katalog #)
GFP	Maus	1:1000	Roche (#11814460001)
GFP	Maus	1:5000	Santa Cruz (sc-9996)
Flag-Tag	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich (F1804)
BiPro-Tag (4A6 - Zellkulturüberstand)	Maus	1:10	BSBS Antibody Facility, Braunschweig
BiPro (4A6 - aufgereinigt)	Maus	1:1000	BSBS Antibody Facility, Braunschweig
HA-Tag	Maus	1:500	Roche (#11666606001)
IGF2BP1 (6A9)	Maus	1:1000	BSBS Antibody Facility, Braunschweig
IGF2BP2 (6A12)	Maus	1:1000	BSBS Antibody Facility, Braunschweig
IGF2BP2	Kaninchen	1:2000	MBL International (RN008P)
IGF2BP3 (6G8)	Maus	1:1000	BSBS Antibody Facility, Braunschweig
VCL	Maus	1:5000	Sigma-Aldrich (V9131)
ACTB	Maus	1:3000	Sigma-Aldrich (A5316)
TUBA1A (12G10)	Maus	1:1000	BSBS Antibody Facility, Braunschweig
Sekundäre Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller (Katalog #)
Anti-Maus IRDye® 680RD	Esel	1:10.000	LI-COR Biosciences (926-68072)
Anti-Maus IRDye® 800CW	Esel	1:10.000	LI-COR Biosciences (926-32212)
Anti-Kaninchen IRDye® 680RD	Esel	1:10.000	LI-COR Biosciences (926-68073)
Anti-Kaninchen IRDye® 800CW	Esel	1:10.000	LI-COR Biosciences (926-32213)

3.7.6 Detektion und Auswertung

Die Detektion des vom Sekundärantikörper ausgehenden Infrarotsignals wurde unter Verwendung des *Odyssey® CLx Infrared Imaging Systems* (LI-COR Biosciences) bei einer Wellenlänge von 680 nm bzw. 800 nm detektiert.

3.7.7 Immunpräzipitation (IP)

Zur Untersuchung der Menge von IGF2BP2 in der Leber, dem Skelettmuskel und dem weißen Fettgewebe wurde in Proteinproben der drei Gewebe mit einem polyklonalen IGF2BP2-Antikörper (Kaninchen) das IGF2BP2-Protein spezifisch gebunden und damit angereichert. Die in RIPA-Puffer isolierten Proteinproben wurden dazu mit SDS-freiem RIPA-Puffer verdünnt und jeweils auf die gleiche Proteinmenge eingestellt. Vor der eigentlichen IP wurden die Proben noch 2-mal für je 1 Stunde mit zuvor in SDS-freiem RIPA-Puffer gewaschener Pierce™ Protein G Agarose (Thermo Scientific™) bei Raumtemperatur und unter Rotation inkubiert. Für die anschließend folgende IP wurden die magnetischen *Dynabeads® Protein G* (Novex™) genutzt und die Separation erfolgte mithilfe eines entsprechenden Magnetständers. Die magnetische Protein G-Matrix wurde zunächst mit SDS-freiem RIPA-Puffer gewaschen, zu gleichen Anteilen in 2,0 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt (je 20 µL) und mit 2,5 µg des IGF2BP2-Antikörpers für ca. 30 Minuten inkubiert. Um eine unspezifische Bindung an die Protein G-Matrix ausschließen zu können, wurde einer der Ansätze nicht mit dem Antikörper inkubiert und diente als Negativkontrolle. Die mit Protein G Agarose vorbehandelten Proteinproben wurden durch Zentrifugation von der Matrix getrennt und vom Überstand jeweils 15 - 30 µL als Input abgenommen. Die restliche Proteinprobe wurde nun auf die mit IGF2BP2-Antikörper gekoppelte Protein G-Matrix gegeben und für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand der Proben verworfen und die Protein G-Matrix 3- bis 4-mal mit SDS-freiem RIPA-Puffer gewaschen (das Waschvolumen entsprach dem Volumen der zuvor inkubierten Proteinlösung). Das an die Protein G-Matrix gebundene Protein wurde durch Zugabe von 1-fachem *NuPAGE® LDS Sample Buffer* (Novex™) mit 0,2 % β -Mercaptoethanol für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock von der Protein G-Matrix eluiert und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Zur Überprüfung der spezifischen Anreicherung von IGF2BP2 wurde sowohl für die eluierten Proben als auch für die Inputproben eine SDS-PAGE mit anschließender *Western Blot* Analyse und nachfolgender Hybridisierung der Membran mit IGF2BP2-spezifischen Antikörpern durchgeführt.

3.7.8 ELISA

Der ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) ist ein antikörperbasiertes und damit immunologisches Verfahren zum Nachweis bestimmter Moleküle, welches in einer enzymatischen Farbreaktion resultiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschieden ELISAs durchgeführt, um Moleküle im Serum oder Lebergewebe der transgenen Mäuse quantitativ bestimmen zu können. Die jeweiligen Messungen erfolgten gemäß den Herstellerangaben (siehe Tabelle 6). Für jeden ELISA wurde im Vorfeld durch einen Testlauf ein angemessener Verdünnungsfaktor der Proben ermittelt, sodass die Konzentration der gemessenen Proben stets im Bereich der mitgeführten Standardreihe lag. Die für diese Standardreihe erhaltenen Messwerte wurden in Abhängigkeit der angegebenen Konzentration grafisch dargestellt und die Datenpunkte bestmöglich miteinander verbunden (*Curve Fitting*). Anhand der daraus erhaltenen mathematischen Funktion konnte durch Umstellen sowie unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors die jeweilige Konzentration der Probe berechnet werden.

Das für den IGF2-ELISA genutzte Lebergewebe wurde zuvor manuell in flüssigem Stickstoff gemörsert und mit PBS entsprechend den Herstellerangaben auf eine Konzentration von 100 µg/µL eingestellt. Der erhaltene Ansatz wurde bei 5000 rpm für 15 Sekunden im Precellys®24 (Bertin Technologies) vollständig homogenisiert und anschließend wie im Protokoll beschrieben weiterbearbeitet.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten ELISA-Kits

Verwendete ELISA-Kits			
Name	Probe	Verdünnung	Hersteller (Katalog #)
DRG® Mouse Insulin ELISA	Serum	1:4 / 1:7	DRG International (EIA-3439)
Mouse C-Peptide ELISA Kit	Serum	1:2 / 1:1,75	Crystal Chem (90050)
Mouse/Rat IGF-I Quantikine ELISA Kit	Serum	1:500	R&D Systems (MG100)
ELISA Kit for IGF2	Serum	1:250	Cloud-Clone Corp. (SEA051Mu)
Mouse IGF-2 ELISA Kit	Leber	1:1500	CUSABIO® (CSB-E04584m)
Mouse Adiponectin ELISA	Serum	1:1500	Merck Millipore (EZMADP-60K)
Mouse TSH ELISA Kit	Serum	---	MyBioSource (MBS007695)

3.8 Transkriptomanalysen

Die RNA-Sequenzierungen (*Transcriptome Shotgun Sequencing*) wurden in Leipzig in der Abteilung DNA-Technologien des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) unter Leitung von Herrn PD Dr. Knut Krohn durchgeführt. Dazu wurden 500 ng der RNA (siehe Kapitel 3.6.1) nach Leipzig gesandt und dort folgendermaßen weiterbearbeitet. Durch eine Behandlung der Total-RNA mit dem *RiboMinus™ Kit* (Invitrogen™) sollte zunächst die ribosomale RNA aus dem Ansatz entfernt werden. Die verbliebene RNA wurde durch die Zugabe von 5-fachem Fragmentierungspuffer und Erhitzen für 3 Minuten bei 94 °C im Thermocycler fragmentiert, gefolgt von einer Ethanol-fällung mit Ammoniumacetat und *GlycoBlue™* (Invitrogen™) als Fällungshilfen. In einer nachfolgenden RT-Reaktion unter Zugabe von *random* Primer und der *SuperScript® III* Reversen Transkriptase (Invitrogen™) erfolgte das Umschreiben der fragmentierten RNA in cDNA. Der Zweitstrang wurde mit dem *TargetAmp™ Kit* (Epicentre®) synthetisiert. Die am Ende der Erstellung der cDNA-Bibliothek notwendigen Schritte, wie das Reparieren der Fragmentenden, Ligieren der Adapter sowie Auffüllen und Vervielfältigen wurden wie zuvor in Meyer und Kircher 2010 beschrieben durchgeführt. Unter Anwendung des *KAPA Library Quantification Kits* (Kapa Biosystems) wurde die cDNA-Bibliothek gereinigt und quantifiziert. Mit dem *cBot System* (Illumina) wurden die Cluster generiert und dafür bis zu zehn Bibliotheken mit einer Konzentration von 10 nM genutzt. Die Sequenzierung von 2-mal 101 bp erfolgte mit dem *HiScan™ SQ System* (Illumina) in Version 3.

5x Fragmentierungspuffer

TRIS-Acetat (pH 8,2)	200 mM
Kaliumacetat	500 mM
Magnesiumacetat	150 mM

Die Bearbeitung und Auswertung der Datensätze wurde durch Herrn Dipl.-Bioinf. Markus Glaß wie folgt durchgeführt. Bei den vom IZKF in Leipzig erhaltenen Daten handelte es sich um FASTQ-Dateien, welche die Sequenzen bzw. sogenannten *Reads* der sequenzierten RNA-Fragmente enthielten. Die in den *Reads* vorhandenen Adaptersequenzen, sowie Sequenzenden von geringer Qualität wurden mithilfe des Programms *Cutadapt* [Martin 2011] in Version 1.6 entfernt. Anschließend wurden die *Reads* unter Nutzung des Programms *TopHat2* [Kim *et al.* 2013] in Version 2.0.13 dem menschlichen

Genom (UCSC GRCh37/hg19) zugeordnet und für jede Probe bestimmt, wie viele *Reads* jeweils den annotierten Genen des menschlichen Genoms zugeordnet werden. Hierfür wurde das Programm *featureCounts* [Liao *et al.* 2014] in Version 1.4.6 und die Ensembl-Annotation GRCh37.75 des menschlichen Genoms verwendet [Cunningham *et al.* 2015]. Da es sich bei der Sequenzierung um *paired-end*-Daten handelte, wurden anstelle einzelner *Reads* Fragmente gezählt. Ein Fragment überspannt dabei jeweils den genomischen Bereich, der mit Beginn des Anfangs-*Reads* startet und mit Abschluss des End-*Reads* endet. Die aufsummierten Fragmentzahlen wurden anschließend verwendet, um differenziell exprimierte Gene zu bestimmen. Dies geschah mittels R [R Core Team 2014] und dem R-Paket *edgeR* [Robinson *et al.* 2010]. Die dabei erhaltenen und für multiples Testen korrigierten p-Werte (FDR, *false discovery rate*) wurden als Indikator für eine differenzielle Expression verwendet. Gene, die mit einer $FDR < 0,1$ assoziiert waren wurden als differenziell exprimiert betrachtet.

3.9 Statistische Analysen und Nomenklatur

Die grafische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit der wissenschaftlichen Grafik- und Statistiksoftware SigmaPlot® 11.0. Die Boxdiagramme wurden mittels der Standardeinstellungen des Programms generiert, d.h. die untere Box zeigt das 25. Perzentil, die Linie innerhalb der Box markiert den Median und die obere Begrenzung der Box das 75. Perzentil. Die Linien ober- bzw. unterhalb der Box markieren das 90. bzw. 10. Perzentil. Die statistische Überprüfung der Daten erfolgte ebenso mit dem Programm SigmaPlot® 11.0. Bei einer Normalverteilung der Daten wurden diese mittels eines zweiseitigen t-Tests auf ihre Signifikanz geprüft. Konnte aufgrund fehlender Normalverteilung der Daten jedoch kein t-Test angewandt werden, so wurde ihre Signifikanz mithilfe des Wilcoxon *rank sum* Tests ermittelt. Dabei wurde stets die Versuchsgruppe mit der entsprechenden Kontrollgruppe verglichen. Lediglich die statistische Überprüfung der Vererbung der transgenen DNA wurde online mithilfe eines Chi-Quadrat-Tests (<http://daten-consult.de/forms/cht2x2.html>) durchgeführt.

Die verschiedenen Signifikanzniveaus sind wie folgt gekennzeichnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner 5 % als $p < 0,05$, kleiner 1 % als $p < 0,01$ und kleiner 0,1 % als $p < 0,001$. Die Mittelwerte der Messungen werden stets als Mittelwert \pm Standardfehler (Mw \pm SEM) angegeben.

Es werden weiterhin folgende Abkürzungen verwendet:

$n_{M/W}$ - Anzahl der untersuchten männlichen (M) oder weiblichen (W) Tiere bzw. Anzahl gemessener Proben

Die stärker variierende Anzahl der Messwerte während des OGTT bzw. IPTT resultiert aus dem vermutlich narkosebedingten Versterben einiger Tiere im Laufe der Versuche. Dennoch wurden alle Messwerte in der Versuchsauswertung berücksichtigt. Der erste Wert gibt somit geschlechtsabhängig die minimale Anzahl an Messwerten für jeden Zeitpunkt an.

N - Anzahl der unabhängigen Messungen

Im Rahmen dieser Arbeit werden die gebräuchlichsten Gensymbole sowohl für die Gene selbst, als auch für die Bezeichnung von RNA und Protein verwendet. Eine entsprechende Unterscheidung erfolgt im laufenden Text.

4 Ergebnisse

4.1 Expression der IGF2BPs im Wildtyp-Mausstamm C57BL/6

Ein charakteristisches Merkmal der IGF2-mRNA-bindenden Proteine ist, dass sie vornehmlich embryonal gebildet werden und ihre Expression zur Geburt hin rückläufig ist [Nielsen *et al.* 1999]. Im adulten Organismus ist vorwiegend für IGF2BP1 und IGF2BP3 keine nennenswerte Proteinmenge mehr nachweisbar, mit Ausnahme von Organen für die Reproduktion [Nielsen *et al.* 1999, Hansen *et al.* 2004, Hammer *et al.* 2005].

Um die bestehenden Erkenntnisse in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mausmodell erneut zu validieren und somit ein einheitliches Bild über die Expression aller IGF2BPs zu erhalten, wurde zunächst deren naives mRNA-Vorkommen in verschiedenen pränatalen Stadien der Maus im Alter von E12,5 bis E18,5 untersucht (Abb. 9). Die Analysen beschränkten sich auf die Leber sowie das Gehirn der Tiere, da diese beiden Organe in den frühen Entwicklungsphasen bereits durch ihre Größe und Lokalisation eindeutig erkennbar und abgrenzbar sind.

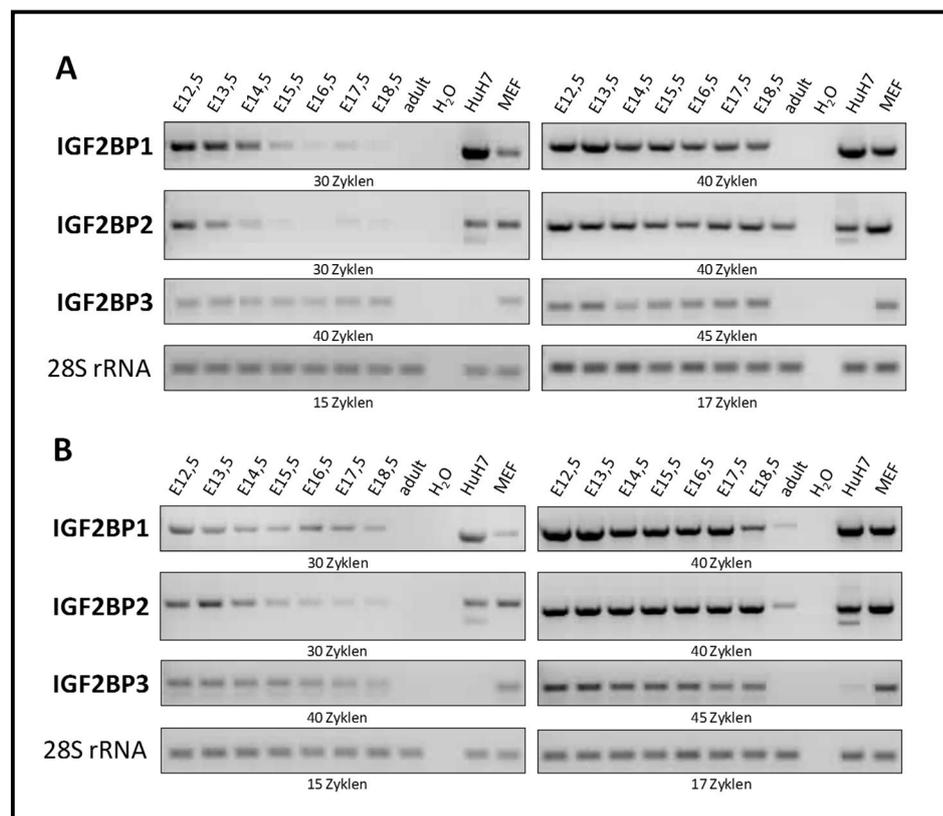


Abb. 9: Expression der IGF2BP-RNA während der Embryonalentwicklung in der Maus

Gezeigt ist die RNA-Expression der einzelnen IGF2BP-Familienmitglieder (A) in der Leber und (B) im Gehirn in den verschiedenen pränatalen Entwicklungsstadien der Maus. Die Analyse erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR und zeigt die embryonalen Stadien E12,5 bis E18,5, adultes Gewebe, eine Negativkontrolle (H₂O) sowie HuH7-Zellen und MEFs als Positivkontrolle. Vor der RNA-Isolation wurden die Organe mehrerer Tiere (n ≥ 10) abhängig vom Entwicklungsstadium gemischt. Unterhalb der einzelnen Bilder steht die zugehörige Anzahl der PCR-Zyklen. Die unterschiedlichen Zyklenzahlen dienen der Verdeutlichung der Expressionsunterschiede in den verschiedenen embryonalen Stadien und zeigen das spätere Auftreten der PCR-Produkte im adulten Gewebe. Das PCR-Produkt der 28S rRNA diente als Ladekontrolle.

Die mRNA aller drei IGF2BPs konnte pränatal sowohl in der Leber als auch im Gehirn nachgewiesen werden, wobei der mRNA-Gehalt ausgehend von Tag E12,5 bis zum Tag E18,5 deutlich abnahm (siehe Abb. 9). Diese Beobachtungen stimmen mit den bereits publizierten Daten überein [Nielsen *et al.* 1999, Hansen *et al.* 2004, Hammer *et al.* 2005]. In der adulten Leber war lediglich die RNA für IGF2BP2 detektierbar, wobei im adulten Gehirn neben IGF2BP2 auch ein PCR-Produkt für IGF2BP1 nachgewiesen werden konnte. Das Auftreten der Produkte erst nach über 30 PCR-Zyklen suggerierte eine verminderte Expression der mRNA im adulten Gewebe verglichen mit der Menge an mRNA während der frühen pränatalen Phasen. Eine Expression aller Mitglieder der Proteinfamilie konnte auch in der leberzellspezifischen Karzinomzelllinie HuH7 nachgewiesen werden. Es wurde bereits mehrfach eine erneute Expression der IGF2BPs in verschiedenen malignen Tumoren beschrieben [Yaniv und Yisraeli 2002, Yisraeli 2005, Bell *et al.* 2013].

Um eine vollständige Analyse der IGF2BP-Expression in dem untersuchten Mausmodell zu erhalten, wurden ebenso verschiedene adulte Gewebe mittels RT-PCR auf die Anwesenheit der mRNA aller drei IGF2BPs überprüft (Abb. 10). Die Expression von IGF2BP1 wird, wie zuvor in verschiedenen Studien schon beschrieben, in adulten Tieren größtenteils eingestellt [Nielsen *et al.* 1999, Hansen *et al.* 2004, Hammer *et al.* 2005]. Lediglich im Gehirn, der Lunge und der Milz der 16 Wochen alten männlichen Mäuse war ein Signal detektierbar. Weitestgehend altersunabhängig schien die IGF2BP3-Expression zu sein. Eine moderate Menge PCR-Produkt wurde in der Lunge, der Milz, der Niere sowie im Darm festgestellt. Im Gehirn und Skelettmuskel zeigte sich die IGF2BP3-mRNA jedoch nur in den 16 Wochen alten Mäusen, wohingegen ein schwaches Signal im Herzen sowie ein moderates Signal im Pankreas der 80 Wochen alten Mäuse auftrat. Besonders hervorstechend war die in allen analysierten adulten Organen auftretende IGF2BP2-mRNA.

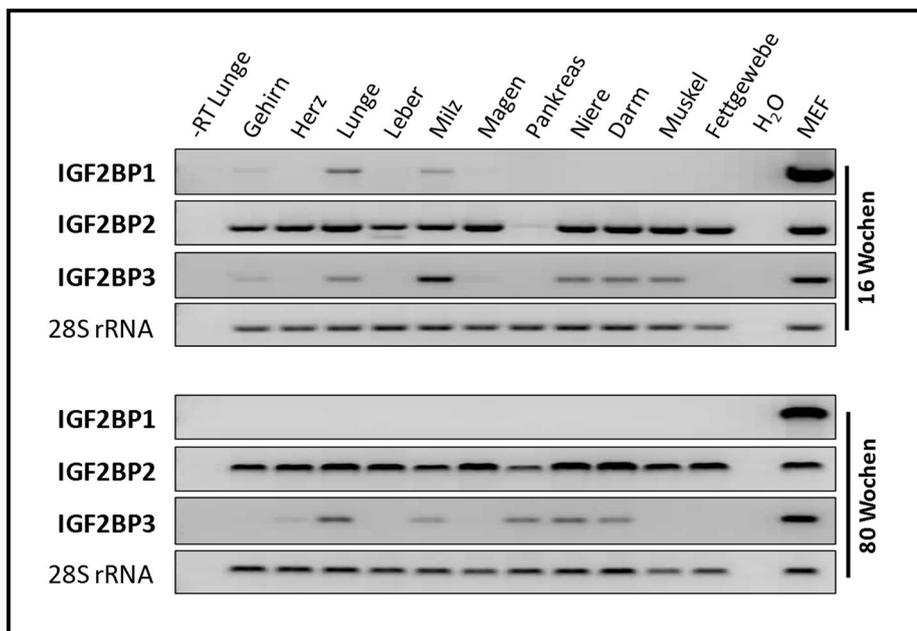


Abb. 10: IGF2BP-Expression in der adulten Maus

Semiquantitative RT-PCR Analyse der IGF2BPs (40 PCR-Zyklen) in verschiedenen adulten Mausgeweben. Dazu wurde RNA aus den Geweben männlicher Mäuse im Alter von 16 und 80 Wochen isoliert. Das PCR-Produkt der 28S rRNA diente als Ladekontrolle (20 PCR-Zyklen). Als Negativkontrolle wurden RNA aus der Lunge (-RT – keine Zugabe der Reversen Transkriptase) und Wasser genutzt sowie MEFs (E17,5) als Positivkontrolle.

Daten bereits publiziert in Bell *et al.* 2013

Zusammenfassend lässt sich aus den Expressionsanalysen bestätigen, dass die IGF2BP-Gene während der Entwicklung genau definiert aktiviert und damit transkribiert werden [Nielsen *et al.* 1999]. Diese entwicklungsabhängige Regulation hat ihren Höhepunkt um den 12. embryonalen Tag und wird dann im Falle des IGF2BP2 im älter werdenden Organismus wieder auf ein bestimmtes Level gedrosselt, während die Expression von IGF2BP1 und IGF2BP3 bis auf wenige Ausnahmen in den adulten Geweben nahezu komplett zum Erliegen kommt.

4.2 Transgenes Mausmodell

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten transgenen Mäuse wurden mittels der weit verbreiteten und gut etablierten Methode der Mikroinjektion generiert. Die Durchführung dieser Methode erfolgte durch die *Transgenic Core Facility* des Max-Planck-Institutes für Molekulare Zellbiologie und Genetik (MPI-CBG) in Dresden unter Leitung von Herrn Ronald Naumann. Die dabei verwendeten DNA-Konstrukte wurden in der eigenen Arbeitsgruppe durch Herrn Nikolaos Pazaitis und Dr. Marcell Lederer kloniert, im Zellkultursystem erfolgreich getestet und zur Generierung der Mäuse nach Dresden übersandt. Der zur Herstellung der verschiedenen Konstrukte verwendete Grundvektor wurde von Saito und Kollegen bereits erfolgreich zur Generierung eines transgenen Mausmodells angewandt und unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise zur Verfügung gestellt [Saito *et al.* 2001]. Um eine möglichst effektive Transkription der fremden DNA zu erhalten, werden neben dem Vorhandensein eines Promotors und einer Polyadenylierungssequenz in der Regel noch weitere Elemente mit kloniert. Der Grundvektor enthielt z.B. ein Intron sowie drei Exons des β -Globins aus dem Kaninchen (Abb. 11), um eine bessere Regulation der Transkription zu erreichen und die Güte der Transgenexpression zu verbessern. Zur Erleichterung diverser biochemischer Analysen sowie für eine Unterscheidung von endogenem und exogenem Protein wurden unterschiedliche *Tag*-Sequenzen vor die Sequenz der IGF2BPs kloniert. *Tags* sind kurze Peptidfragmente, die neben der Erkennung und Detektion eines spezifischen Proteins gewöhnlich zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen oder Proteinkomplexen genutzt werden. Die in den DNA-Konstrukten verwendeten *Tags* sind das aus der Birke stammende BiPro-*Tag* (Birken-Profilin), das Flag-*Tag* sowie das HA-*Tag* (Hämagglutinin). Die transgenen Tiere der Kontrollgruppen exprimieren anstelle der IGF2BPs das grün-fluoreszierende Protein (GFP). GFP stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und fluoresziert bei einer Anregungswellenlänge im ultravioletten Bereich grün [Shimomura 2005]. Es ist mittlerweile zu einem der wichtigsten Instrumente in der Molekularbiologie geworden. Sowohl die *Tags* als auch das GFP sollten keine Effekte auf die Expression sowie das biologische Verhalten oder die Funktion der Proteine zeigen. Die letztlich in den transgenen Mäusen überexprimierten Proteine sind neben dem reinen GFP auch ein mit BiPro-fusioniertes GFP und die einzelnen humanen IGF2BP-Varianten, die in Form von N-terminalen Fusionsproteinen synthetisiert werden. Unter Verwendung zweier unterschiedlicher Promotoren konnten zwei verschiedene transgene Mausmodelle etabliert werden. Die Nutzung des Ubiquitin C-Promotors (UbC) erlaubt die Expression der exogenen Proteine im gesamten Organismus, während ein Albumin-Promotor (Alb) eine selektive Expression nur in der Leber bewirkt. Das Protein Ubiquitin kommt aufgrund seiner essentiellen Funktionen im Abbau von Proteinen, im Zellzyklus sowie in verschiedenen Signalwegen in allen eukaryotischen Zellen vor. Albumin hingegen ist eines der wichtigsten globulären Plasmaproteine und für den Transport einer Vielzahl wasserunlöslicher Stoffe im Blut, wie z.B. von Fettsäuren, Aminosäuren, Bilirubin und Hormonen verantwortlich. Es wird nahezu ausschließlich in der Leber gebildet und ist auch von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks. Die Expression beider Promotoren wird durch sogenannte *Enhancer*-Elemente zusätzlich gefördert.

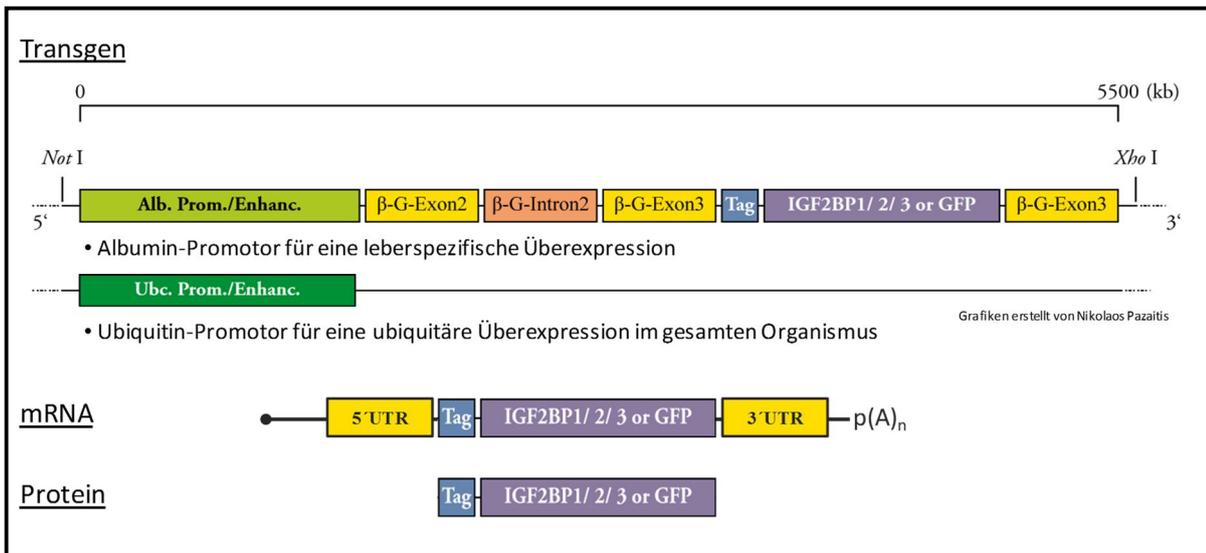


Abb. 11: Schematische Darstellung der DNA-Konstrukte für die Erzeugung transgener Mäuse

Aufbau des offenen Leserasters der transgenen Konstrukte für die Expression der drei paralogen IGF2BPs oder von GFP sowie die daraus resultierende reife mRNA- und Proteinstruktur. Die Zielgene wurden zusammen mit unterschiedlichen N-terminalen Tags, sowie drei Exons und einem Intron des β-Globins aus dem Kaninchen kloniert. Für eine leberspezifische oder ubiquitäre Expression wurden die Konstrukte mit einem Albumin- bzw. Ubiquitin-Promotor fusioniert.

Insgesamt wurden acht verschiedene DNA-Konstrukte von Herrn Pazaitis und Herrn Dr. Lederer kloniert, vier mit einem UbC-Promotor und vier mit einem Alb-Promotor. Drei von diesen je vier Vektoren codierten für das jeweilige IGF2BP und je ein Konstrukt enthielt die Sequenz von GFP für Kontrollzwecke (Tabelle 7). In jede Zygote wurde eines der acht DNA-Konstrukte injiziert. Als Versuchsstamm wurde der C57BL/6J0laHsd-Stamm genutzt, ein Unterstamm des bekanntesten und am häufigsten genutzten Inzuchtstammes C57BL/6. Die nach der Mikroinjektion von den Empfänger-tieren ausgetragenen Mäuse wurden zunächst im Max-Planck-Institut in Dresden auf die genomische Anwesenheit des Transgens untersucht und die positiven Tiere für weitere Analysen unserer Arbeitsgruppe übermittelt. Dabei begründet jedes Tier in dessen Genom die transgene DNA nachgewiesen werden konnte einen individuellen Stamm, für den eine eigene Zucht aufgebaut wird. Es wird daher als Stammtier oder *Founder* bezeichnet.

Tabelle 7: Übersicht der klonierten DNA-Konstrukte zur Erzeugung transgener Mausstämme

Die Expression der einzelnen IGF2BPs sollte einerseits im gesamten Organismus unter Kontrolle eines Ubiquitin C-Promotors (UbC) und andererseits nur in der Leber unter Kontrolle eines Albumin-Promotors (Alb) erfolgen. Zur einfacheren Unterscheidung von murinem IGF2BP und humanem IGF2BP wurden die transgenen Proteine mit einem Tag-Protein fusioniert, welches natürlicherweise nicht im Organismus vorkommt und somit das Transgen eindeutig nachweist.

Promotor	Tag	Protein
UbC	---	GFP
UbC	Flag	IGF2BP1
UbC	BiPro	IGF2BP2
UbC	HA	IGF2BP3
Alb	BiPro	GFP
Alb	Flag	IGF2BP1
Alb	BiPro	IGF2BP2
Alb	HA	IGF2BP3

4.2.1 Übersicht der erhaltenen transgenen Stämme

Aus den acht verschiedenen DNA-Konstrukten wurden insgesamt 29 Stammtiere erhalten. Die aus der Verpaarung dieser Stammtiere mit Wildtyp-Tieren erhaltenen F1-Generationen wurden bezüglich der Transgenexpression sowohl auf genomischer (siehe Kapitel 3.1.2) als auch auf Proteinebene (siehe Kapitel 4.4) eingehend analysiert. Neben F1-Tieren, welche die fremde DNA von der Parentalgeneration nicht vererbt bekommen hatten, gab es auch Stämme die trotz einer Integration der Fremd-DNA in das Genom das jeweilige Protein nicht exprimierten. Ebenso gab es Stammtiere die keine Nachkommen zeugten. Die Ursache dafür lag entweder in einem frühzeitigen Versterben der Tiere oder war unbekannter Natur. Transgene Mäuse, welche die Proteine für IGF2BP1 bzw. IGF2BP3 ubiquitär überexprimieren sollten, wurden aus den oben genannten Gründen nicht erhalten.

Nach intensiver Analyse der Nachkommen der 29 verschiedenen Stammtiere blieben am Ende sieben tatsächlich transgene Stämme übrig. Vier davon exprimierten albuminabhängig und lediglich drei unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors. Von diesen drei UbC-Stämmen exprimieren zwei IGF2BP2. Eine Zusammenfassung der resultierenden Stämme ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Übersicht der transgenen Mausstämme

Transgene Stämme		
Transgenkonstrukt	Stammbezeichnung	Expression
Ubiquitin-GFP	UbC-Kontrolle	ubiquitär
Ubiquitin-BiPro-IGF2BP2_L	UbC-IGF2BP2_L	
Ubiquitin-BiPro-IGF2BP2_H	UbC-IGF2BP2_H	
Albumin-BiPro-GFP	Alb-Kontrolle	leberspezifisch
Albumin-Flag-IGF2BP1	Alb-IGF2BP1	
Albumin-BiPro-IGF2BP2	Alb-IGF2BP2	
Albumin-HA-IGF2BP3	Alb-IGF2BP3	

Die Benennung der einzelnen Stämme erfolgt im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Einfachheit halber entsprechend der in Tabelle 8 aufgeführten Stammbezeichnung.

4.3 Analyse der Vererbung der Fremd-DNA

Die erhaltenen transgenen Tiere tragen definitionsgemäß eine hemizygote Mutation in Form eines zusätzlichen Gens in ihrem Genom. Das bedeutet, diese Mutation befindet sich normalerweise nur auf einem Allel eines Gens. Sie kann jedoch aufgrund der angewandten Methode der Mikroinjektion durchaus an mehreren Stellen im Genom auftreten, abhängig davon, wie viele Kopien des fremden DNA-Konstruktes an unterschiedlichen Stellen zufällig in das Genom integriert sind. Die in dieser Arbeit charakterisierten transgenen Mäuse wurden nicht auf den Ort oder die Anzahl der transgenen Kopien im Genom hin untersucht, sodass unklar ist, wie viele Kopien der transgenen Konstrukte in jedem Stamm enthalten sind.

Basierend auf den in der Genotypisierung erhaltenen genomischen Daten und der Dokumentation der einzelnen Zuchten, erfolgte eine Auswertung der Vererbung der transgenen Konstrukte sowie eine Analyse der einzelnen Würfe (Tabelle 9).

Tabelle 9: Vererbung der transgenen DNA in den verschiedenen Mausstämmen

Zusammengefasst ist die Anzahl der Tiere (F2-F11), bei denen die fremde DNA im Genom integriert war (Transgen⁺) oder nicht (Transgen⁻) sowie deren prozentualer Anteil (% Total) bezogen auf die Gesamtanzahl (Total), der Prozentsatz an Männchen (% M) und Weibchen (% W), die Anzahl der analysierten Würfe sowie die durchschnittliche Zahl an Nachkommen pro Wurf (Wurfgröße) für jeden Stamm. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den zugehörigen Kontrollstamm.

Vererbung der transgenen DNA							
Stamm	Transgen ⁺	Transgen ⁻	% M	% W	Total	Würfe	Wurfgröße
UbC-Kontrolle	427 (88,4 %)	56 (11,6 %)	50,9	49,1	483	73	6,6 ± 0,2
UbC-IGF2BP2_L	360 (65,2 %) ***	192 (34,8 %)	53,4	46,6	552	110	5,0 ± 0,2 ***
UbC-IGF2BP2_H	287 (76,3 %) *	89 (23,7 %)	50,5	49,5	376	68	5,5 ± 0,3 **
Alb-Kontrolle	348 (86,8 %)	53 (13,2 %)	48,6	51,4	401	62	6,5 ± 0,2
Alb-IGF2BP1	275 (92,0 %)	24 (8,0 %)	49,5	50,5	299	49	6,1 ± 0,3
Alb-IGF2BP2	327 (82,6 %)	69 (17,4 %)	50,0	50,0	396	72	5,5 ± 0,2 **
Alb-IGF2BP3	223 (65,2 %) ***	119 (34,8 %)	51,2	48,8	342	64	5,3 ± 0,2 ***

Grundsätzlich folgt die Vererbung der transgenen DNA den von Gregor Mendel beschriebenen Regeln. Die Verteilung der Geschlechter lag bei ca. 50 %. Alle Nachkommen waren fertil und konnten zum Aufbau der jeweiligen Zucht beitragen. Auffällig war, dass der Prozentsatz positiver Transgene bei den leberspezifischen Alb-IGF2BP3-Tieren sowie bei beiden ubiquitären UbC-IGF2BP2-Mausstämmen signifikant vermindert war verglichen mit dem zugehörigen Kontrollstamm. Ebenso wurde bei dem leberspezifischen Alb-IGF2BP2-Stamm sowie bei den bereits genannten Stämmen eine verminderte Anzahl an Nachkommen pro Wurf festgestellt.

4.4 Expression der IGF2BPs im transgenen Mausmodell

Damit sichergestellt werden konnte, dass das verwendete Mausmodell die transgene DNA nicht nur auf genomischer Ebene trägt, sondern auch die gewünschte mRNA- bzw. Proteinexpression zeigt, wurden die sieben Stämme dahingehend weiter charakterisiert. Hierbei wurde ebenfalls die Gewebespezifität der verwendeten Promotoren überprüft.

4.4.1 Expression der transgenen Proteine unter Kontrolle eines Ubiquitin-Promotors

Bei den UbC-Tieren, welche transgene DNA-Konstrukte mit einem Ubiquitin-Promotor trugen, wurde mithilfe von *Western Blot* Analysen die Expression der exogenen Proteine, nicht nur in der Schwanzspitze (siehe Kapitel 3.1.2), sondern auch in den verschiedenen Organen nachgewiesen.

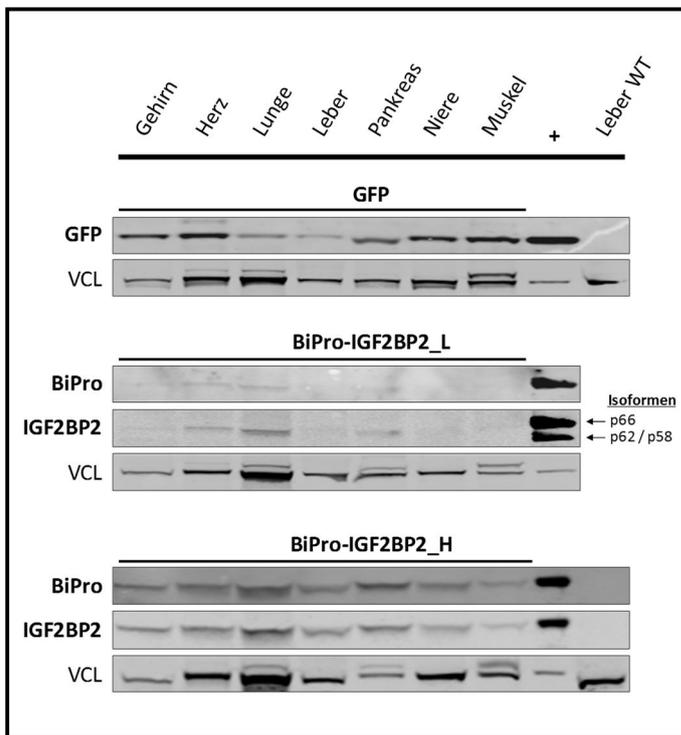


Abb. 12: Nachweis der ubiquitären Überexpression der transgenen Proteine

Mittels *Western Blot* Analysen wurden Gewebe des UbC-BiPro-IGF2BP2_L- und UbC-BiPro-IGF2BP2_H- sowie des UbC-GFP-Stammes auf das Vorhandensein der jeweiligen transgenen Proteine untersucht. Vinculin (VCL) diente als Ladekontrolle. Als Negativkontrolle wurde die Leber einer Wildtyp-Maus (WT) mitgeführt. Das Gesamtprotein von zuvor mit dem jeweiligen transgenen Konstrukt transient transfizierten HEK293T-Zellen fungierte sowohl als Positiv- als auch als Größenkontrolle (+) der nachzuweisenden Proteine. Zur Detektion des BiPro-IGF2BP2-Proteins wurden ein BiPro-Tag-Antikörper und ein sowohl gegen murines als auch humanes IGF2BP2-Protein gerichteter Antikörper eingesetzt.

Im UbC-Kontrollstamm konnte in allen untersuchten Organen eine Expression des GFP-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 12). Ebenso präsent war das BiPro-IGF2BP2-Protein in den Organen der Mäuse des IGF2BP2_H-Stammes. Die Detektion des humanen IGF2BP2-Proteins war im IGF2BP2_L-Stamm jedoch deutlich reduziert. In weiteren Analysen konnte eine ubiquitäre Überexpression von BiPro-IGF2BP2 in diesem Stamm aber ebenso eindeutig nachgewiesen werden. Eine Unterscheidung von endogenem und exogenem IGF2BP2 war aufgrund des minimalen Größenunterschiedes durch das BiPro-Tag nicht immer eindeutig. Anzumerken ist, dass in der Leber der WT-Tiere erwartungsgemäß kein GFP detektiert werden konnte, aber auch keine Expression von endogenem IGF2BP2-Protein mittels dieser Methode nachweisbar war. Die lediglich in der Positivkontrolle des IGF2BP2_L-Stammes zu sehende Doppelbande repräsentiert neben der längsten IGF2BP2-Isoform mit einer Größe von ca. 66 kDa (p66) auch die beiden kürzeren IGF2BP2-Isoformen p62 und p58. Das Auftreten einer weiteren Doppelbande bei der Detektion von Vinculin zeigt zusätzlich die hauptsächlich im Muskelgewebe vorkommende und etwas größere Spleißvariante Metavinculin.

Aus der unterschiedlich starken Überexpression des humanen IGF2BP2-Proteins in den beiden IGF2BP2-Stämmen resultierte schließlich deren Bezeichnung: IGF2BP2_L steht für eine geringe Überexpression (L - *low expression*) und IGF2BP2_H verdeutlicht die wesentlich stärkere Überexpression des humanen IGF2BP2-Proteins in diesem Stamm (H - *high expression*).

Im Folgenden wurde die Expression von IGF2BP2 nicht nur in den transgenen IGF2BP2-Tieren, sondern auch im Kontrollstamm näher untersucht. Dazu wurden die Leber, der Skelettmuskel und das weiße Fettgewebe aufgrund ihrer essentiellen Rolle im Glucosestoffwechsel ausgewählt.

Mittels qPCR konnte in allen transgenen UbC-Stämmen und in allen drei untersuchten Organen die Expression der endogenen murinen IGF2BP2-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 13, A). Als Normalisierungskontrolle diente die Menge an IGF2BP2-mRNA in Hepatozyten der Mauszelllinie AML12. Die Expression der murinen IGF2BP2-mRNA variierte zwischen den einzelnen Organen.

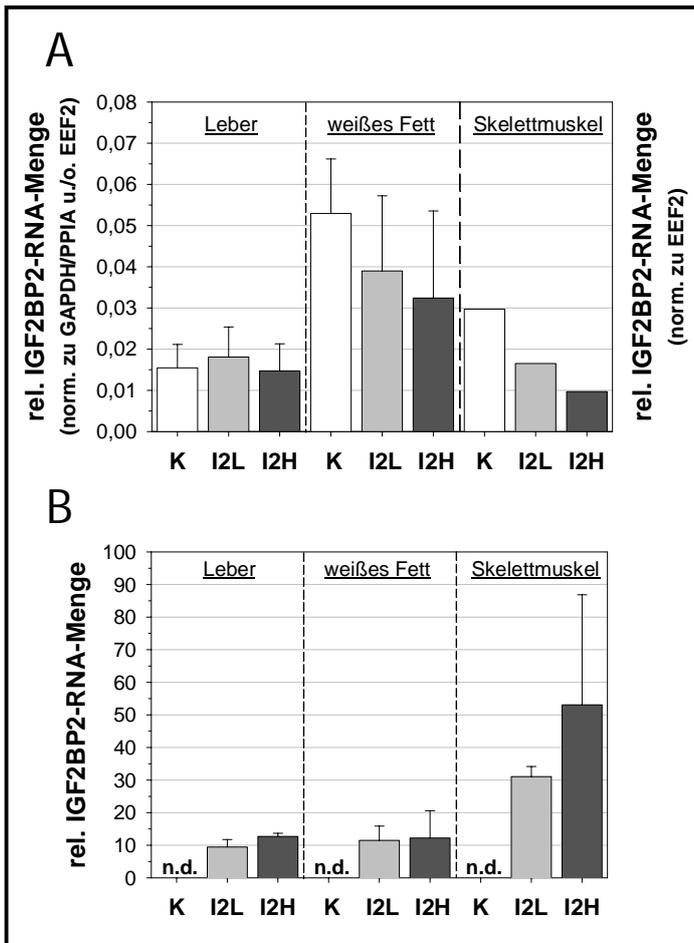


Abb. 13: Expression der murinen sowie humanen mRNA von IGF2BP2 in Leber, Muskel und Fett der UbC-Mäuse

Dargestellt sind die relativen Mengen (A) der endogenen murinen IGF2BP2-RNA und (B) der transgenen humanen IGF2BP2-RNA in den UbC-Kontrollen (K) sowie den IGF2BP2-Stämmen (I2L und I2H). Die relativen Werte wurden ermittelt (A) durch Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes bezogen auf die Menge der murinen IGF2BP2-RNA in AML12-Zellen (= 1) sowie (B) durch Anwendung der ΔC_T -Methode bezogen auf den C_T -Wert der murinen IGF2BP2-RNA in der jeweiligen Probe. Vor der Messung wurden für jedes untersuchte Gewebe von je 6 Männchen (im Fettgewebe nur 5 Männchen) bzw. 6 Weibchen gleiche Mengen an RNA gemischt, einer gemeinsamen RT-Reaktion unterzogen und in der qPCR geschlechtsabhängig in einer 3-fach Bestimmung vermessen. N = 1
n.d. - nicht detektierbar

Ebenso wie die endogene IGF2BP2-mRNA konnte auch die exogene mRNA des transgenen IGF2BP2-Gens in beiden UbC-IGF2BP2-Stämmen detektiert werden (Abb. 13, B). Erwartungsgemäß wurde in den UbC-Kontrollen keine humane IGF2BP2-mRNA nachgewiesen. Um eine grobe Aussage bezüglich der Menge der überexprimierten transgenen IGF2BP2-mRNA treffen zu können, wurde die relative Menge des humanen Transkriptes auf die Menge der murinen IGF2BP2-mRNA der jeweiligen Probe bezogen (ΔC_T -Methode). In allen untersuchten Geweben wiesen die Mäuse des IGF2BP2_H-Stammes ein größeres Vorkommen an humaner IGF2BP2-mRNA verglichen zum IGF2BP2_L-Stamm auf.

Entscheidend für die Etablierung transgener Tiere ist neben der Expression der mRNA-Transkripte auch die aus dieser transgenen mRNA tatsächlich hervorgehende Menge an synthetisiertem Protein. Mittels *Western Blot* Analysen konnten im IGF2BP2_H-Stamm eindeutige Signale für das IGF2BP2-Protein detektiert werden, jedoch waren diese bereits in den IGF2BP2_L-Tieren sehr schwach und im Kontroll- bzw. Wildtyp-Stamm konnte keine endogene Expression des IGF2BP2-Proteins nachgewiesen werden (siehe Abb. 12 und Abb. A1). Das ist jedoch verwunderlich bezogen auf die bereits publizierten Daten der IGF2BP2-knockout Mäuse [Dai *et al.* 2015]. Die von Dai und Kollegen in Wildtyp-Tieren mittels einer *Western Blot* Analyse nachgewiesene eindeutige Expression des IGF2BP2-Proteins konnte in dem hier untersuchten Mausmodell nicht bestätigt werden. Dabei stammen beide Modelle von dem gleichen Mausstamm C57BL/6 ab.

Um dennoch eine Aussage über das Verhältnis der IGF2BP2-Expression zwischen den verschiedenen Stämmen treffen zu können, musste eine Anreicherung des transgenen Proteins erfolgen. Dazu wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit einem spezifischen IGF2BP2-Antikörper durchgeführt.

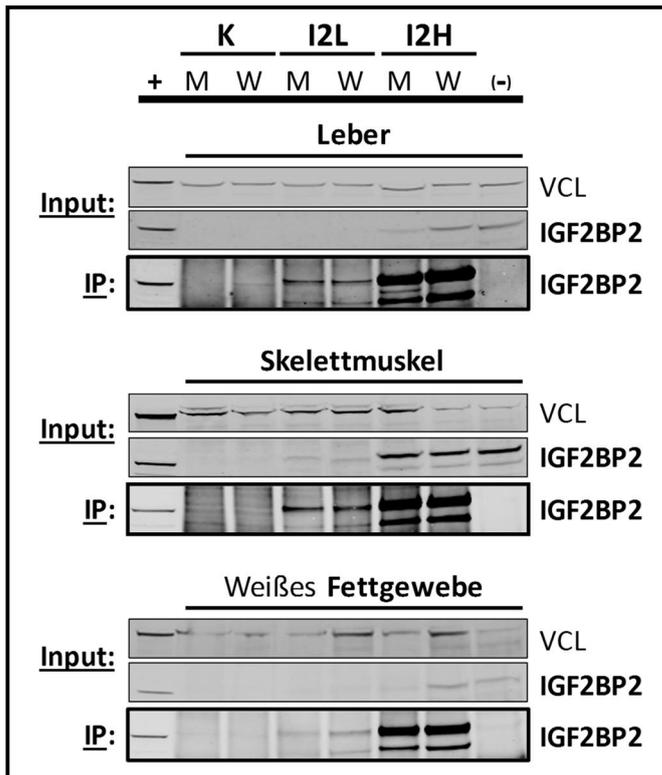


Abb. 14: Immunpräzipitation von IGF2BP2 in verschiedenen Organen der UbC-Mäuse

Dargestellt sind die Ergebnisse einer Immunpräzipitation (IP) mithilfe eines spezifischen IGF2BP2-Antikörpers und anschließender *Western Blot* Analyse. Dafür wurde isoliertes Gesamtprotein von je 6 Männchen (M) und 6 Weibchen (W) (Leber: nur je 3 Tiere) zu gleichen Anteilen gemischt und IGF2BP2 immunpräzipitiert. Als Negativkontrolle (-) der IP wurde Gesamtprotein der weiblichen Tiere des IGF2BP2_H-Stammes genutzt und mit unbehandelter Protein G-Matrix versetzt. Als Positivkontrolle (+) im *Western Blot* wurde Gesamtprotein von HEK293T-Zellen, welche zuvor mit dem BiPro-IGF2BP2-Konstrukt transient transfiziert worden sind, aufgetragen. Vinculin (VCL) diente als Ladekontrolle im Input.

Ein Vergleich der Signalintensitäten des Inputs mit denen nach erfolgter IP ließ eine eindeutige Anreicherung des IGF2BP2-Proteins erkennen (Abb. 14). Da die Negativkontrolle nach der IP nahezu kein Signal für IGF2BP2 aufwies konnte von einer spezifischen Bindung des Proteins an die zuvor behandelte Protein G-Matrix ausgegangen werden. Lediglich im Fettgewebe zeigte die Negativkontrolle eine sehr schwache IGF2BP2-Bande, welche im Verhältnis zu der stark angereicherten IGF2BP2-Menge in der dazugehörigen IP-Probe links daneben jedoch vernachlässigbar gering war. Trotz der selektiven Bindung des Zielproteins an die Matrix konnte im UbC-Kontrollstamm (K) nur eine sehr schwache IGF2BP2-Bande detektiert werden. Im Vergleich dazu zeigten die IGF2BP2_L-Tiere (I2L) eine deutliche Überexpression von IGF2BP2, wohingegen jedoch die Tiere des IGF2BP2_H-Stammes (I2H) eine wesentlich stärkere Expression von IGF2BP2 aufwiesen. Eine Quantifizierung der Bandenintensitäten sowie der Vergleich der Expression zwischen den Organen erschien aufgrund der fehlenden Normalisierung in der IP und der vermutlich unterschiedlichen IP-Effizienzen nicht sinnvoll.

Nach der IP ließen sich nun auch das endogene und exogene IGF2BP2-Protein besser voneinander unterscheiden. Das ist besonders gut in den Leberproben der IGF2BP2_L-Tiere zu erkennen. Die obere Bande repräsentiert das transgene BiPro-IGF2BP2-Protein und die untere das murine IGF2BP2-Protein. Verdeutlicht wird das dadurch, dass in der Leber der Kontrolltiere lediglich die untere der beiden Banden detektiert wurde, welche erwartungsgemäß nur die Expression des murinen IGF2BP2-Proteins zeigte. Überraschend war jedoch das Auftreten weiterer IGF2BP2-Banden. Dazu ist anzumerken, dass IGF2BP2 verglichen zu den Geweben vor allem in den Proteinproben aus der Zellkultur stets ein charakteristisches Bandenmuster aufweist, indem die drei Varianten p66, p62 und p58 meist als Doppelbande zu sehen sind. Aufgrund der Tatsache, dass lediglich das längste Transkript des humanen IGF2BP2 (p66) überexprimiert wurde, ist unklar, ob es sich dabei um Isoformen des IGF2BP2 handelt oder um unspezifische Antikörperbindungen. Dennoch scheint es durchaus möglich, dass aus dem transgenen p66-Transkript die p58-Isoform durch alternative Translationsinitiation entstehen könnte, jedoch höchstwahrscheinlich nicht die Spleißvariante p62.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass zwei transgene Stämme mit einer ubiquitären, aber unterschiedlich starken Überexpression des humanen IGF2BP2 generiert werden konnten. In allen untersuchten Geweben konnte eine Expression nachgewiesen werden, wobei der UbC-IGF2BP2_H-Stamm stets mehr IGF2BP2 exprimierte, als die Mäuse des UbC-IGF2BP2_L-Stammes. Auch die Messungen der mRNA-Expression zeigten eine erhöhte mRNA-Menge in den IGF2BP2_H-Tieren verglichen zu den IGF2BP2_L-Mäusen. Trotz der ubiquitären Expression von IGF2BP2 wurde das Protein in einigen Geweben besser detektiert als in anderen.

4.4.2 Expression des Transgens unter Kontrolle eines Albumin-Promotors

In den Albumin-Mäusen, deren transgene DNA einen Albumin-Promotor enthielt, wurde ebenso die Expression der IGF2BPs untersucht, wobei sich im Unterschied zu den UbC-Tieren die Expression fast ausschließlich auf die Leber beschränken sollte. In Abb. 15 ist die mRNA-Expression am Beispiel Flag-IGF2BP1-überexprimierender Mäuse gezeigt.

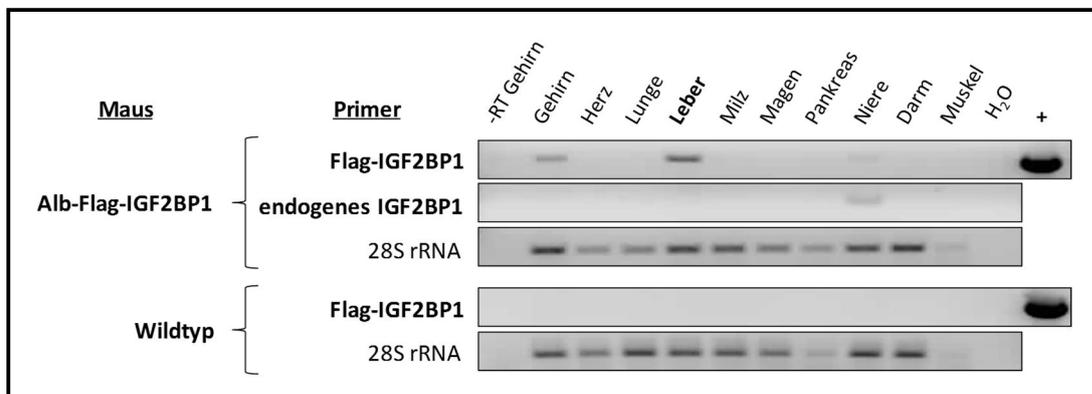


Abb. 15: Expression der mRNA des IGF2BP1-Transgens unter Kontrolle des Albumin-Promotors

Mittels RT-PCR wurde die Gewebespezifität des Alb-Promotors getestet. Dazu wurde Total-RNA aus den Geweben von Flag-IGF2BP1-überexprimierenden Mäusen isoliert und auf die Expression der humanen Flag-IGF2BP1- sowie der endogenen murinen IGF2BP1-mRNA (je 30 PCR-Zyklen) untersucht. Das PCR-Produkt der 28S rRNA diente als Ladekontrolle (je 13 PCR-Zyklen). Zur Spezifitätskontrolle der humanen Flag-IGF2BP1-Primer wurde eine weitere PCR mit mRNA aus Organen von Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden mRNA aus dem Gehirn (-RT – keine Zugabe der Reversen Transkriptase) und Wasser genutzt. Das DNA-Konstrukt für Alb-Flag-IGF2BP1 diente als Positivkontrolle (+).

Wie erwartet zeigte sich das PCR-Produkt der Flag-IGF2BP1-mRNA zum größten Teil in der Leber. Es ist bereits bekannt, dass Albumin zu einem gewissen Prozentsatz auch in extra-hepatischen Geweben wie z.B. in der Niere, dem Pankreas, dem Darm und im Gehirn exprimiert wird [Nahon *et al.* 1988, Shamay *et al.* 2005, Ahn *et al.* 2008]. In unseren Untersuchungen konnte die mRNA für Flag-IGF2BP1, außer in der Leber, lediglich noch im Gehirn und in der Niere nachgewiesen werden. Wobei in beiden Organen die mRNA-Menge deutlich geringer war als in der Leber. Endogenes IGF2BP1 wurde nur in der Niere festgestellt. Somit konnte der Nachweis erbracht werden, dass der Albumin-Promotor erwartungsgemäß am stärksten in der Leber aktiv ist. Aufgrund der identischen Sequenz des Albumin-Promotors in allen transgenen DNA-Konstrukten, wurde davon ausgegangen, dass die Aktivität des Promotors auch in den transgenen BiPro-GFP-, BiPro-IGF2BP2- und HA-IGF2BP3-Mäusen unverändert und weitestgehend leberspezifisch ist.

Die Überexpression der transgenen Proteine in der Leber der Albumin-Tiere wurde mithilfe von *Western Blot* Analysen nachgewiesen.

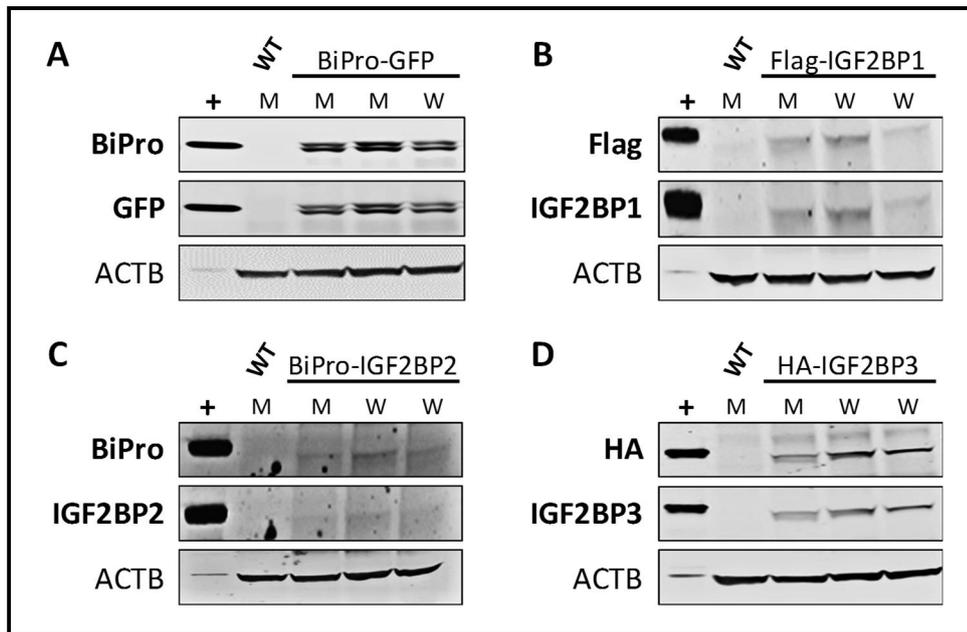


Abb. 16: Nachweis der Überexpression der Albumin-Konstrukte in der Leber

Dargestellt sind die *Western Blot* Ergebnisse aus der Leber von (A) Alb-BiPro-GFP, (B) Alb-Flag-IGF2BP1, (C) Alb-BiPro-IGF2BP2 und (D) Alb-HA-IGF2BP3 transgenen Mäusen. Dazu wurden je drei Lebern pro Konstrukt analysiert sowie die Leber einer Wildtyp-Maus (WT) als Negativkontrolle und als Positiv- und Größenkontrolle (+) Gesamtprotein von HEK293T-Zellen, welche zuvor mit dem jeweiligen Konstrukt transfiziert worden sind. β -Aktin (ACTB) diente als Ladekontrolle. Zur Detektion der einzelnen Konstrukte wurde sowohl ein *Tag*-spezifischer Antikörper genutzt (A und C: BiPro, B: Flag und D: HA) sowie Antikörper gegen GFP (A) und die drei Mitglieder der IGF2BP-Familie (B-D), welche sowohl murines als auch humanes IGF2BP-Protein erkannten. M - Männchen, W - Weibchen

Für die Albumin-Konstrukte konnte in allen IGF2BP-Stämmen eine transgene Proteinexpression in der Leber nachgewiesen werden (Abb. 16). Ein deutliches Signal war bei den BiPro-GFP-, Flag-IGF2BP1- und HA-IGF2BP3-Tieren detektierbar, wohingegen die Lebern der BiPro-IGF2BP2-Mäuse ein wesentlich schwächeres Signal aufwiesen. Generell war, wie auch bei den Ubc-IGF2BP2_L-Mäusen, bei dem Nachweis des IGF2BP2-Proteins mit dem IGF2BP2-Antikörper meist nur eine sehr schwache Bande detektierbar, wohingegen mithilfe des BiPro-Antikörpers stets ein vergleichsweise stärkeres Signal detektiert werden konnte. Interessanterweise wurde in den Lebern der Kontrolltiere sowohl für den Nachweis von GFP als auch des BiPro-*Tags* eine Doppelbande detektiert. Diese trat nicht in der Positivkontrolle auf, weil die HEK293T-Zellen mit dem Ubc-GFP-Konstrukt transfiziert worden sind und daher kein BiPro-*Tag* exprimierten. Die auch für den BiPro-*Tag*-Nachweis beobachtete Doppelbande resultierte höchstwahrscheinlich aus einer Kreuzreaktion der beiden verwendeten Sekundärantikörper. Da nach einer ersten Inkubation mit dem GFP-Antikörper ein deutliches Signal detektiert wurde und erst darauffolgend eine zweite Inkubation mit dem BiPro-Antikörper gleicher Spezies durchgeführt wurde, war eine spezifische BiPro-Detektion nicht mehr möglich. Dennoch scheint neben dem BiPro-GFP auch ein *Tag*-freies GFP exprimiert zu werden. Der Vergleich der Banden in der Positivkontrolle und den Leberproben suggeriert, dass die untere Bande freies GFP und die obere vermutlich BiPro-GFP zeigt. Inwieweit es sich hierbei um eine Modifikation, Prozessierung oder den Abbau des transgenen Proteins handelt ist bisher ungeklärt.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sowohl transgene Mäuse mit einer ubiquitären als auch einer leberspezifischen Expression der humanen IGF2BP-Proteine etabliert werden konnten. Während transgene Mäuse mit einer leberspezifischen Expression für alle drei IGF2BPs erhalten wurden, konnten für eine ubiquitäre Überexpression nur IGF2BP2-Tiere, jedoch mit einer unterschiedlich starken Expression, generiert und folglich analysiert werden. Als transgene Kontrolltiere dienten Mäuse, die GFP entweder ubiquitär oder leberspezifisch überexprimierten.

4.5 Phänotypische Charakterisierung der transgenen IGF2BP-Mäuse

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden auch gleichaltrige Wildtyp-Tiere untersucht, um einen möglichen Effekt des überexprimierten GFP-Proteins in den Kontrolltieren ausschließen zu können. Bei diesen Wildtyp-Mäusen handelte es sich um die nicht transgenen Geschwistertiere der verschiedenen transgenen Stämme. Eine Analyse der Verstoffwechslung von Glucose im OGTT sowie die Erfassung der Körper- und Organgewichte ergab keine signifikanten Abweichungen zwischen den transgenen GFP- und den Wildtyp-Tieren. Auf eine Darstellung der Ergebnisse wurde daher verzichtet. Ebenso erfolgte aufgrund des offensichtlich unveränderten Verhaltens der transgenen Stämme keine eingehendere Analyse der Wildtyp-Mäuse. Die transgenen GFP-Tiere dienten im weiteren Verlauf der Arbeit als Kontrolltiere.

Männliche und weibliche Wirbeltiere unterscheiden sich aufgrund des Geschlechtsdimorphismus nicht nur in den primären Geschlechtsmerkmalen, sondern z.B. auch in ihrem Erscheinungsbild, ihrem Verhalten oder der Körpergröße voneinander. Daher wurden in dieser Arbeit stets beide Geschlechter gleichermaßen untersucht, um auch geschlechtsspezifisch aussagekräftige Daten zu erhalten. Zeigten sich jedoch keine gravierenden Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den Männchen (M) und Weibchen (W) wurden im Folgenden lediglich die Summeneffekte der beiden Geschlechter dargestellt. Zusätzliche geschlechtsspezifische Daten sind dem Anhang beigefügt.

4.5.1 Untersuchungen zum Wachstum

4.5.1.1 Analyse der Körper- und Organgewichte

Anhand der bereits beschriebenen Funktionen von IGF2BP2 wird deutlich, dass das Protein in die Regulation von Wachstumsprozessen involviert ist. Es wurde gezeigt, dass IGF2BP2 zum einen die Translation des embryonalen Wachstumsfaktors IGF2 fördert [Dai *et al.* 2011] und zum anderen durch das Zusammenspiel mit HMGA2 wachstumsregulierende Prozesse beeinflusst [Li *et al.* 2012]. Dabei konnte der in HMGA2-defizienten Mäusen beobachtete Zwergenphänotyp auf ein Fehlen von IGF2BP2 zurückgeführt werden [Brants *et al.* 2004, Li *et al.* 2012].

Um einen möglichen Wachstumseffekt der IGF2BP-Tiere erfassen zu können, wurden sowohl die Körper- als auch Organgewichte der verschiedenen Mäuse hauptsächlich im Alter von 1 und ½ Jahr, aber auch von 5 Tage alten Jungtieren untersucht. Zur Normalisierung der Gewichtsdaten wurden diese auf die individuelle Länge der Tibia (Schienbeinknochen) bezogen. Eine Vermessung der Tibia der 5 Tage alten Tiere wurde aufgrund der noch nicht gefestigten Knochenstruktur und der damit verbundenen erhöhten Fehleranfälligkeit der Messungen nicht durchgeführt.

Tabelle 10:
Messwerte für die
Tibiallänge sowie das
Körpergewicht der
UbC-Mäuse

* - $p < 0,05$;
** - $p < 0,01$;
*** - $p < 0,001$

Die Signifikanzen
beziehen sich jeweils
auf den UbC-Kontroll-
stamm.

Anzahl der untersuch-
ten Tiere pro Stamm:

5 Tage:
 $n_M = 9 - 12$, $n_W = 9 - 12$

½ bzw. 1 Jahr:
 $n_M = 11 - 24$,
 $n_W = 11 - 29$

Körpergewichte und Tibiallänge der UbC-Mäuse				
5 Tage				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
Körper g	M	3,31 ± 0,11	3,62 ± 0,11	4,08 ± 0,05 ***
	W	3,27 ± 0,11	3,68 ± 0,09 *	3,91 ± 0,11 **
½ Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
Tibiallänge (TL) mm	M	18,34 ± 0,04	18,46 ± 0,11 *	19,08 ± 0,10 ***
	W	18,17 ± 0,06	18,36 ± 0,07	18,75 ± 0,08 ***
Körper/TL g/mm	M	1,64 ± 0,03	1,64 ± 0,03	1,72 ± 0,03
	W	1,32 ± 0,03	1,33 ± 0,02	1,41 ± 0,02 *
1 Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
Tibiallänge (TL) mm	M	18,47 ± 0,05	18,68 ± 0,04 **	19,21 ± 0,07 ***
	W	18,44 ± 0,04	18,84 ± 0,05 ***	19,03 ± 0,08 ***
Körper/TL g/mm	M	1,76 ± 0,03	1,84 ± 0,04	1,86 ± 0,02 **
	W	1,49 ± 0,03	1,52 ± 0,03	1,63 ± 0,02 ***

Bereits im Alter von 5 Tagen konnte festgestellt werden, dass die UbC-IGF2BP2-überexprimierenden Tiere ein signifikant erhöhtes Körpergewicht aufwiesen (Tabelle 10). Dieser Größeneffekt war auch mit zunehmendem Alter noch nachweisbar. In den 6 Monate alten Mäusen zeigte sich in erster Linie ein signifikantes Längenwachstum der Tibia. Eine zusätzlich auch signifikante Zunahme des relativen Körpergewichtes wurde nur in den Weibchen des IGF2BP2_H-Stammes beobachtet. Die stärkste Diskrepanz sowohl in der Länge der Tibia als auch im Körpergewicht wurde in den 1-jährigen Mäusen deutlich. Hier zeigten ebenso die Tiere des IGF2BP2_H-Stammes geschlechtsunabhängig die stärksten Effekte verglichen zu den Kontrollmäusen. Trotz einer Normalisierung auf die bereits signifikant verlängerte Tibia konnte zudem ein signifikanter Anstieg des Körpergewichtes beobachtet werden.

Auch die 1-jährigen Albumin-IGF2BP-Mäuse wurden hinsichtlich ihres Körpergewichtes analysiert. Nachfolgend sind die Daten aller drei leberspezifischen IGF2BP-Stämme aufgelistet.

Tabelle 11: Messwerte für die Tibiallänge sowie das Körpergewicht der leberspezifischen Alb-Mäuse im Alter von 1 Jahr

* - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den Alb-Kontrollstamm.
Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 9 - 14$, $n_W = 11 - 12$

Körpergewichte und Tibiallänge der Alb-Mäuse					
		Kontrolle	IGF2BP1	IGF2BP2	IGF2BP3
Tibiallänge (TL) mm	M	18,42 ± 0,05	18,37 ± 0,06	18,36 ± 0,09	18,38 ± 0,05
	W	18,25 ± 0,08	18,55 ± 0,09 *	18,57 ± 0,11 *	18,66 ± 0,06 ***
Körper/TL g/mm	M	1,81 ± 0,03	1,73 ± 0,03	1,70 ± 0,04	1,75 ± 0,03
	W	1,43 ± 0,03	1,52 ± 0,04	1,45 ± 0,04	1,60 ± 0,02 ***

Interessanterweise konnte nur für alle weiblichen IGF2BP-Tiere eine signifikant verlängerte Tibia festgestellt werden (Tabelle 11). Die Weibchen des Alb-IGF2BP3-Stammes waren zudem signifikant schwerer. In den männlichen Tieren waren keine Unterschiede zum Kontrollstamm ersichtlich.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass eine in den transgenen Mäusen ubiquitär gesteigerte IGF2BP2-Expression zu einem verstärkten Längenwachstum der Tibia sowie zu einer signifikanten Körpergewichtszunahme führt. Eine nur leberspezifische Überexpression des IGF2BP2- sowie auch des IGF2BP1-Proteins resultiert in einem gesteigerten Längenwachstum der Tibia, aber nicht in einem erhöhten Körpergewicht. Dahingegen erfolgt sowohl ein Anstieg der Tibialänge als auch des Gewichtes bei einer verstärkten Expression von IGF2BP3 in der Leber. Das bedeutet, dass die vor allem in den UbC-IGF2BP2_H-Tieren gesehenen starken Effekte in Ansätzen auch bei einer leberspezifischen Überexpression aller IGF2BPs beobachtet werden konnten.

Die signifikante Zunahme der Knochenlänge und des Körpergewichtes warf nun die Frage auf, ob auch die Organe der UbC-IGF2BP2-Tiere von diesem Größenzuwachs betroffen sind. Aufgrund der Größe der Jungtiere beschränkte sich deren Analyse auf die Entnahme der eindeutig erkennbaren Organe wie Leber, Herz und Gehirn. Während die Gewichtsdaten der adulten Tiere auf die individuelle Tibialänge (TL) berechnet wurden, erfolgte bei den Jungtieren eine Normalisierung auf das Körpergewicht (KGW). Zum besseren Vergleich der Stämme wurden die normalisierten Daten der Gewichte prozentual zum Kontrollstamm berechnet und für die adulten Tiere grafisch dargestellt. Die dazugehörigen Tabellen der absoluten und relativen Gewichtsdaten befinden sich im Anhang.

Tabelle 12: Prozentuale Veränderungen der Organgewichte 5 Tage alter UbC-Tiere

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$;
 *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Kontrolltiere ($\cong 0\%$). Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 9 - 12$, $n_W = 9 - 12$

Prozentuale Gewichtsveränderungen				
		Leber/KGW	Herz/KGW	Gehirn/KGW
IGF2BP2_L %	M	4,68 ± 2,43	0,18 ± 3,44	-9,97 ± 2,69 **
	W	7,79 ± 2,19 **	4,72 ± 4,35	-12,36 ± 1,59 ***
IGF2BP2_H %	M	-4,89 ± 2,15	-4,58 ± 2,33	-4,10 ± 1,52
	W	-4,81 ± 2,25	-4,75 ± 2,31	-1,51 ± 2,44

Bereits einige Tage nach der Geburt wiesen vor allem die IGF2BP2_H-Mäuse eine signifikante Erhöhung der absoluten Gewichte von Leber, Herz und Gehirn auf (siehe Anhang, Tabelle A1). Nach einer Normalisierung der Messwerte auf das ebenso signifikant erhöhte Körpergewicht der Tiere konnte dies jedoch nicht mehr beobachtet werden (Tabelle 12). Dennoch wurde ein signifikanter Zuwachs des relativen Lebergewichtes in den weiblichen IGF2BP2_L-Mäusen festgestellt sowie geschlechtsunabhängig auch eine Abnahme im relativen Gewicht des Gehirns.

Die bereits in den Jungtieren beginnenden Wachstumseffekte manifestierten sich mit zunehmendem Alter der Mäuse, wobei lediglich noch Veränderungen hin zu erhöhten Gewichtsdaten festgestellt werden konnten (Abb. 17). Die ½ Jahr alten IGF2BP2_H-Tiere wiesen geschlechtsunabhängig ein signifikant vergrößertes Herz und Gehirn sowie in den Männchen eine Zunahme des Nierengewichtes auf. In dem gleichaltrigen IGF2BP2_L-Stamm konnte ein signifikanter Größenzuwachs lediglich im Gehirn der männlichen Tiere festgestellt werden, welcher sich im Alter von 1 Jahr auch in den Weibchen zeigte.

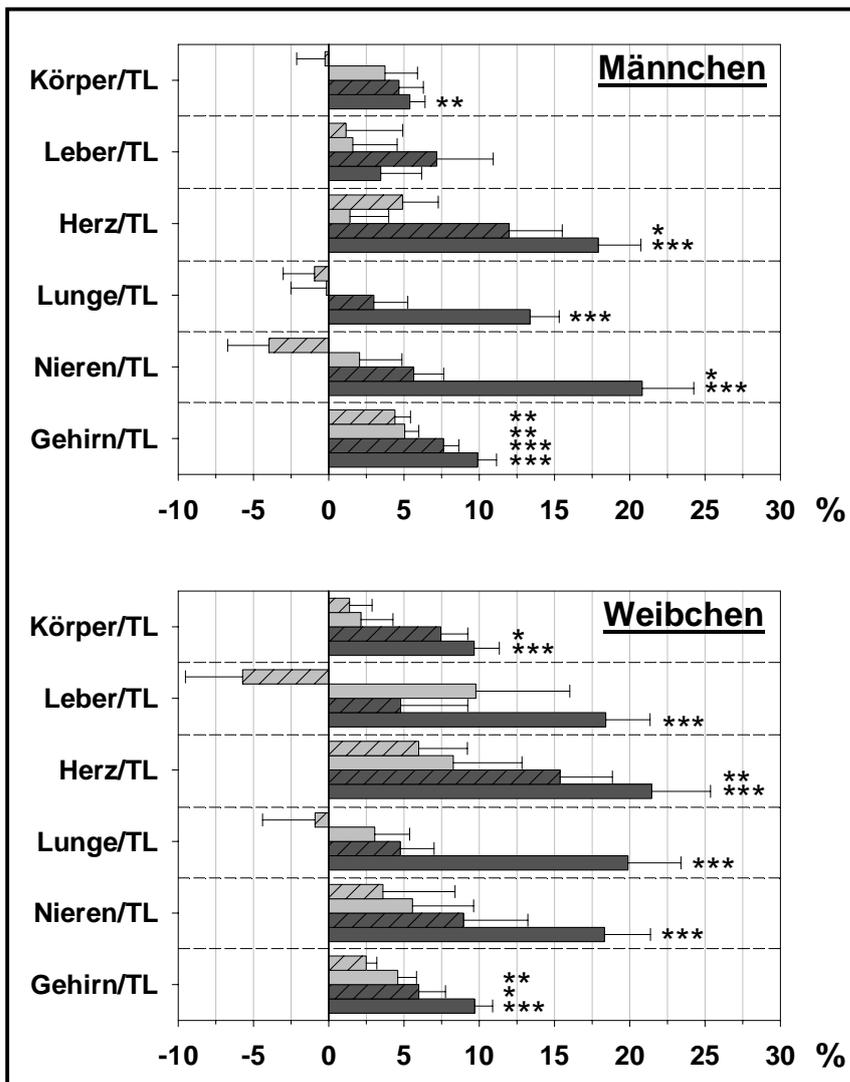


Abb. 17: Prozentuale Gewichtsveränderungen der 1/2- und 1-jährigen UbC-Mäuse

Gezeigt sind die prozentualen Unterschiede in den relativen Gewichtsdaten der beiden IGF2BP2-Stämme verglichen zum Kontrollstamm ($\pm 0\%$). Die hellgrauen Balken repräsentieren die Ergebnisse der IGF2BP2_L-, die dunkelgrauen die der IGF2BP2_H-Tiere (■). Die Schraffierung der Balken ermöglicht eine Unterscheidung der 1/2-jährigen (▨ bzw. ▩) von den 1-jährigen Tieren (□ bzw. ■).

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den Kontrollstamm.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter: $n_M = 9 - 26$, $n_W = 10 - 29$

Die stärksten Effekte waren in den 1-jährigen Tieren vor allem in den Mäusen des IGF2BP2_H-Stammes zu beobachten. Außer für die Leber der Männchen konnte erstaunlicherweise für alle untersuchten Organe ein signifikant vergrößertes Gewicht unabhängig vom Geschlecht der Tiere nachgewiesen werden. Die größten prozentualen Gewichtsanstiege zeigten sich geschlechtsunabhängig im Herzen und den Nieren sowie in der Lunge der weiblichen Tiere verglichen mit den Kontrollmäusen. Dieser Größenzuwachs betrug ca. 20%. Im Vergleich dazu stieg das relative Körpergewicht der 1-jährigen IGF2BP2_L-Tiere nur um durchschnittlich 3% und das der Mäuse des IGF2BP2_H-Stammes um durchschnittlich 7,5% an. Der beobachtete Wachstumseffekt schien also nicht proportional alle Organe gleichermaßen zu beeinflussen. Das zeigte sich auch anhand der Berechnung des prozentualen Anteils der einzelnen Organe am individuellen Körpergewicht. Diese ergab in dem 1-jährigen IGF2BP2_H-Stamm geschlechtsunabhängig einen signifikanten Zuwachs des Herz-, Lungen- und Nierengewichtes sowie ein vergrößertes Lebergewicht in den weiblichen Tieren. Das Gehirn machte bei allen transgenen Stämmen ca. 1,5% vom Gesamtkörpergewicht aus und unterlag somit einem zum steigenden Körpergewicht der IGF2BP2-Tiere proportionalem Wachstum.

Um einen visuellen Eindruck der Körpergewichtszunahme sowie der absoluten Vergrößerung des Gehirns und der verlängerten Tibia zu erhalten, sind in der Abb. 18 fotografische Aufnahmen der genannten Organe einer männlichen und einer weiblichen Maus des IGF2BP2_H-Stammes im Vergleich zu einer geschlechtsspezifischen Kontrollmaus gezeigt.

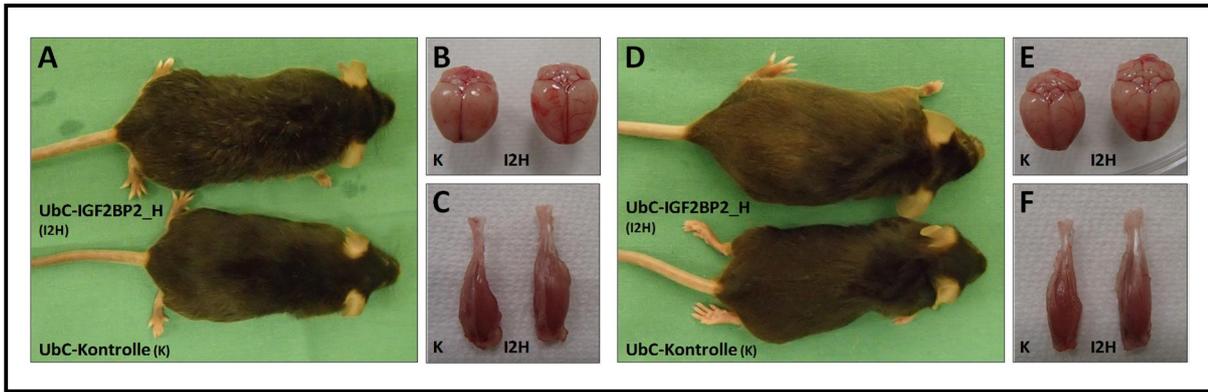


Abb. 18: Visueller Größenvergleich der UbC-Mäuse im Alter von 1 Jahr

Abgebildet sind je eine (A) männliche und (D) weibliche Maus des IGF2BP2_H-Stammes (oberes Tier) verglichen mit den entsprechenden Kontrollen (unteres Tier). Weiterhin wurden die Gehirne (B und E) sowie die Unterschenkel der Tiere (C und F) zum Vergleich nebeneinandergelegt. Der isolierte Unterschenkel repräsentiert dabei die Länge des Schienbeinknochens (Tibia).

Zusammenfassend kann von einem starken Größenzuwachs, verursacht durch die transgene Überexpression des humanen IGF2BP2, gesprochen werden. Dieser war bereits kurz nach der Geburt der Tiere nachweisbar. Scheinbar handelt es sich um einen generellen Wachstumseffekt, da neben dem Körpergewicht auch die inneren Organe vergrößert waren, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß.

Die 1-jährigen Alb-Stämme wurden ebenso hinsichtlich ihrer Organgewichte genauer untersucht, um herauszufinden, ob auch eine vornehmlich auf die Leber beschränkte Überexpression der IGF2BPs das Wachstum der Organe beeinflusst.

Eine leberspezifische Überexpression von IGF2BP2 führte zu einer signifikanten Zunahme des Gehirngewichtes (siehe Anhang, Abb. A4). Während im IGF2BP1-Stamm keine Veränderungen der Organgewichte festgestellt werden konnten, zeigten die männlichen Tiere des Alb-IGF2BP3-Stammes interessanterweise eine signifikant leichtere Leber im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ein genereller Unterschied im Gewicht, mit Ausnahme der Leber der IGF2BP3-Männchen, sowie im Aussehen der Leber, dem Hauptorgan der transgenen Proteinsynthese in den Albumin-Tieren, wurde jedoch nicht festgestellt. Daher kann bei einer nur leberspezifischen Überexpression der einzelnen Mitglieder der IGF2BP-Familie nicht allgemein von einem Wachstumseffekt gesprochen werden.

4.5.1.2 Messung der Menge Insulinähnlicher Wachstumsfaktoren (IGFs)

Eine mögliche Ursache des in den UbC-Mäusen beobachteten Wachstumsphänotyps könnte eine veränderte Menge an Wachstumshormonen und damit verbunden eine mögliche Dysregulation dieser Hormone sein. Bedingt durch das gesteigerte IGF2BP-Proteinvorkommen und die bereits mehrfach beschriebene Bindung der IGF2BPs an den 5'UTR der IGF2 *leader* 3-mRNA [Nielsen *et al.* 1999, Liao *et al.* 2005, Dai *et al.* 2011], wäre eine gesteigerte Synthese dieses Wachstumsfaktors auch in den transgenen IGF2BP-Mäusen durchaus denkbar. Eine Messung der Mengen von IGF1 und IGF2 erfolgte im Serum und im Lebergewebe der Tiere.

In den UbC-IGF2BP2-Mäusen konnten keine Veränderungen in der Serumkonzentration von IGF1 sowie IGF2 bzw. in der Konzentration von IGF2 im Lebergewebe nachgewiesen werden (Abb. 19, A). Lediglich die IGF2BP2_H-Männchen wiesen eine signifikant verminderte IGF1-Menge im Serum auf.

Trotz fehlender auffälliger Wachstumseffekte in den 1-jährigen Alb-IGF2BP-Tieren sowie zur Prüfung der bestehenden wissenschaftlichen Befunde wurde auch in diesen Tieren die Menge der IGFs bestimmt. In den drei verschiedenen Alb-IGF2BP-Stämmen konnten weder Unterschiede in der Menge der IGFs im Serum noch in der IGF2-Konzentration in der Leber festgestellt werden (Daten für Alb-IGF2BP2 siehe Abb. 19, B und für Alb-IGF2BP1/3 siehe Anhang, Abb. A6).

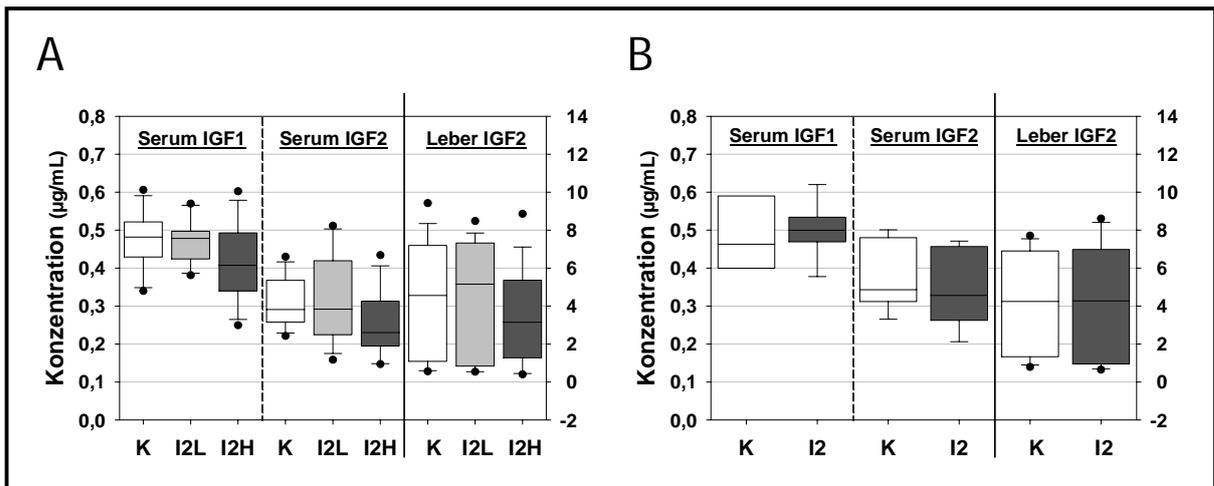


Abb. 19: Konzentration der IGFs im Serum und der Leber 1-jähriger IGF2BP2-Mäuse

Dargestellt sind die Konzentrationen von IGF1 und IGF2 im Serum bzw. der Leber von Tieren des (A) UbC-IGF2BP2_L- (I2L) und UbC-IGF2BP2_H-Stammes (I2H) sowie (B) Alb-IGF2BP2-Stammes (I2) verglichen mit den jeweiligen UbC- bzw. Alb-Kontrolltieren (K). Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: Serum: $n_M = 4 - 6$, $n_W = 4 - 6$; Leber: $n_M = 7 - 9$, $n_W = 7 - 8$

In der Literatur wurden bereits vergleichbare Werte für IGF1 im Bereich von 0,2 - 0,9 µg/mL im Serum beschrieben [Rogler *et al.* 1994, Blackburn *et al.* 1997, Yakar *et al.* 1999, Zaina *et al.* 2003, Dai *et al.* 2015]. Für den vornehmlich embryonalen Wachstumsfaktor IGF2 wurden in adulten Mäusen folglich geringere Serumkonzentrationen im Bereich von 0,012 - 0,050 µg/mL gemessen [Rogler *et al.* 1994, Blackburn *et al.* 1997, Devedjian *et al.* 2000, Zaina *et al.* 2003]. In den in dieser Arbeit untersuchten transgenen Mäusen konnte eine verminderte IGF2-Konzentration im Vergleich zur IGF1-Menge im Serum bestätigt werden. Die jedoch auch in den transgenen Kontrolltieren im Vergleich zu den Literaturangaben scheinbar erhöhte IGF2-Menge beruht vermutlich neben dem unterschiedlichen Alter der analysierten Tiere vornehmlich auf deren abweichenden genetischen Hintergrund. So konnten in einem weiteren Mausstamm IGF1-Konzentrationen von über 1 µg/mL im Serum der Tiere nachgewiesen werden [Ueki *et al.* 2000]. Der Einfluss der Transgenität der Mäuse spielt dabei eine entscheidende Rolle, sodass Abweichungen zu den üblichen Referenzwerten durchaus möglich sind.

Der Wachstumseffekt der UbC-IGF2BP2-Tiere scheint nicht auf einer Veränderung der Menge der IGF-Wachstumsfaktoren zu basieren. Weder eine leberspezifische noch ubiquitäre Überexpression der IGF2BPs führte zu einer signifikanten Veränderung der IGF2-Konzentration im Serum oder der Leber der Mäuse. Vor allem für IGF2BP2 bedeutet das, dass das Protein vermutlich keine endokrinen oder parakrinen Wirkungen auf die Konzentration der IGF-Proteine im adulten Organismus hat.

4.5.2 Ermittlung des Energieumsatzes

Da der Energieumsatz das Körpergewicht entscheidend beeinflusst und der Größenzuwachs ausschließlich bei den ubiquitär IGF2BP2-überexprimierenden Tieren beobachtet wurde, wurden im Folgenden nur die UbC-Stämme hinsichtlich ihrer Energieaufnahme und -abgabe näher untersucht.

4.5.2.1 Erfassung der Nahrungsaufnahme

Eine langfristig den normalen Grundumsatz übersteigende Energiezufuhr führt im Allgemeinen zur Einlagerung der nicht benötigten Energie z.B. in Form von Fett und somit zu einem Gewichtszuwachs. Eine vermehrte Nahrungsaufnahme könnte somit auch eine mögliche Ursache für den beobachteten Wachstumsphänotyp der Tiere sein. Aus diesem Grund wurden die Futter- und Wasseraufnahme der transgenen UbC-IGF2BP2-Mäuse über einen Zeitraum von 2 - 4 Wochen analysiert.

Eine Betrachtung der absoluten Mengen an aufgenommener Nahrung ließ zunächst keine Unterschiede zwischen den 1-jährigen Stämmen erkennen (siehe Anhang, Tabelle A6). Alle Tiere nahmen täglich ca. 3 - 4 g Futter und ca. 4,7 mL Wasser zu sich. Aussagekräftiger als die absoluten Messwerte ist eine Berechnung der Nahrungszufuhr normalisiert auf das individuelle Körpergewicht der Tiere (Abb. 20). Dabei wurde deutlich, dass die Mäuse der beiden UbC-IGF2BP2-Stämme eine signifikant reduzierte Menge an Futter pro Gramm Körpergewicht verglichen zu den Kontrolltieren zu sich nahmen. Ebenso konnte eine verminderte relative Wasseraufnahme beobachtet werden.

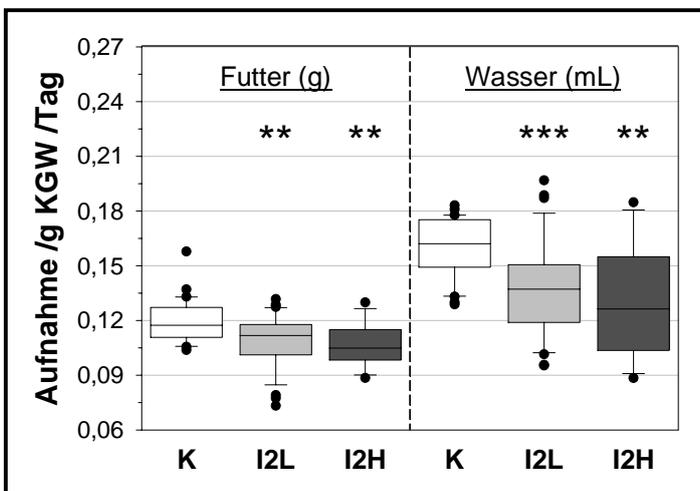


Abb. 20: Tägliche Nahrungsaufnahme der UbC-Mäuse im Alter von 1 Jahr

Dargestellt sind die täglichen auf das Körpergewicht (KGW) normierten Mengen an Futter und Wasser von Tieren des IGF2BP2_L- (I2L) sowie des IGF2BP2_H-Stammes (I2H) verglichen mit den UbC-Kontrolltieren (K).

** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den UbC-Kontrollstamm.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 3 - 7$, $n_W = 1 - 9$

Die Ursache der Körpergewichtszunahme der UbC-IGF2BP2-Tiere scheint nicht in einer vermehrten Nahrungszufuhr begründet. Im Gegenteil, die Berechnung der relativen Nahrungsmenge bezogen auf das Körpergewicht ergab sogar, dass die größeren IGF2BP2-Mäuse im Vergleich zu den kleineren Kontrollen signifikant weniger Nahrung aufnahmen.

4.5.2.2 Analyse der Ausscheidungen

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass die Ursache des Wachstumseffektes weder durch eine veränderte Menge an IGFs noch eine vermehrte Energiezufuhr bedingt ist. Erstaunlicherweise nahmen die IGF2BP2-Tiere weniger Futter pro Gramm Körpergewicht zu sich und waren dennoch

signifikant größer. Zur Klärung dieser Frage wurden daher weitere Parameter, z.B. den Energieumsatz betreffend, in Betracht gezogen. Um einen groben Einblick in den Grundumsatz der Tiere zu erhalten bedarf es nicht nur einer Erfassung der zugeführten Energie, sondern auch des vom Körper wieder ausgeschiedenen und damit ungenutzten Anteils dieser Energie. Eine geeignete und unkomplizierte Methode zur Bestimmung des Energiegehaltes der zuvor gesammelten festen Ausscheidungen ist deren kontrollierte und vollständige Verbrennung in einer sogenannten kalorimetrischen Bombe.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass der Kot der IGF2BP2_H-Mäuse einen signifikant erhöhten absoluten Energieinhalt aufwies (siehe Anhang, Tabelle A8). Die Menge an täglich ausgeschiedenem Kot unterschied sich nicht signifikant zwischen den Stämmen. Unter Einbeziehung dieser unveränderten Kotmenge sowie des Körpergewichtes der Mäuse kam es jedoch zu keiner vermehrten täglichen Ausscheidung an Energie bei den IGF2BP2_H-Tieren verglichen mit den Kontrollen.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die verminderte Energieaufnahme und den erhöhten Energiegehalt des Kotes verbunden mit der Wachstumszunahme der Tiere könnte möglicherweise ein veränderter Energieumsatz einhergehend mit Veränderungen des Stoffwechsels sein.

4.5.2.3 Berechnung des Energieumsatzes

Basierend auf den täglich aufgenommenen und ausgeschiedenen Energiemengen wurde eine grobe Abschätzung des Energieumsatzes der transgenen Tiere getroffen (Abb. 21).

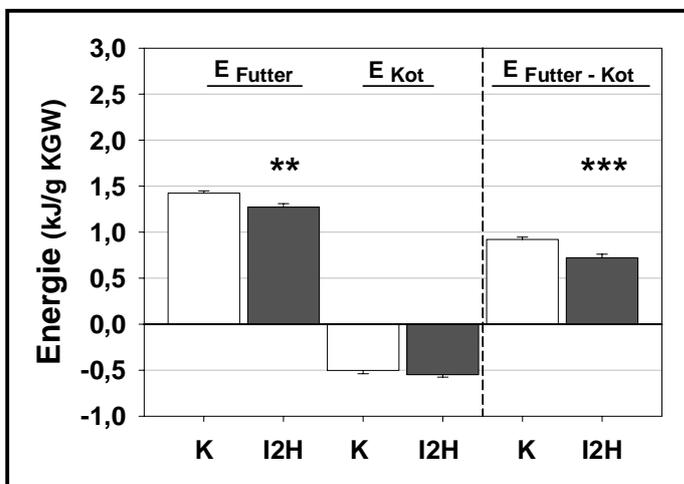


Abb. 21: Täglicher Energieumsatz der UbC-Mäuse im Alter von 1 Jahr

Abgebildet sind die relativen Messwerte der pro Gramm Körpergewicht (KGW) berechneten Energieinhalte (E) des aufgenommenen Futters, des abgegebenen Kotes und dem Betrag dieser beiden Werte, welcher den täglichen Energieumsatz repräsentiert. Dabei wurden die Tiere des IGF2BP2_H-Stammes (I2H) mit den Kontrolltieren (K) verglichen, auf die sich auch die Signifikanzen beziehen. ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

Da die UbC-IGF2BP2_H-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren pro Gramm Körpergewicht weniger Energie aufnehmen, aber gleich viel Energie über den Kot ausscheiden, scheinen sie einen signifikant geringeren Energieumsatz zu besitzen.

Der Energieumsatz ist allgemein von verschiedenen Faktoren abhängig, wie z.B. von der körperlichen Aktivität oder vom Körperbau eines Individuums, aber auch von äußeren Faktoren wie der Umgebungstemperatur. Da die Haltung aller Tiere stets unter standardisierten Bedingungen erfolgte sind die äußeren Faktoren zunächst zu vernachlässigen. Ebenso kann eine Beeinflussung durch ein unterschiedliches Alter oder Geschlecht der Tiere ausgeschlossen werden. Weitere wichtige Größen, von denen der Energieumsatz grundlegend abhängig ist, sind das Körpergewicht sowie die Körpergröße. Diese spielen eine entscheidende Rolle in der Thermoregulation und damit für den

Energiebedarf eines Organismus. Es ist schon lange bekannt, dass größere Tiere eine im Verhältnis zum Volumen geringere Oberfläche aufweisen als kleinere Tiere und dadurch per se einen geringeren Energiebedarf haben.

Daher stellte sich nun die Frage, ob und in welchem Umfang die Vergrößerung des Körpergewichtes der UbC-IGF2BP2-Tiere solch eine nennenswerte Veränderung im Energiehaushalt bedingt. Neben der signifikanten Körpergewichtszunahme (\cong Oberfläche) konnte mithilfe der Scheitel-Steiß-Länge der transgenen Tiere auch eine signifikant erhöhte Körperoberfläche (\cong Volumen) berechnet werden (siehe Anhang, Tabelle A10). Das daraus resultierende Verhältnis von Oberfläche und Volumen war in den IGF2BP2-Tieren folglich signifikant größer verglichen zu den Kontrolltieren. Das bedeutet, dass Körpergewicht und Körperoberfläche zwar deutlich vergrößert sind, aber das Verhältnis der beiden Größen wesentlich günstiger ausfällt. Die IGF2BP2-Tiere verlieren also über ihre relativ gesehen kleinere Oberfläche signifikant weniger Energie in Form von z.B. Wärme als es bei den kleineren Kontrollmäusen der Fall ist. Die Kontrolltiere müssen daher diesen höheren Energieverlust durch eine vermehrte Nahrungsaufnahme und Energieproduktion wieder ausgleichen. Das Verhältnis von Energieumsatz zur Körperoberfläche zeigt folglich auch eine signifikante Verminderung in der täglich aufgewendeten Energiemenge pro Körperoberfläche in den IGF2BP2-überexprimierenden Tieren.

Eng mit dem Energieumsatz und der Aktivität des Stoffwechsels ist auch die Körpertemperatur verbunden. Ihre Aufrechterhaltung ist bei homoiothermen Tieren energetisch sehr aufwendig. Die Körperkerntemperatur der UbC-IGF2BP2_H- sowie der Kontrollmäuse wurde rektal bestimmt. Beide Stämme wiesen geschlechtsunabhängig eine durchschnittliche Körperkerntemperatur von ca. 37,4 °C auf (siehe Anhang, Tabelle A11). Eine signifikant verminderte Körpertemperatur war jedoch bei den Männchen, nicht aber bei den Weibchen festzustellen.

Aufgrund der bestehenden physikalischen Gesetzmäßigkeiten bezüglich des Verhältnisses von Körperoberfläche und -volumen kann geschlussfolgert werden, dass der signifikant verminderte Energieumsatz der UbC-IGF2BP2_H-Tiere und damit auch die reduzierte Nahrungsaufnahme nicht die Ursache, sondern lediglich eine Folge des starken Wachstumseffektes sind.

4.5.3 Regulation der Blutglucosekonzentration

Die Menge an Glucose im Blut wird streng kontrolliert und innerhalb eines definierten Bereiches konstant gehalten, um eine kontinuierliche Energieversorgung der Körperzellen gewährleisten zu können. Eine dauerhaft abweichende Glucosekonzentration im Blut gibt erste Hinweise auf eine fehlerhafte Kontrolle und mögliche pathologische Folgen, wie z.B. die Entstehung eines T2DM. Da das Risiko an dieser Form des Diabetes zu erkranken erst mit fortgeschrittenem Alter merklich steigt, wurden die nachfolgenden Untersuchungen an Mäusen im Alter von ½ sowie 1 Jahr durchgeführt.

4.5.3.1 Blutglucose- und HbA1c-Werte

In Abb. 22 sind die basalen Blutglucosewerte der UbC-Stämme in verschiedenen Altersstadien dargestellt. Die Erhebung der Daten erfolgte für alle Stämme stets zum gleichen Zeitpunkt, um einen Einfluss des Tag-Nacht-Rhythmus sowie damit verbunden der Nahrungsaufnahme zu vermeiden.

Im Alter von 5 Tagen, 7 Wochen sowie 3 Monaten konnte keine signifikante Abweichung des basalen Blutglucosegehaltes zwischen den UbC-IGF2BP2- und den Kontrolltieren nachgewiesen werden. Bei den ½-jährigen Mäusen zeichnete sich jedoch eine signifikant verminderte Glucosekonzentration im IGF2BP2_H-Stamm ab, welche im Alter von 1 Jahr nicht mehr nachweisbar war.

Zusammenfassend wurde deutlich, dass vor allem die Tiere des IGF2BP2_H-Stammes in nahezu allen untersuchten Altersstadien einen tendenziell oder sogar signifikant geringeren Glucosegehalt im Blut aufwiesen verglichen zum Kontrollstamm.

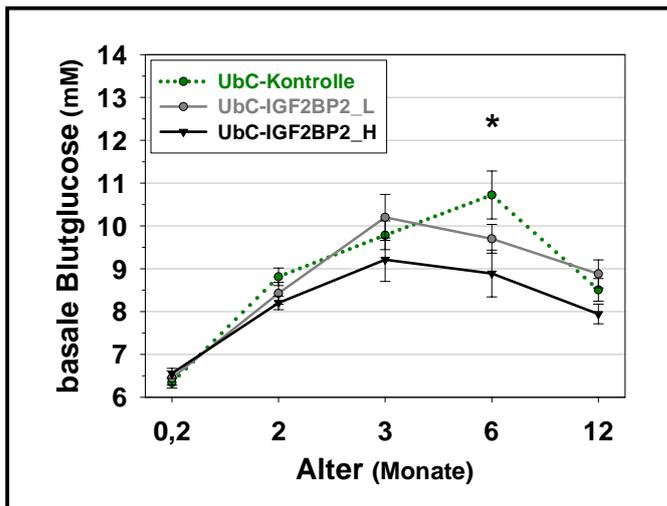


Abb. 22: Entwicklung der basalen Blutglucosewerte der UbC-Mäuse mit zunehmendem Alter

Gezeigt sind die Blutglucosewerte der unbehandelten Tiere im Alter von 5 Tagen (~ 0,2 M, M-Monate), 7 Wochen (~ 2 M) sowie ¼, ½ und 1 Jahr (3, 6 und 12 M). * - $p < 0,05$ Die Signifikanz ist farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und bezieht sich auf den UbC-Kontrollstamm. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter: $n_M = 4 - 26$ (Ø 10 - 12), $n_W = 4 - 26$ (Ø 9 - 13)

Eine eindeutigere und von der Nahrungszufuhr weitestgehend unabhängige Methode den basalen Blutglucoseverlauf zu erfassen stellt die Messung des glykierten Hämoglobins, kurz HbA1c, dar. Dabei bestimmt die Menge der Glucose im Blut das Ausmaß der Glykierung. Der HbA1c-Wert lässt Rückschlüsse auf die Höhe der Blutglucosekonzentration der letzten 8 - 12 Wochen zu und ist daher ein zuverlässiger Wert in der Langzeitanalyse von Störungen im Glucosestoffwechsel.

Tabelle 13: Prozentualer Anteil an glykiertem Hämoglobin (HbA1c) in UbC-Tieren im Alter von ½ und 1 Jahr

* - $p < 0,05$ Die Signifikanz bezieht sich auf den UbC-Kontrollstamm.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter: $n_M = 4 - 9$, $n_W = 3 - 12$

HbA1c (%)		
Stamm	½ Jahr	1 Jahr
UbC-Kontrolle	3,11 ± 0,33	4,65 ± 0,34
UbC-IGF2BP2_L	3,75 ± 0,69	4,13 ± 0,36
UbC-IGF2BP2_H	2,99 ± 0,31	3,57 ± 0,36 *

Die signifikant verminderte Blutglucosekonzentration im Alter von ½ Jahr (siehe Abb. 22) resultierte nicht in einem reduzierten HbA1c-Wert (Tabelle 13). Es konnte jedoch eine signifikante Verminderung dieses Blutglucoselangzeitwertes in den 1-jährigen IGF2BP2_H-Tieren gemessen werden.

Schlussfolgernd lässt sich anhand der gemessenen Blutglucose- und HbA1c-Werte keine allgemeingültige Aussage über greifbare Veränderungen treffen. Ein Trend zu verringerten Basalwerten und einem verminderten HbA1c-Wert war jedoch in den ubiquitär IGF2BP2-überexprimierenden Tieren ersichtlich.

4.5.3.2 Oraler Glucosetoleranztest (OGTT)

Die Reaktion des Körpers auf eine definierte Glucosemenge wurde im sogenannten oralen Glucosetoleranztest (OGTT) abgebildet. Dabei wird getestet, ob die oral zugeführte Glucosebelastung durch das Zusammenspiel von Glucose, Insulin und der peripheren Organe adäquat verstoffwechselt werden kann.

Zu Beginn der Durchführung des OGTT wurden die Nüchtern-Blutglucosewerte der verschiedenen transgenen Stämme gemessen. Ein Vorteil der Nüchtern-Blutglucose liegt in der besseren Vergleichbarkeit der Werte, da diese zuvor nicht durch die Aufnahme von Futter beeinflusst worden sind.

Tabelle 14:
Blutglucosewerte der UbC- und Alb-IGF2BP-Mäuse nach 6-stündigem Fasten

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

Die Signifikanzen beziehen sich stets auf den zugehörigen Kontrollstamm.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter:

UbC: $n_M = 11 - 24$, $n_W = 12 - 29$

Alb: $n_M = 11 - 17$, $n_W = 11 - 14$

M - Männchen

W - Weibchen

'---' - nicht analysiert

Nüchtern-Blutglucose (mM) der UbC-Mäuse			
Stamm		½ Jahr	1 Jahr
UbC-Kontrolle	M	10,2 ± 0,48	10,3 ± 0,32
UbC-IGF2BP2_L		10,3 ± 0,48	10,2 ± 0,41
UbC-IGF2BP2_H		10,9 ± 0,31	10,0 ± 0,34
UbC-Kontrolle	W	8,0 ± 0,40	7,3 ± 0,19
UbC-IGF2BP2_L		7,8 ± 0,37	7,7 ± 0,29
UbC-IGF2BP2_H		8,9 ± 0,45	8,3 ± 0,23 **
Nüchtern-Blutglucose (mM) der Alb-Mäuse			
Stamm		½ Jahr	1 Jahr
Alb-Kontrolle	M	10,9 ± 0,40	9,4 ± 0,54
Alb-IGF2BP1		---	8,5 ± 0,42
Alb-IGF2BP2		10,2 ± 0,56	10,1 ± 0,44
Alb-IGF2BP3		---	9,3 ± 0,52
Alb-Kontrolle	W	7,8 ± 0,31	7,5 ± 0,30
Alb-IGF2BP1		---	6,6 ± 0,31 *
Alb-IGF2BP2		7,4 ± 0,43	8,3 ± 0,44
Alb-IGF2BP3		---	6,9 ± 0,21

Im Allgemeinen waren die Nüchtern-Blutglucosewerte der Weibchen geringer im Vergleich zu denen der Männchen (Tabelle 14). In den männlichen Tieren konnte weder in den UbC- noch in den Alb-Stämmen eine Abweichung zum jeweiligen Kontrollstamm nachgewiesen werden. In den Weibchen des UbC-IGF2BP2_H-Stammes fiel jedoch ein signifikant erhöhter Glucosegehalt und im Gegensatz dazu in den weiblichen Alb-IGF2BP1-Mäusen ein signifikant verminderter Glucosewert im Blut bei Nüchternheit der 1-jährigen Tiere auf.

Um eventuelle Veränderungen im Verlauf der Glucosewerte während des OGTT besser feststellen zu können, wurde zu jedem Zeitpunkt die Differenz des Blutglucosewertes zum Nüchternwert gebildet und diese grafisch dargestellt.

Die 6 Monate alten UbC-Tiere zeigten keine deutlich signifikanten Veränderungen in der Fähigkeit die zugeführte Glucose adäquat zu verstoffwechseln (Abb. 23). Lediglich nach 2 Stunden wiesen die Tiere des IGF2BP2_H-Stammes eine signifikant verminderte Glucosemenge im Blut auf. Der in den

jüngeren Mäusen in Ansätzen bereits gesehene Effekt vergrößerte sich mit zunehmendem Alter der Tiere immens. Beide 1-jährigen UbC-IGF2BP2-Stämme waren in der Lage die oral zugeführte Glucose ab einer 30-minütigen Testdauer wesentlich schneller aus dem Blut in die Körperzellen zu befördern im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dabei stieg zu Beginn des Tests die Glucosemenge im Blut in allen drei Stämmen gleichermaßen an. Der zwischen 15 und 30 Minuten zu beobachtende initiale Abfall der Blutglucosewerte erfolgte in beiden IGF2BP2-Stämmen jedoch wesentlich schneller als in dem Kontrollstamm. Bis zu einer Testdauer von 2,5 Stunden wiesen die 1-jährigen UbC-IGF2BP2-Mäuse zu jedem gemessenen Zeitpunkt signifikant verminderte Glucosekonzentrationen im Blut auf.

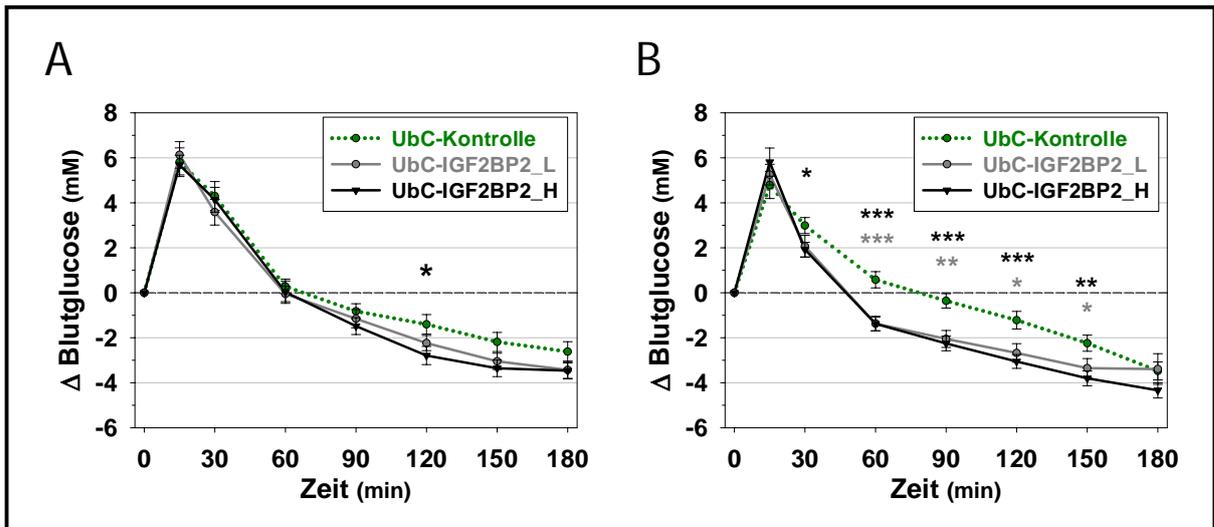


Abb. 23: Oraler Glucosetoleranztest der UbC-Stämme

Dargestellt sind die relativen Veränderungen der Blutglucosekonzentration über einen Zeitraum von 3 Stunden nach oraler Glucosegabe der (A) ½-jährigen und (B) 1-jährigen Mäuse. Der Nüchternwert diente bei der Berechnung der einzelnen Werte als Ausgangswert. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf die UbC-Kontrolltiere.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter: $n_M = 9 - 16$, $n_W = 7 - 15$

Bei der Durchführung eines OGTT mit den Alb-IGF2BP-Mäusen konnten kaum Unterschiede zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Bei allen IGF2BP-Stämmen sowie dem Kontrollstamm erfolgte eine vergleichbare Verstoffwechslung der zugeführten Glucose (siehe Anhang, Abb. A11). Eine erhöhte IGF2BP2-Expression in der Leber scheint bei einer geschlechtsunabhängigen Betrachtung keine unterschiedlichen Reaktionen im OGTT hervorzurufen, führt jedoch bei weiblichen Mäusen im Alter von 6 Monaten nach 1 Stunde zu einem erhöhten Glucosewert im Blut und bei den 1-jährigen Männchen insgesamt zu einer Verminderung der initialen und damit maximalen Glucosebelastung im Vergleich zu den Kontrollen.

Aus den Ergebnissen der Alb-IGF2BP-Tiere ließ sich schlussfolgern, dass eine vermehrte IGF2BP1- und IGF2BP3-Synthese in der Leber keine Beeinflussung des Reaktionsverhaltens auf eine oral zugeführte Glucosemenge im OGTT zur Folge hat. Jedoch kann anhand der im OGTT der UbC-IGF2BP2-Mäuse erhaltenen Daten zum ersten Mal *in vivo* eine signifikante Beeinflussung des Glucosestoffwechsels aufgrund einer ubiquitär erhöhten Proteinmenge des IGF2BP2 festgestellt werden. Damit zeigte sich

erstmalig eine physiologische Funktion des humanen IGF2BP2-Proteins im Stoffwechsel der adulten Tiere, speziell in der Regulation der Glucoseverwertung. Die Tatsache, dass eine nur leberspezifische Expression des IGF2BP2 vergleichsweise schwache bis keine Effekte zeigt, deutet auf eine Beteiligung weiterer IGF2BP2-überexprimierender Organe an dem beobachteten Phänotyp hin.

4.5.3.3 Insulinkonzentrationen während des OGTT

Mittels der Methode des OGTT kann eine allgemeine Aussage bezüglich einer möglichen Fehlregulation im Glucosestoffwechsel getroffen werden. Um jedoch Rückschlüsse auf eine genaue Ursache der festgestellten Veränderungen ziehen zu können bedarf es weiterer Analysen wie z.B. der Messung der Menge an Insulin im Blut. Stark abweichende Insulinwerte könnten auf eine Funktionsstörung des Pankreas hindeuten. Daher wurden die Konzentrationen an Insulin während des OGTT in den zu den verschiedenen Zeitpunkten des OGTT gewonnenen Serumproben mittels ELISA bestimmt.

Tabelle 15:
Insulinwerte der UbC- und Alb-IGF2BP2-Mäuse nach 6-stündigem Fasten

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter:

UbC: $n_M = 5 - 9$, $n_W = 4 - 5$

Alb: $n_M = 8 - 9$, $n_W = 5 - 9$

M - Männchen

W - Weibchen

'---' - nicht analysiert

Nüchtern-Insulin (ng/mL) der UbC-Mäuse			
Stamm		½ Jahr	1 Jahr
UbC-Kontrolle	M	1,8 ± 0,43	3,6 ± 0,84
UbC-IGF2BP2_L		1,4 ± 0,17	3,6 ± 0,42
UbC-IGF2BP2_H		1,4 ± 0,24	2,4 ± 0,31
UbC-Kontrolle	W	1,2 ± 0,16	1,5 ± 0,18
UbC-IGF2BP2_L		1,1 ± 0,39	2,0 ± 0,21
UbC-IGF2BP2_H		1,3 ± 0,16	1,7 ± 0,18
Nüchtern-Insulin (ng/mL) der Alb-Mäuse			
Stamm		½ Jahr	1 Jahr
Alb-Kontrolle	M	---	4,3 ± 0,50
Alb-IGF2BP2		---	4,5 ± 1,39
Alb-Kontrolle	W	---	3,1 ± 1,36
Alb-IGF2BP2		---	2,5 ± 0,46

Im Allgemeinen hatten die Weibchen, im Einklang mit ihren niedrigeren Blutglucosewerten (siehe Tabelle 14), auch verminderte Nüchtern-Insulinwerte im Vergleich zu den Männchen (Tabelle 15). Die Insulinkonzentrationen nach dem Fasten wiesen in beiden Altersklassen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen auf.

Zunächst wird deutlich, dass die 6 Monate alten UbC-Tiere neben einem verminderten Nüchtern-Insulinwert (siehe Tabelle 15) auch einen verminderten maximalen Anstieg der Insulinkonzentration im OGTT aufwiesen verglichen zu den doppelt so alten Tieren (Abb. 24). Eine mögliche Erklärung dafür wäre die sich üblicherweise mit zunehmendem Alter des Organismus entwickelnde Resistenz der peripheren Organe gegenüber der Wirksamkeit des Hormons Insulin. Daher benötigen die 1 Jahr alten Tiere bereits eine erhöhte Insulinmenge, um eine Aufnahme der gleichen Menge Glucose in diese Organe zu gewährleisten. Eine Analyse des Verlaufs der Insulinkonzentrationen während des OGTT zeigte in den 6 Monate alten UbC-IGF2BP2-Tieren keine Unterschiede zwischen den Stämmen. In den 1-jährigen Tieren wurde jedoch ein zu den Glucosewerten vergleichbarer Kurvenverlauf des

Insulins ermittelt. Die IGF2BP2-Stämme zeigten ein schnelleres Absinken der Insulinwerte im Blut, was verglichen zu den Kontrollen zu einer signifikant verminderten Insulinkonzentration 1 Stunde nach Glucosegabe führte. Dieser signifikante Abfall der Insulinmenge im Blut war auch nach 1,5 und 2 Stunden noch nachweisbar.

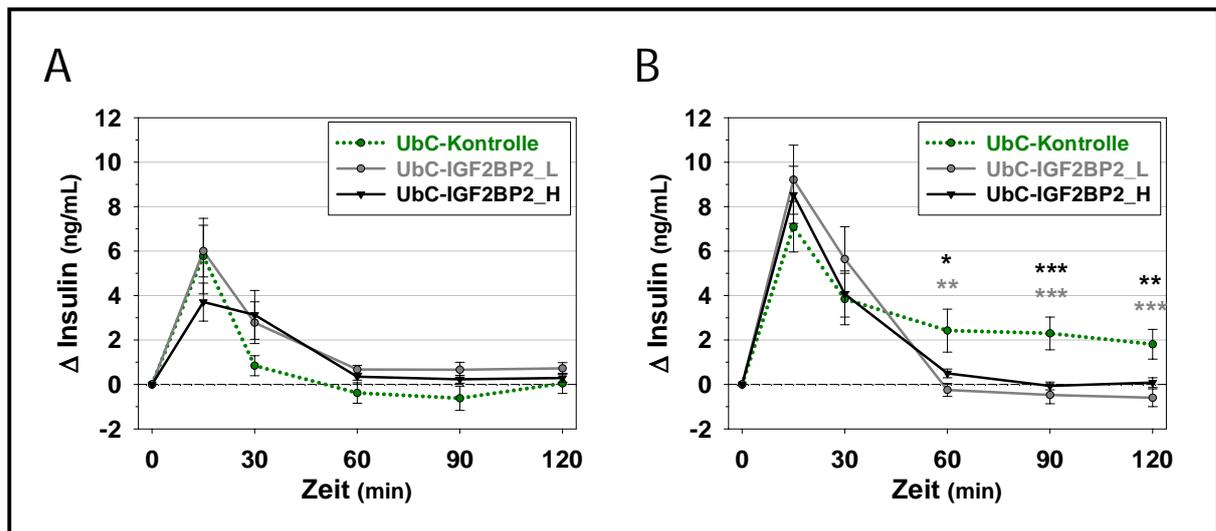


Abb. 24: Insulinkonzentrationen während des OGTT der UbC-Mäuse

Gezeigt sind die relativen Veränderungen der Insulinkonzentration im Blut über einen Zeitraum von 2 Stunden nach oraler Glucosegabe der (A) ½-jährigen und (B) 1-jährigen Tiere. Der Nüchternwert diente bei der Berechnung der einzelnen Werte als Ausgangswert. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf die Kontrolltiere.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter: $n_M = 10$, $n_W = 9 - 10$

Während des OGTT der 1-jährigen Alb-IGF2BP2-Mäuse zeigten die Insulinwerte erwartungsgemäß einen zu den Blutglucosewerten vergleichbaren Kurvenverlauf, der sich zwischen den IGF2BP2- und den Kontrolltieren nicht signifikant unterschied (siehe Anhang, Abb. A12).

Um eine Aussage bezüglich der Insulinsensitivität sprich der Wirksamkeit des ausgeschütteten Insulins treffen zu können, kann der Quotient aus gemessener Menge an Insulin und des zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Blutglucosegehaltes für jeden Zeitpunkt des OGTT gebildet werden. Die auf diese Weise berechneten Daten lieferten mehrheitlich keine signifikanten Unterschiede sowohl des 1-jährigen Alb-IGF2BP2- als auch der ½ und 1 Jahr alten UbC-IGF2BP2-Stämme verglichen mit dem jeweiligen Kontrollstamm im Verlauf eines 2-stündigen OGTT.

Mittels einer weiteren Berechnungsmethode, der sogenannten HOMA-Methode, welche auf den Glucose- und Insulinwerten im nüchternen Zustand basiert, lässt sich ebenso eine Aussage über die Insulinresistenz (HOMA-IR) sowie zusätzlich die Funktion der pankreatischen β -Zellen (HOMA-%B) treffen. Eine Kalkulation sowohl des HOMA-IR als auch des HOMA-%B wies im Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen ebenso keine signifikanten Unterschiede in den Alb-IGF2BP2- und den UbC-IGF2BP2-Mäusen in beiden untersuchten Altersgruppen auf (siehe Anhang, Tabelle A15).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Befunde bezüglich der Insulinmengen auf keine Störung des Pankreas und damit verbunden eine abweichende Ausschüttung oder Wirksamkeit dieses Hormons hindeuten. Der Regelkreis indem auf eine erhöhte Glucosezufuhr eine adäquate Abgabe von Insulin in den Blutkreislauf erfolgt scheint in den verschiedenen transgenen Stämmen normal zu funktionieren. Das wird durch das einheitliche Bild von Glucose- und Insulinverlauf im Blut während des OGTT verdeutlicht.

4.5.3.4 Intraperitonealer Insulintoleranztest (IPITT)

Eine weitere Möglichkeit die Ursache der signifikant beschleunigten Glucoseverstoffwechslung im OGTT eingehender zu analysieren bietet der intraperitoneale Insulintoleranztest (IPITT). Dabei wird die Reaktionsfähigkeit bzw. Insulinsensitivität der peripheren Organe wie Leber, Skelettmuskel und Fett getestet, indem den gefasteten Mäusen eine auf das Körpergewicht normierte Menge an Insulin intraperitoneal (i.p.) gespritzt und anschließend der Verlauf des Blutglucosewerte analysiert wird.

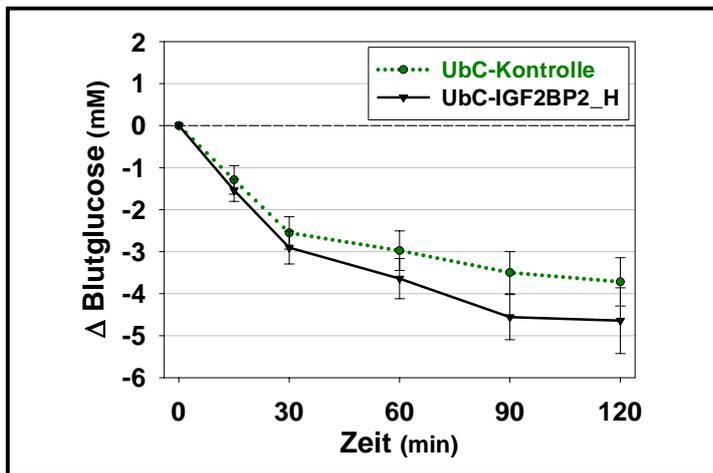


Abb. 25: Intraperitonealer Insulintoleranztest der 1-jährigen UbC-Mäuse

Dargestellt ist der Verlauf der relativen Glucosekonzentration im Blut über einen Zeitraum von 2 Stunden nach i.p.-Gabe von Insulin. Der Nüchtern-Blutglucosewert diente bei der Berechnung der einzelnen Werte als Ausgangswert.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 5 - 10$, $n_W = 4 - 15$

Die i.p. zugeführte Insulinmenge führte in den Tieren erwartungsgemäß zu einer Verminderung der Glucosekonzentration im Blut (Abb. 25). Tendenziell wiesen die UbC-IGF2BP2_H-Mäuse verglichen zu den Kontrolltieren stets verringerte Glucosewerte auf, was auf eine verbesserte Insulinsensitivität der peripheren Organe in Bezug auf die Glucoseaufnahme hindeuten könnte. Im Verlauf des IPITT konnte jedoch keine signifikant veränderte Reaktion auf das von außen zugeführte Insulin zwischen den Mäusen des UbC-IGF2BP2_H- und des Kontrollstammes nachgewiesen werden.

4.5.3.5 Glykogengehalt in Leber und Skelettmuskel

Die möglicherweise beschleunigte Aufnahme der im OGTT verabreichten Glucose in die peripheren Organe der IGF2BP2-Mäuse wirft weiterhin die Frage auf, ob die Glucose direkt verbraucht oder vorerst gespeichert wird. Naheliegender wäre eine Speicherung der überschüssigen Glucose in Form von Glykogen in Leber oder Skelettmuskel. Deshalb wurde der Glykogengehalt dieser Organe in den 1-jährigen Tieren genauer untersucht.

Eine Messung des Glykogengehaltes in der Leber der UbC-IGF2BP2-Tiere nach erfolgtem OGTT ergab keinen signifikanten Unterschied verglichen zu den Kontrolltieren (Abb. 26). Um zu untersuchen, ob eventuell der Skelettmuskel in diesen Tieren vermehrt Glucose speichert, wurde ebenso im Skelettmuskel der Glykogengehalt unter Ruhebedingungen bestimmt. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen festgestellt werden.

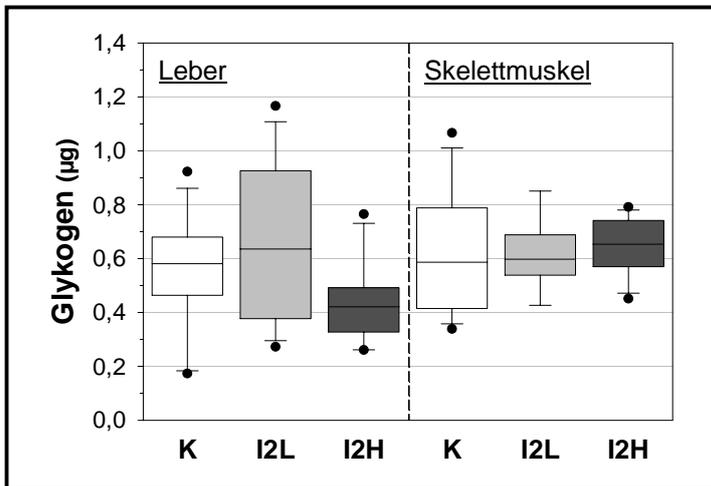


Abb. 26: Glykogengehalt in Leber und Muskel 1-jähriger UbC-Mäuse

Dargestellt ist die Glykogenmenge im Lebergewebe bzw. Skelettmuskel der IGF2BP2_L- (I2L) sowie IGF2BP2_H-Tiere (I2H) verglichen mit den UbC-Kontrollen (K). Die Tiere wurden vor der Leberentnahme für 6 h gefastet und einem 3-stündigen OGTT unterzogen. Der Skelettmuskel wurde aus unbehandelten Tieren entnommen. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 4 - 7$, $n_W = 4 - 8$

Eine Messung des Glykogengehaltes in den Alb-IGF2BP2-Tieren erfolgte sowohl in Lebern von Mäusen nach durchlaufenem OGTT sowie in Lebern von Tieren, denen lediglich der 6-stündige Futterentzug gemein war.

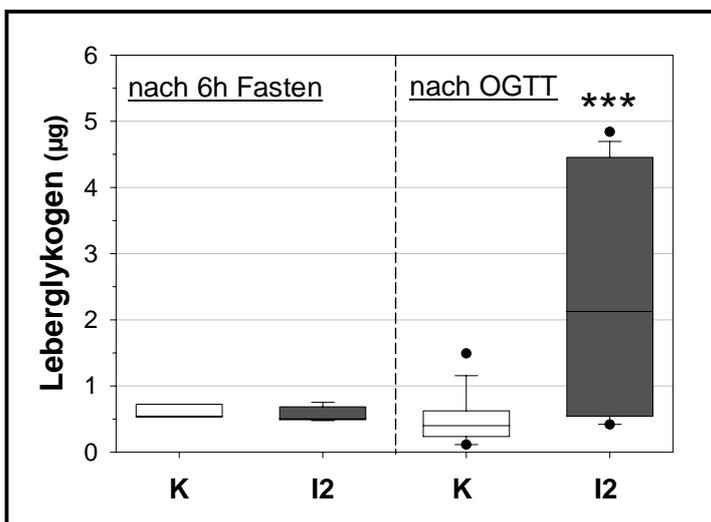


Abb. 27: Glykogengehalt in der Leber 1-jähriger Alb-IGF2BP2-Mäuse

Dargestellt ist die Glykogenmenge im Lebergewebe. Es wurden Tiere untersucht, denen vor der Leberentnahme nur für 6 h das Futter entzogen wurde und Tiere, mit denen im Anschluss an die Nahrungskarenz ein OGTT durchgeführt wurde. *** - $p < 0,001$ Die Signifikanz bezieht sich auf den gleichbehandelten Kontrollstamm. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Behandlung: $n_M = 3 - 9$, $n_W = 5 - 8$

Eine Nahrungskarenz allein führte in den Alb-IGF2BP2-Tieren zu keinen signifikanten Veränderungen im Glykogengehalt der Leber im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Abb. 27). Bei einer zusätzlich oralen Zuführung von Glucose während des OGTT kam es jedoch zu einer dramatischen Erhöhung der Glykogenmenge im Lebergewebe der IGF2BP2-Tiere.

Die Verstoffwechslung der Glucose im OGTT führte weder in der Leber des IGF2BP1- noch des IGF2BP3-Stammes zu einer von den Kontrolltieren abweichenden Speicherung oder Mobilisierung des Glykogens (siehe Anhang, Abb. A21).

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass vor allem die ubiquitär IGF2BP2-überexprimierenden Mäuse neben dem beobachteten Trend zu verminderten Blutglucosewerten verbunden mit einem verminderten HbA1c-Wert eine signifikant schnellere Glucoseaufnahme während des OGTT zeigten. Dieser Phänotyp war vornehmlich mit zunehmendem Alter der UbC-IGF2BP2-Tiere und nicht in den Mäusen mit einer nur leberspezifischen IGF2BP2-Expression zu beobachten. Ursächlich für diesen Phänotyp scheint nicht eine veränderte Ausschüttung, sondern Sensitivität des Insulins zu sein. Die von den peripheren Organen schneller aufgenommene Glucose resultierte nicht in einer Erhöhung der Glykogenmenge, sodass eine direkte Verstoffwechslung der zugeführten Glucose vermutet wird. Interessanterweise konnte in den Alb-IGF2BP2-Tieren keine schnellere Aufnahme der Glucose im OGTT nachgewiesen werden, was einerseits ausschließt, dass die Leber allein für den beobachteten Phänotyp in den UbC-IGF2BP2-Mäusen verantwortlich ist und andererseits eine essentielle Beteiligung weiterer peripherer IGF2BP2-überexprimierender Organe nahelegt. Bestärkt wird diese Hypothese auch dadurch, dass im Fall der Alb-IGF2BP2-Tiere die im OGTT zugeführte Glucose nicht, wie in den UbC-IGF2BP2-Mäusen, verstärkt in den Muskel oder das Fettgewebe aufgenommen und verbraucht wird, sondern im Überschuss vorliegt und daher verstärkt in der Leber in Form von Glykogen gespeichert wird. Das Zusammenspiel verschiedener IGF2BP2-überexprimierender Organe ist dabei entscheidend. Die verglichen zu den Kontrollen in den Alb-IGF2BP1- und Alb-IGF2BP3-Tieren unveränderten Ergebnisse lassen eindeutig erkennen, dass der beobachtete Glucosephänotyp ausschließlich als eine spezifische Funktion des IGF2BP2-Proteins gewertet werden kann.

4.5.4 Messung klinisch-chemischer Parameter

Zur weiteren Charakterisierung der transgenen UbC-Mäuse wurden verschiedene Parameter im Serum und Gewebe der UbC-IGF2BP2_H-Tiere untersucht. Ziel war es, mögliche Veränderungen im Glucose-, Protein- und Fettstoffwechsel sowie der Nierenfunktion festzustellen. Dazu wurden folgende Parameter bestimmt: Pankreaslipase, BUN (Harnstoff), Triacylglycerine, TSH (Thyreoida-stimulierendes Hormon) und Kreatinin.

Aus den erhobenen Daten wurde ersichtlich, dass sich die Mäuse des UbC-IGF2BP2_H-Stammes in nahezu keinem der gemessenen Parameter nennenswert von den Kontrollmäusen unterscheiden (siehe Anhang, Tabelle A16).

Eine Ausnahme zeigte sich in der Menge des Peptidhormons Adiponektin. Adiponektin ist ein vom Fettgewebe produziertes Hormon, welches durch Stimulation der Fettsäureoxidation u.a. das Hungergefühl und damit verbunden die Nahrungsaufnahme beeinflusst sowie verschiedene Wirkungen auf den Lipid- und Glucosstoffwechsel entfaltet. Im Allgemeinen korreliert eine verminderte Adiponektinkonzentration im Serum mit einem erhöhten Körperfettanteil sowie einer reduzierten Insulinsensitivität. Sowohl die männlichen als auch die weiblichen Tiere des IGF2BP2_H-Stammes wiesen eine signifikant verminderte Menge an Adiponektin im Serum auf (siehe Anhang, Tabelle A16). Ursächlich dafür scheint in erster Linie die relativ vermehrte Fettmenge in den signifikant größeren UbC-IGF2BP2_H-Mäusen verglichen zu den Kontrolltieren zu sein.

4.5.5 Zusammenfassung der Phänotypen

Die bis hierhin analysierten Phänotypen aller IGF2BP-überexprimierenden Tiere sind noch einmal übersichtlich in Tabelle 16 zusammengefasst. Im Verlauf der Versuche zeigten beide UbC-IGF2BP2-Stämme tendenziell dasselbe Verhalten verglichen zu den Kontrolltieren. Allerdings waren die beobachteten Phänotypen in den Mäusen mit einer erhöhten IGF2BP2-Expression meist stärker ausgeprägt, sodass einige weiterführende Versuche ausschließlich mit diesen Tieren durchgeführt wurden. Der Einfachheit halber werden deshalb hier nur die Ergebnisse des stärker IGF2BP2-überexprimierenden UbC-IGF2BP2_H-Stammes aufgelistet.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der 1-jährigen transgenen IGF2BP-Mäuse

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die zugehörigen Kontrollen. M - Männchen, W - Weibchen, n.s. - nicht signifikant, (n.s.) - $n = 1$, '---' - nicht analysiert, KGW - Körpergewicht, KOF - Körperoberfläche

Phänotypen der 1-jährigen IGF2BP-Mäuse								
	UbC-IGF2BP2		Alb-IGF2BP2		Alb-IGF2BP1		Alb-IGF2BP3	
	M	W	M	W	M	W	M	W
Tibiallänge	↑***	↑***	n.s.	↑*	n.s.	↑*	n.s.	↑***
Körpergewicht _{/Tibia}	↑**	↑***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑***
Organgewichte _{/Tibia} : Leber	n.s.	↑***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↓*	n.s.
Herz	↑***	↑***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Lungen	↑***	↑***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Nieren	↑***	↑***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Gehirn	↑***	↑***	n.s.	↑**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IGF1 Serum	↓**	n.s.	n.s.	n.s.	↑*	n.s.	n.s.	n.s.
IGF2 Serum	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IGF2 Leber	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	---	---	---	---
Futtermaufnahme _{/g KGW/Tag}	↓**	(n.s.)	---	---	---	---	---	---
Wasseraufnahme _{/g KGW/Tag}	↓***	(n.s.)	---	---	---	---	---	---
Energiegehalt _{/g Kot}	↑*		---	---	---	---	---	---
Energieausscheidung _{/g KGW/Tag}	n.s.		---	---	---	---	---	---
Energieumsatz _{/g KGW/Tag}	↓***		---	---	---	---	---	---
Verhältnis von KGW/KOF	↑**	↑**	---	---	---	---	---	---
Körpertemperatur	↓***	n.s.	---	---	---	---	---	---
Blutglucose _{basal}	↓*	n.s.	---	---	---	---	---	---
HbA1c	n.s.	n.s.	---	---	---	---	---	---
Blutglucose _{nüchtern}	n.s.	↑**	n.s.	n.s.	n.s.	↓*	n.s.	n.s.
Insulin _{nüchtern}	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	---	---	---	---
Blutglucose _{während des OGTT}	↓**	↓**	↓*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Insulin _{während des OGTT}	↓**	↓*	n.s.	n.s.	---	---	---	---
Insulinwirkung im IPITT	n.s.	n.s.	---	---	---	---	---	---
Glykogen _{Leber}	n.s.	n.s.	↑**	↑*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Glykogen _{Skelettmuskel}	n.s.	n.s.	---	---	---	---	---	---
Adiponektin _{Serum}	↓*	↓*	---	---	---	---	---	---

4.6 Veränderungen des Stoffwechsels der UbC-IGF2BP2-Tiere nach einer Hochfettdiät

Die in den vorhergehenden Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse ließen ganz verschiedene Hypothesen bezüglich der Auswirkungen einer ubiquitär vermehrten IGF2BP2-Proteinsynthese auf den Stoffwechsel zu. Eine davon basierte auf dem eindeutigen Befund der schnelleren Aufnahme und Verstoffwechslung der im OGTT zugeführten Glucose durch die peripheren Organe. Um testen zu können, ob sich der Glucosephänotyp der 1-jährigen UbC-IGF2BP2-überexprimierenden Stämme im Rahmen der Ausbildung von Stoffwechselstörungen wie z.B. einer Adipositas und folglich einem T2DM als vorteilhaft erweisen könnte, wurde diesen Tieren vor der erneuten Durchführung eines OGTT eine fettreiche Diät verabreicht. Während dieser insgesamt 10-wöchigen Diätphase bekamen die Tiere Futter mit einem maximalen Anteil an umsetzbarer Energie von 60 % nur aus Fett (60 % kcal %). Eine adäquate Ernährungsumstellung auf dieses sogenannte 60 %-ige Fettfutter bedurfte zuvor einer 2-wöchigen Umgewöhnungsphase, in der der Magen-Darm-Trakt der Mäuse schrittweise an das neue Futter gewöhnt wurde. Die Dauer der eigentlichen Hochfettdiät (HFD) mit ausschließlich 60 %igem Fettfutter betrug damit 8 Wochen.

4.6.1 Wachstum und Energieumsatz unter HFD-Bedingungen

4.6.1.1 Analyse der Gewichtsentwicklung

Ziel der Hochfettdiät war es, die Tiere in einen adipösen Zustand zu überführen und damit das Risiko der Entwicklung eines T2DM zu erhöhen. Um eine Zunahme des Körpergewichtes zeitnah ermitteln zu können wurden die 1-jährigen Tiere alle 2-3 Tage gewogen. Die Auswertung der auf die Tibialänge normalisierten Daten erfolgte wochenweise.

Wie erwartet konnte zeitnah eine Zunahme des Körpergewichtes beobachtet werden (Abb. 28). Nach einem anfänglich nur leichten Einbruch, natürlicherweise bedingt durch die Nahrungsumstellung, zeigten alle UbC-Stämme einen Anstieg des Körpergewichtes über die gesamte Dauer der HFD. Eine weitere Abbildung über die Veränderungen des Körpergewichtes bezogen auf die Tibialänge, aber unabhängig vom initialen Gewicht der Tiere ist dem Anhang beigefügt (siehe Abb. A10).

Eine signifikante Gewichtszunahme erfolgte in den Kontrolltieren bereits nach 2 Wochen, in den IGF2BP2-Tieren erst nach ca. 2 - 4 Wochen und in den IGF2BP2_H-Weibchen erstaunlicherweise sogar erst nach 7 Wochen. Die IGF2BP2-Tiere waren zu Beginn der Diät schwerer und nach Abschluss der Diätbehandlung genauso schwer wie die Kontrolltiere (siehe Anhang, Tabelle A12). Während die Kontrollmäuse eine Gewichtssteigerung von durchschnittlich 8 - 9 g (28 - 29 %) zeigten, wiesen die Tiere des IGF2BP2_H-Stammes eine maximale Gewichtszunahme von nur 4 - 7 g (12 - 20 %) auf.

Anhand der erhaltenen Daten der Körpergewichte lässt sich schlussfolgern, dass eine 8-wöchige HFD zu einem signifikant verminderten Zuwachs an Körpergewicht in UbC-IGF2BP2-überexprimierenden Tieren verglichen zu den Kontrollen führt.

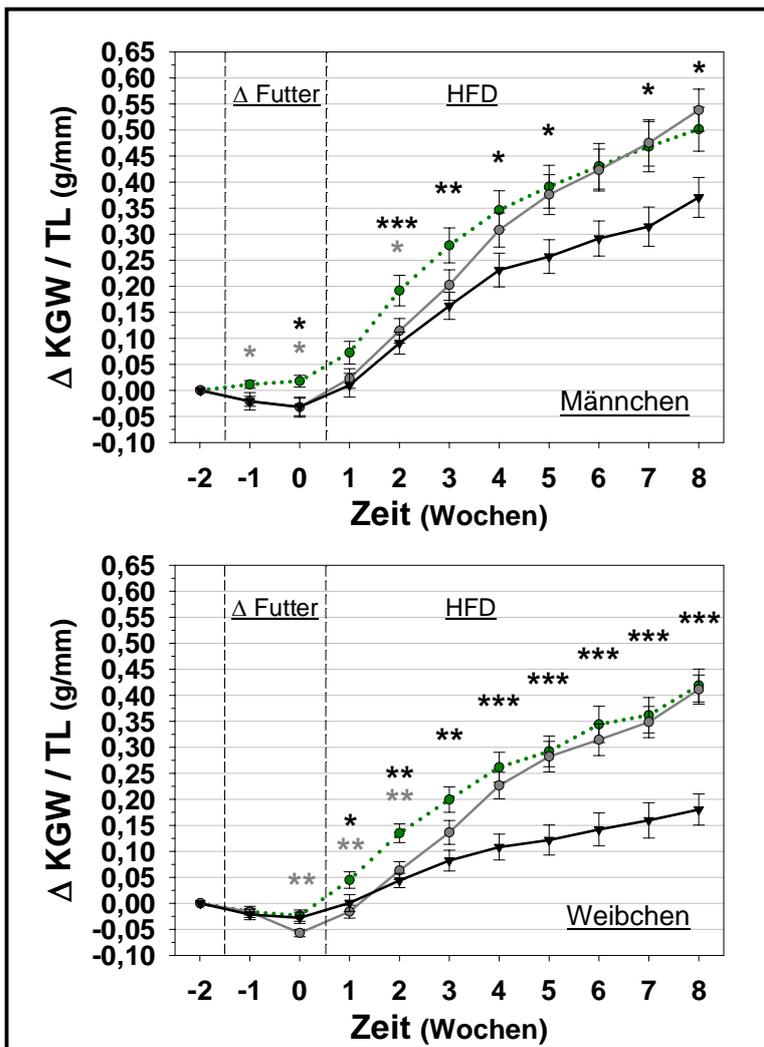


Abb. 28: Veränderungen des Körpergewichtes 1-jähriger UbC-Mäuse während der Hochfett-diät (HFD)

Dargestellt sind die Veränderungen des relativen Körpergewichtes (KGW) bezogen auf die Tibiallänge (TL) ausgehend von den unbehandelten Tieren vor Beginn (-2), über den Zeitraum der Futterumstellung (-1 - 0 = Δ Futter) sowie bis zum Ende der Diät (1 - 8 = HFD). Das initiale Gewicht (-2) diente bei der Berechnung der einzelnen Werte als Ausgangswert. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf die Kontrolltiere. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 11 - 15$, $n_W = 8 - 16$



4.6.1.2 Nahrungsaufnahme

Um die Ursache der unterschiedlichen Gewichtszunahme der Tiere genauer analysieren zu können, wurde auch der Verbrauch von Futter und Wasser während der gesamten Diätbehandlung alle 2 - 3 Tage erfasst und die tägliche Nahrungsaufnahme der Mäuse wochenweise ausgewertet.

Nach einer anfänglich vermehrten Aufnahme des Fettfutters, zumindest bei den IGF2BP2-Stämmen, kam es erwartungsgemäß zu Beginn der HFD bei allen Stämmen zu einer Reduktion der absoluten Futteraufnahme verglichen zur Standarddiät (siehe auch Anhang, Abb. A7). Aufgrund des höheren Kaloriengehaltes des Fettfutters im Vergleich zum Standardfutter wurde bereits nach 1-wöchiger Futterumstellung eine signifikant erhöhte Energieaufnahme in allen UbC-Stämmen beobachtet, welche bis zum Versuchsende bestehen blieb. Zum Ende der HFD konnte in der Energieaufnahme zwischen den verschiedenen UbC-Stämmen jedoch kein Unterschied mehr festgestellt werden. Im Vergleich zur Futteraufnahme vor der Diät nahm jeder Stamm am Ende der HFD signifikant weniger von dem energiereicheren Futter, jedoch täglich ca. 0,27 kJ/g Körpergewicht zusätzlich auf.

Die Futterumstellung führte bei den UbC-Kontrollen in den ersten 2 Wochen zu einer signifikanten Steigerung der Wasseraufnahme verglichen zur Standarddiät sowie zu den IGF2BP2-Stämmen (siehe Anhang, Abb. A7). Im weiteren Diätverlauf blieb diese Diskrepanz zwischen den Stämmen bestehen, war jedoch zu allen folgenden Zeitpunkten nur noch als Tendenz einer verminderten Wasserzufuhr in

den IGF2BP2-Tieren zu beobachten. Ein Vergleich der aufgenommenen Wassermengen vor Beginn und am Ende der Diät ergab für alle Stämme eine signifikante Reduktion des zugeführten Wassers während der HFD. Dass sich sowohl die aufgenommene Menge an Futter als auch an Wasser durch die HFD der Tiere signifikant verminderte, ist generell damit zu erklären, dass die Wasseraufnahme der Tiere von der Menge des aufgenommenen Futters und damit auch von der pro Futtervolumen enthaltenen Energiemenge abhängig ist.

Aufgrund zu starker individueller Schwankungen, hauptsächlich innerhalb des Kontrollstammes, konnten trotz einer stets verminderten Wasseraufnahme der IGF2BP2-Tiere keine signifikanten Veränderungen im Ernährungsverhalten zwischen den drei UbC-Stämmen nach 6-wöchiger HFD festgestellt werden (siehe Anhang, Tabelle A7). Der Grund für die verminderte Körpergewichtszunahme der UbC-IGF2BP2-Tiere während der HFD ist also nicht in einer verringerten Kalorienzufuhr im Vergleich zu den stärker an Gewicht zunehmenden UbC-Kontrollmäusen zu finden.

4.6.1.3 Analyse der Ausscheidungen

Infolge der Diätbehandlung und damit verbunden der veränderten Zusammensetzung der Nahrung kommt es zu einer grundlegenden Umstellung des Stoffwechsels. Neben der Art und Menge des aufgenommenen Futters und der daraus gewonnenen Energiemenge kann sich auch der vom Körper wieder ausgeschiedene Energieanteil verändern. Um zu überprüfen, ob sich die Menge der vom Körper wieder ausgeschiedenen Energie in den UbC-IGF2BP2-Tieren von denen der Kontrollmäuse unterscheidet und somit eine mögliche Erklärung für die Wachstumsveränderungen liefert, wurde der Kot von UbC-IGF2BP2_H-Tieren in der 6. Woche der HFD gesammelt und dessen Verbrennungsenthalpie mittels einer kalorimetrischen Bombe bestimmt.

Der gemessene Energiegehalt des Kotes war auch nach einer HFD in den UbC-IGF2BP2_H-Tieren immer noch signifikant erhöht verglichen zu den Kontrollmäusen (siehe Anhang, Tabelle A8).

Neben den festen Ausscheidungen in Form von Kot kann der Körper auch über den Urin Energie z.B. in Form von Glucose oder Proteinen aufgrund verschiedener Stoffwechselstörungen verlieren. Um mögliche Energieverluste durch eine Ausscheidung von Glucose oder anderer Stoffwechselprodukte im Urin der UbC-IGF2BP2_H-Mäusen nachweisen zu können, wurde auch der Urin dieser Tiere nach 6-wöchiger HFD gesammelt und mittels eines handelsüblichen Streifentestes auf das Vorhandensein verschiedener Parameter analysiert.

Hierbei konnten keine auffällig erhöhten bzw. veränderten Glucose-, Protein- oder Ketonwerte im Urin gemessen und auch keine veränderte Ausscheidung an Bilirubin oder Urobilinogen zwischen den verschiedenen UbC-Stämmen festgestellt werden.

4.6.1.4 Berechnung des Energieumsatzes

Damit eine durch die HFD möglicherweise verursachte Veränderung im Energieumsatz der Mäuse festgestellt werden konnte, wurde auch die tägliche Energiebilanz des UbC-IGF2BP2_H- sowie des Kontrollstammes nach 6-wöchiger HFD berechnet.

Anzumerken ist jedoch, dass die in Abb. 29 aufgeführten Berechnungen der Energiemengen aufgrund fehlender Analysen der abgesetzten Menge an Kot während der Diät ebenfalls auf den Kotmengen der unbehandelten Mäuse beruhen. Es ist allerdings bekannt, dass eine fettreiche Ernährung im Vergleich zu ballaststoffreichen Nahrungsmitteln zu einer verringerten Stuhlmenge führen kann. Trotz dieser möglichen Veränderung und unter der Annahme, dass sich die Ausscheidungsmengen zwischen den Stämmen nicht unterscheiden, sollen die nachfolgenden Berechnungen zumindest eine grobe Orientierung in Bezug auf gravierende Unterschiede im Energiehaushalt der Tiere liefern und sind daher unter Vorbehalt zu betrachten.

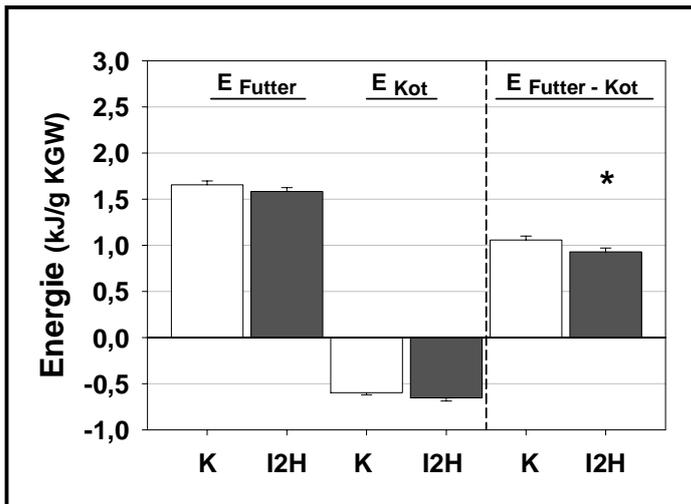


Abb. 29: Täglicher Energieumsatz der UbC-Mäuse nach 6-wöchiger HFD. Abgebildet sind die relativen Messwerte der pro Gramm Körpergewicht (KGW) berechneten Energieinhalte (E) des aufgenommenen Futters, des abgegebenen Kotes und dem Betrag dieser beiden Werte, welcher als täglicher Energieumsatz betrachtet werden kann. Verglichen wurden dabei die Tiere des IGF2BP2_H-Stammes (I2H) mit den Tieren des Kontrollstammes (K), auf den sich auch die angegebene Signifikanz bezieht. * - $p < 0,05$

Aufgrund des sich zum Ende der Diätbehandlung angleichenden Fressverhaltens der UbC-Stämme unterschieden sich diese auch nicht mehr in dem Anteil an täglich aufgenommener Energie. Trotz signifikant erhöhtem Energieinhalt des Kotes der IGF2BP2-Tiere blieb die insgesamt ausgeschiedene Energie (unter Annahme einer unveränderten Ausscheidungsmenge) gleich. Dennoch zeigten die IGF2BP2-Tiere auch nach einer 6-wöchigen Hochfettdiät weiterhin einen signifikant verminderten täglichen Energieumsatz.

Eine Berechnung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses der Tiere nach der HFD ergab erwartungsgemäß keine signifikante Veränderung zwischen den Stämmen (siehe Anhang, Tabelle A10). Die IGF2BP2-Tiere wiesen am Ende der Diätbehandlung das gleiche Körpergewicht (\cong Oberfläche) wie die Kontrolltiere auf. Somit war auch deren Körperoberfläche (\cong Volumen) unverändert. Die dennoch beobachtete signifikante Reduktion des Energieumsatzes lässt diesmal keinen Rückschluss auf diesen kausalen Zusammenhang zu und scheint daher ausschließlich auf die Überexpression des IGF2BP2-Proteins zurückzuführen zu sein.

Anhand dieser Ergebnisse wird ersichtlich, dass die UbC-IGF2BP2_H-Tiere während der HFD eine verminderte Gewichtszunahme zeigen, obwohl sie verglichen zu den Kontrollmäusen täglich die gleiche Kalorienmenge zu sich nehmen. Die ubiquitäre Überexpression des humanen IGF2BP2 führt scheinbar zu einer internen Veränderung des Energieumsatzes der Mäuse und verleiht ihnen somit eine gewisse Resistenz gegenüber der Ausbildung einer Adipositas.

4.6.2 Regulation der Blutglucosekonzentration unter HFD-Bedingungen

Um klären zu können, ob und inwieweit sich die erhöhte Fett- bzw. Kalorienzufuhr und die damit verbundene Gewichtszunahme der UbC-Stämme auf deren Glucosehomöostase auswirkte, wurden verschiedene Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Glucosestoffwechsel durchgeführt.

4.6.2.1 Blutglucose- und HbA1c-Werte

Im Verlauf der Diätbehandlung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der basale Blutglucosewert der Mäuse bestimmt. Dies erfolgte unmittelbar vor dem Beginn der Diät, nach der 2-wöchigen Futterumstellungsphase sowie nach der Hälfte der eigentlichen HFD, also nachdem die Tiere bereits 4 Wochen lang das 60 %-ige Fettfutter aufnahmen.

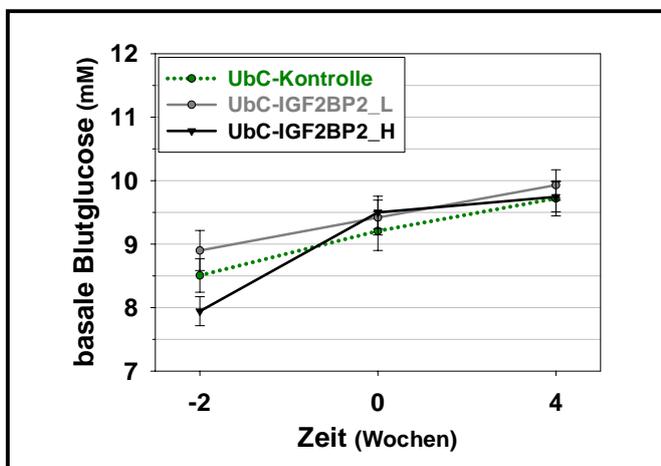


Abb. 30: Veränderungen der basalen Blutglucosewerte der UbC-Mäuse vor und während der HFD

Gezeigt sind die Blutglucosewerte der 1 Jahr alten Tiere im unbehandelten Zustand (-2), 2 Wochen nach der Futterumstellung (0) und 4 Wochen nach dem Beginn der Hochfettdiät (4).

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 12 - 15$, $n_W = 8 - 16$

Es konnten keine gravierenden Unterschiede in den Blutglucosewerten zwischen den UbC-Stämmen aufgrund der 8-wöchigen Hochfettdiät nachgewiesen werden (Abb. 30). Dennoch zeigte sich mit fortschreitender Diätddauer erwartungsgemäß eine signifikante Zunahme der Glucosewerte im Blut, welche jedoch bei allen Stämmen gleichermaßen zu verzeichnen war (siehe Anhang, Tabelle A13). Folglich konnte zwischen dem Kontroll- und den IGF2BP2-Stämmen auch keine veränderte Menge an glykiertem Hämoglobin (HbA1c) nachgewiesen werden (siehe Anhang, Tabelle A14).

4.6.2.2 Orale Glucosetoleranztest (OGTT)

Das eigentliche Ziel der erhöhten Kalorienzufuhr war die Induktion von Stoffwechseleränderungen, besonders im Glucose- und Fettstoffwechsel der Tiere, welche im Allgemeinen sehr rasch durch eine stark fettreiche Ernährung hervorgerufen werden. Am Ende des Diätversuches stand daher erneut die Durchführung eines OGTT.

Im Gegensatz zur Darstellung der relativen Daten (siehe Anhang, Abb. A14), wie sie in den vorhergehenden Kapiteln gezeigt wurden, werden im Folgenden die absolut gemessenen Glucosewerte abgebildet. Einerseits zeigten sich bereits erste Unterschiede im Nüchtern-Blutglucosewert zwischen den Stämmen und andererseits schien daher eine Betrachtung des absoluten Anstiegs der Glucosebelastung nach der Diätbehandlung aussagekräftiger zu sein.

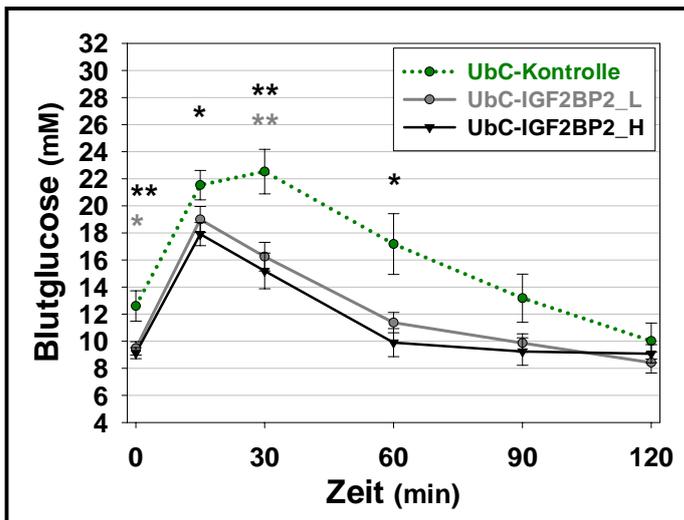


Abb. 31: Oraler Glucosetoleranztest der UbC-Stämme nach 8-wöchiger HFD

Dargestellt ist der Verlauf der absoluten Blutglucosekonzentration über einen Zeitraum von 2 Stunden nach oraler Glucosegabe von 1 Jahr alten Tieren. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf die Kontrollen.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 6 - 10$, $n_W = 3 - 7$

Nach der hochkalorischen Diät sowie einer 6-stündigen Nahrungskarenz waren in den UbC-IGF2BP2-Tieren im Gegensatz zu den UbC-Kontrollmäusen signifikant verminderte Nüchtern-Blutglucosewerte feststellbar (Abb. 31). Damit wiesen die Kontrolltiere bereits erste Anzeichen auf, die Konzentration der Glucose im Blut nicht adäquat in die Zellen aufnehmen und somit verstoffwechseln zu können. Als Reaktion auf die oral zugeführte Glucosemenge zeigten die IGF2BP2-Tiere einen relativ normalen Kurvenverlauf der Blutglucosewerte vergleichbar mit den unbehandelten UbC-IGF2BP2-Tieren (siehe Anhang, Abb. A22). Nach 15 Minuten wurde ein maximaler Anstieg der Glucose beobachtet, welcher bereits in den folgenden 45 Minuten kontinuierlich abnahm. Dahingegen wurde in den Kontrollmäusen erst nach einer halben Stunde ein maximaler Blutglucoseanstieg verzeichnet. Der Glucosewert sank anschließend verglichen zu den IGF2BP2-Tieren sehr langsam aber stetig wieder ab.

Anhand dieser Untersuchungen kann geschlossen werden, dass die transgenen UbC-IGF2BP2-Tiere verglichen zu den Kontrollen im Allgemeinen einer geringeren Glucosebelastung während des gesamten OGTT ausgesetzt waren. Ursächlich dafür scheint die auch nach der Diät noch erhaltene Fähigkeit der IGF2BP2-Mäuse, die Glucose schneller bzw. effektiver aus dem Blut in die peripheren Organe aufnehmen zu können. Bereits im nüchternen Zustand zeigte sich dies durch einen signifikant verminderten Blutglucosewert der UbC-IGF2BP2-Mäuse.

4.6.2.3 Insulinkonzentrationen während des OGTT

Um die Ursache der nach der Diätbehandlung beobachteten Veränderungen im Glucosestoffwechsel eingehender analysieren zu können, wurden im Anschluss an den OGTT die Insulinkonzentrationen im Serum der Tiere zu den verschiedenen Zeitpunkten gemessen.

Trotz signifikant veränderter Blutglucosewerte bei Nüchternheit konnten keine Unterschiede in der Konzentration des Nüchtern-Insulins zwischen den Stämmen beobachtet werden (Abb. 32). Der Verlauf der auf den Glucosereiz im OGTT ausgeschütteten Insulinmengen ähnelte erwartungsgemäß dem der Glucosewerte und wies erstaunlicherweise zu nahezu allen gemessenen Zeitpunkten keine signifikant veränderten Werte auf. Die Größe der Fehlerbalken verdeutlicht, dass einige der Kontrollmäuse verglichen zu den Tieren der IGF2BP2-Stämme dramatisch gestiegene Insulinkonzentrationen im Blut aufwiesen, andere hingegen keine so gravierenden Effekte zeigten. Im Vergleich zu den UbC-Tieren unter der Standarddiät wurde erwartungsgemäß in allen drei Stämmen eine Zunahme der

Insulinkonzentration im Blut nachgewiesen (siehe Anhang, Abb. A23). Ursächlich dafür ist die sich natürlicherweise durch solch eine HFD ausbildende Insulinresistenz der peripheren Gewebe, welche zunächst durch eine vermehrte Insulinausschüttung in den Blutkreislauf kompensiert wird.

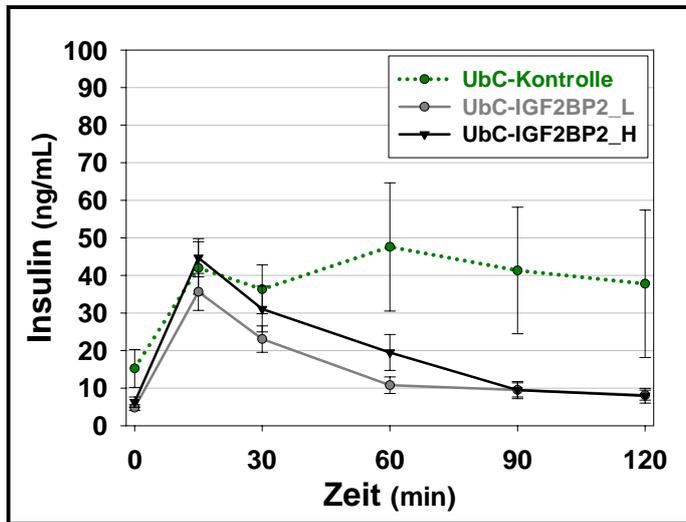


Abb. 32:

Insulinkonzentrationen während des OGTT der UbC-Mäuse nach 8-wöchiger HFD

Gezeigt ist der Verlauf der absoluten Insulinkonzentration im Blut über einen Zeitraum von 2 Stunden nach oraler Glucosegabe von 1-jährigen Tieren.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 6 - 9$, $n_W = 3 - 7$

Eine erneute Berechnung des Quotienten aus Insulin- und Glucosewerten zu den gemessenen Zeitpunkten sowie mittels der HOMA-Methode ergab auch nach der 8-wöchigen HFD keine Unterschiede in der Ausschüttung und Sensitivität des Insulins (siehe Anhang, Tabelle A15).

Um eine weitere Aussage über die Insulinsekretion und damit die Aktivität der β -Zellen treffen zu können, wurde die Menge an C-Peptid (engl.: *Connecting peptide*) im Serum bestimmt. Das C-Peptid ist ein kurzes Peptid, welches während der Prozessierung des Insulins aus dessen Vorläufermolekül Proinsulin abgespalten und bei der Insulinsekretion in gleichen Mengen in den Blutkreislauf abgegeben wird. Der Vorteil der Messung des C-Peptids liegt in seiner längeren Halbwertszeit von ca. 30 Minuten gegenüber der des Insulins mit nur etwa 7 - 15 Minuten [Behrends *et al.* 2010, S. 397; Heinrich *et al.* 2014, S. 447]. Die Konzentration an C-Peptid wurde im Serum der 1-jährigen Mäuse sowohl im nüchternen Zustand als auch 15 Minuten nach der oralen Applikation der Glucose mittels eines ELISA vermessen.

Ein Vergleich der Mengen an C-Peptid im Serum der Tiere ergab keine signifikanten Veränderungen zwischen den verschiedenen Stämmen zu den zwei gemessenen Zeitpunkten (siehe Anhang, Abb. A17). Interessanterweise stieg die Konzentration an C-Peptid 15 Minuten nach der Glucosegabe verglichen zum Nüchternwert sowohl innerhalb des IGF2BP2_L- ($p = 0,016$ *) als auch innerhalb des IGF2BP2_H-Stammes ($p \leq 0,001$ ***) signifikant an, während dies im Kontrollstamm ($p = 0,057$) nicht gemessen werden konnte. Ursächlich dafür könnte die bereits zu Beginn in den Kontrollmäusen beobachtete leicht erhöhte Konzentration an Insulin sowie des C-Peptids sein. Ebenso wäre auch die bereits erwähnte vergleichsweise schnellere Resorption und damit verbunden das schnellere Erkennen und Reagieren des Körpers auf den zugeführten Glucosereiz in den IGF2BP2-Tieren denkbar. Eine abweichende Effektivität der Insulinwirkung konnte mittels der im OGTT erhobenen Daten jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

4.6.2.4 Intraperitonealer Insulintoleranztest (IPITT)

Um weiterführend auch eine Aussage über Veränderungen in der Insulinsensitivität der peripheren Organe wie Leber, Muskel und Fettgewebe durch die HFD treffen zu können wurde mit einigen der 1-jährigen Tiere am Ende des Diätversuches anstelle eines OGTT ein IPITT durchgeführt.

Nach der Insulingabe nahm die Glucosekonzentration im Blut aller UbC-Stämme erwartungsgemäß ab. Während die Blutglucosekonzentration in den Kontrollmäusen über den gesamten Testzeitraum vergleichsweise nur marginal sank, wurde vor allem in den IGF2BP2_H-Tieren bereits 15 Minuten nach Beginn des Tests ein signifikanter Abfall der Glucosewerte registriert sowie generell zu allen gemessenen Zeitpunkten eine verminderte Blutglucosekonzentration festgestellt.

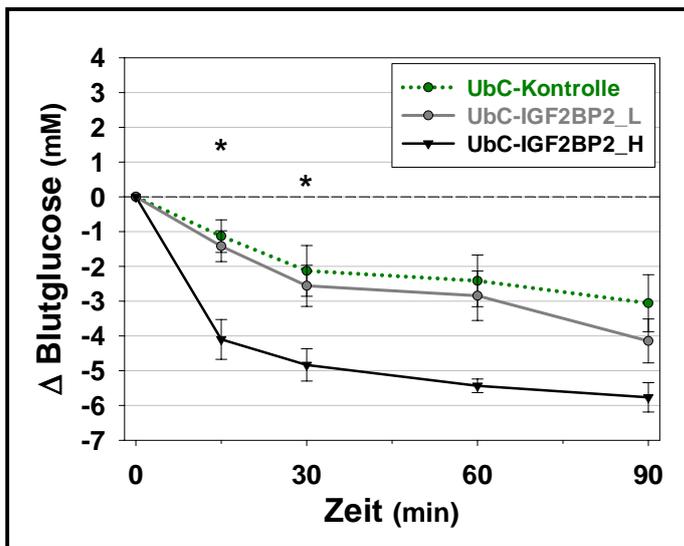


Abb. 33: Intraperitonealer Insulintoleranztest der UbC-Mäuse nach 8-wöchiger HFD

Dargestellt ist der Verlauf der relativen Glucosekonzentration im Blut über 1 ½ Stunden nach i.p.-Gabe von Insulin in 1-jährigen Tieren. Der Nüchternwert diente bei der Berechnung der einzelnen Werte als Ausgangswert. * - $p < 0,05$

Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf die Kontrolltiere.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 2 - 6$, $n_W = 1 - 7$

In den stärker IGF2BP2-überexprimierenden UbC-IGF2BP2_H-Mäusen konnte nach der 8-wöchigen Behandlung mit dem 60 %-igen Fettfutter eine effektivere Wirksamkeit des Insulins und damit eine schnellere Aufnahme der Glucose aus dem Blut in die peripheren Gewebe verglichen mit den Kontrollen festgestellt werden (Abb. 33). Interessanterweise schien die Reaktion auf eine von außen zugeführte Insulinmenge in den IGF2BP2_H-Tieren nach der HFD im Vergleich zu den Tieren unter Standarddiät deutlich verbessert zu sein (siehe Anhang, Abb. A24). Im Gegensatz dazu zeigten die Kontrollmäuse erwartungsgemäß nach der HFD eine verlangsamte Glucoseaufnahme in die Gewebe.

Die Tatsache, dass die UbC-IGF2BP2-Mäuse während der HFD weniger an Gewicht zunahmten bzw. die Kontrollmäuse stärker an Gewicht zunahmten führt zu der Annahme, dass die Kontrolltiere einen vergleichsweise erhöhten Körperfettanteil besaßen und dadurch bedingt eine verminderte Insulinsensitivität verbunden mit ersten Anzeichen einer Insulinresistenz aufwiesen. Eine adäquate Reaktion der peripheren Organe auf die zugeführte Insulinmenge konnte nach der HFD nur in den IGF2BP2_H-Tieren, aber nicht mehr in den Kontrollmäusen erfolgen.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die in den UbC-IGF2BP2-Mäusen im unbehandelten Zustand beobachteten Phänotypen unter einer hochkalorischen und vornehmlich auf der Aufnahme von Fett basierenden Diät deutlich verstärkt werden konnten. Die ubiquitäre Überexpression des humanen IGF2BP2 führte in den Tieren zu einer verminderten Gewichtszunahme, möglicherweise bedingt durch einen veränderten Energieumsatz, sowie zu einer verbesserten Glucosetoleranz im Vergleich zu den gleichbehandelten Kontrollmäusen. Trotz der natürlicherweise durch solch eine HFD beginnenden Resistenz gegenüber den zellulären Wirkungen des Insulins waren die IGF2BP2-Mäuse in der Lage die Glucose schneller aus dem Blut in die Gewebe aufzunehmen als die Kontrolltiere. Auch nach der HFD wird deutlich, dass dieser Glucosephänotyp nicht unmittelbar auf einer Veränderung in der Insulinsekretion, sondern vornehmlich auf einer verbesserten Insulinwirkung und damit einer erhöhten Ansprechbarkeit der peripheren Organe auf das Hormon beruht. Zudem scheint die Menge des überexprimierten IGF2BP2-Proteins einen eindeutigen Einfluss auf die Ausprägung der beobachteten Phänotypen zu haben. In nahezu allen Untersuchungen wiesen die stärker überexprimierenden IGF2BP2_H-Mäuse deutlich stärkere Effekte auf verglichen zu den Tieren des IGF2BP2_L-Stammes, welche teilweise nur wenige bis keine Veränderungen im Vergleich zum Kontrollstamm zeigten.

4.6.3 Messung klinisch-chemischer Parameter

Damit die durch die HFD möglicherweise verursachten Veränderungen der zuvor bereits in den unbehandelten Tieren gemessenen Parameter festgestellt werden konnten, erfolgte auch im Serum der UbC-Tiere nach der 8-wöchigen HFD eine entsprechende Analyse. Außer für die Bestimmung des TSH-Wertes und der Adiponektinkonzentration beschränkten sich die Messungen erneut nur auf das Serum der Tiere des IGF2BP2_H-Stammes.

Basierend auf den Befunden der verschiedenen Parameter im Blut der Mäuse konnten auch nach einer 10-wöchigen fettreichen Ernährungsphase keine offensichtlichen Veränderungen im Glucose-, Protein- und Fettstoffwechsel (Pankreaslipase, BUN (Harnstoff), Triacylglycerine und TSH) sowie in der Nierenfunktion (Kreatinin) zwischen den Mausstämmen beobachtet werden (siehe Anhang, Tabelle A16).

Die in den unbehandelten UbC-IGF2BP2_H-Mäusen signifikant verringerte Adiponektinkonzentration konnte nach der HFD nicht mehr nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß sanken die Adiponektinwerte in allen UbC-Stämmen nach der Diät im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Ursächlich dafür ist der während der HFD gestiegene Körperfettanteil der Mäuse, welcher invers mit der Konzentration an Adiponektin korreliert.

4.6.4 Zusammenfassung der Phänotypen der UbC-IGF2BP2-Mäuse

Die durch eine ubiquitäre Überexpression des humanen IGF2BP2-Proteins in den transgenen Mäusen hervorgerufenen phänotypischen Veränderungen sind abschließend in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der 1-jährigen UbC-IGF2BP2-Mäuse

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich der IGF2BP2_H-Tiere mit den Kontrolltieren. n.s. - nicht signifikant, (n.s.) - $n = 1$, '---' - nicht analysiert, KGW - Körpergewicht, KOF - Körperoberfläche

Phänotypen der 1-jährigen UbC-IGF2BP2-Mäuse				
	Standarddiät		Hochfettdiät (HFD)	
	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen
Tibiallänge	↑***	↑***	↑***	↑***
Größenzuwachs während der HFD/Tibia	---	---	↓*	↓***
Körpergewicht/Tibia	↑**	↑***	n.s.	n.s.
Organgewichte/Tibia: Leber	n.s.	↑***	n.s.	n.s.
Herz	↑***	↑***	n.s.	↑**
Lungen	↑***	↑***	↑*	↑**
Nieren	↑***	↑***	n.s.	n.s.
Gehirn	↑***	↑***	n.s.	↑**
IGF1 Serum	↓**	n.s.	---	---
IGF2 Serum	n.s.	n.s.	---	---
IGF2 Leber	n.s.	n.s.	---	---
Futtermaufnahme/g KGW/Tag	↓**	(n.s.)	n.s.	n.s.
Wasseraufnahme/g KGW/Tag	↓***	(n.s.)	n.s.	n.s.
Energiegehalt/g Kot	↑*		↑**	
Energieausscheidung/g KGW/Tag	n.s.		n.s.	
Energieumsatz/g KGW/Tag	↓***		↓*	
Verhältnis von KGW/KOF	↑**	↑**	n.s.	n.s.
Körpertemperatur	↓***	n.s.	---	---
Blutglucose basal	↓*	n.s.	n.s.	n.s.
HbA1c	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Blutglucose nüchtern	n.s.	↑**	n.s.	↓**
Insulin nüchtern	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Blutglucose während des OGTT	↓**	↓**	↓*	↓*
Insulin während des OGTT	↓**	↓*	n.s.	n.s.
Insulinwirkung im IPITT	n.s.	n.s.	↓*	↓*
Glykogen Leber	n.s.	n.s.	---	---
Glykogen Skelettmuskel	n.s.	n.s.	---	---
Adiponektin Serum	↓*	↓*	n.s.	n.s.

4.7 Transkriptomanalysen in verschiedenen Geweben der UbC-Mäuse

Die identifizierten Phänotypen der IGF2BP2-Mäuse sollen zukünftig auch bezüglich ihrer molekularen Ursachen eingehender analysiert werden. Um zunächst einen allgemeinen Überblick auf Transkriptebene zu erhalten, wurde das Verfahren des *next generation sequencing* angewendet. Für diese Untersuchungen wurden jeweils drei männliche und drei weibliche Tiere des IGF2BP2_H- sowie des UbC-Kontrollstammes analysiert. Basierend auf dem Glucose- sowie Wachstumsphänotyp wurde Total-RNA aus den drei wesentlich am Glucosestoffwechsel beteiligten peripheren Organen, der Leber, dem Skelettmuskel und dem weißen Fettgewebe isoliert. Dabei wurde sowohl RNA aus den genannten drei Geweben von unbehandelten Tieren als auch von Mäusen nach der 8-wöchigen HFD untersucht. Die Durchführung der insgesamt sechs verschiedenen Analysen erfolgte durch die Mitarbeiter der Abteilung DNA-Technologien des IZKF der Universität Leipzig unter Leitung von Dr. Knut Krohn. Herr Dipl.-Bioinf. Markus Glaß übernahm freundlicherweise die bioinformatische Auswertung der verschiedenen Datensätze.

Mittels der RNA-Sequenzierung wurden insgesamt 41128 annotierte Gene analysiert, welche das gesamte Mausgenom abdecken. Davon repräsentierten 22026 proteincodierende Gene. Aufgrund verschiedener bioinformatischer Auswertungsprozesse wie z.B. der Anwendung unterschiedlicher Filterschritte sowie abhängig von der RNA-Qualität der einzelnen Proben reduzierte sich die Menge an auswertbaren Daten für die proteincodierenden Gene in den einzelnen Organen unterschiedlich stark. Eine prozentuale Berechnung der signifikant differenziell exprimierten proteincodierenden Gene ($FDR < 0,1$) bezogen auf die Gesamtanzahl dieser Gene erfolgte sowohl für jedes Gewebe unter den beiden Bedingungen (Standarddiät und HFD) als auch getrennt nach den mRNAs, deren Expression verstärkt bzw. vermindert war (Abb. 34).

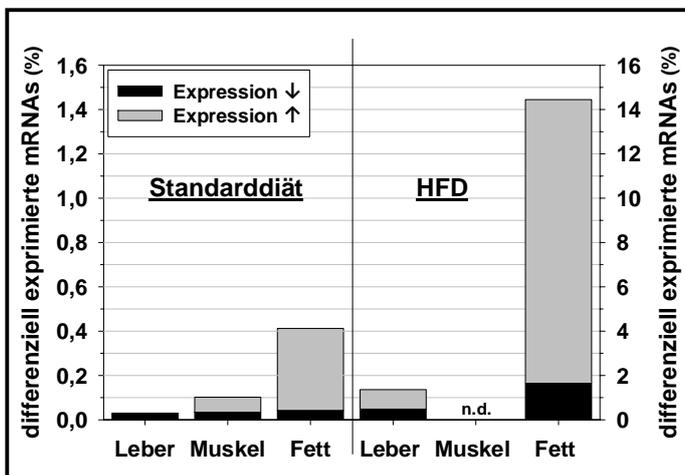


Abb. 34: Prozentsatz differenziell exprimierter mRNAs in verschiedenen Geweben der UbC-Mäuse

Gezeigt ist der prozentuale Anteil an signifikant differenziell exprimierten proteincodierenden Genen bzw. mRNAs ($FDR < 0,1$), aufgeteilt in verstärkt (grau) bzw. vermindert (schwarz) exprimierte mRNAs im Vergleich zu den Kontrollen.

n.d. - nicht detektierbar

Insgesamt war der Anteil differenziell exprimierter mRNAs vor allem in der Leber und dem Skelettmuskel der UbC-IGF2BP2-Mäuse recht gering. Dennoch zeigten sich ein Anstieg der signifikant veränderten Transkripte nach der HFD verglichen zur Standarddiät sowie eindeutige Unterschiede zwischen den verschiedenen Organen. Nach der Diätbehandlung konnten im Skelettmuskel keine differenziell exprimierten mRNAs unter den genannten Bedingungen ($FDR < 0,1$) analysiert werden. Während in der Leber und dem Skelettmuskel demnach nur sehr wenige bis keine transkriptionellen Veränderungen auftraten, zeigte sich im Fettgewebe unabhängig von der Behandlung der Tiere der stärkste Einfluss von IGF2BP2. Nach der HFD konnten im Fettgewebe bis zu zehnmal mehr

differenziell exprimierte Gene verglichen zur Leber nachgewiesen werden. Auffällig war zudem, dass die Expression des Großteils der Transkripte unter IGF2BP2-Überexpression sehr deutlich verstärkt war und das nicht nur für die mRNAs, sondern z.B. auch für die lncRNAs.

Anhand dieser ersten Analysen wurden im Folgenden zunächst die Daten des Fettgewebes nach der HFD genauer analysiert. Dazu wurden alle 2675 signifikant differenziell exprimierten mRNAs im Fettgewebe ($FDR < 0,1$) durch sogenannte *gene enrichment* oder Clusteranalysen z.B. bezüglich ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen, ihrer metabolischen Funktionen oder zellulären Lokalisation gruppiert ($FDR < 0,01$). Da der Anteil der differenziell exprimierten mRNAs mit einer verminderten Expression im Verhältnis zu dem einer gesteigerten Transkriptmenge sehr gering war (315 vs. 2360), wurden zunächst nur die Daten für die signifikant verstärkt exprimierten mRNAs genauer betrachtet.

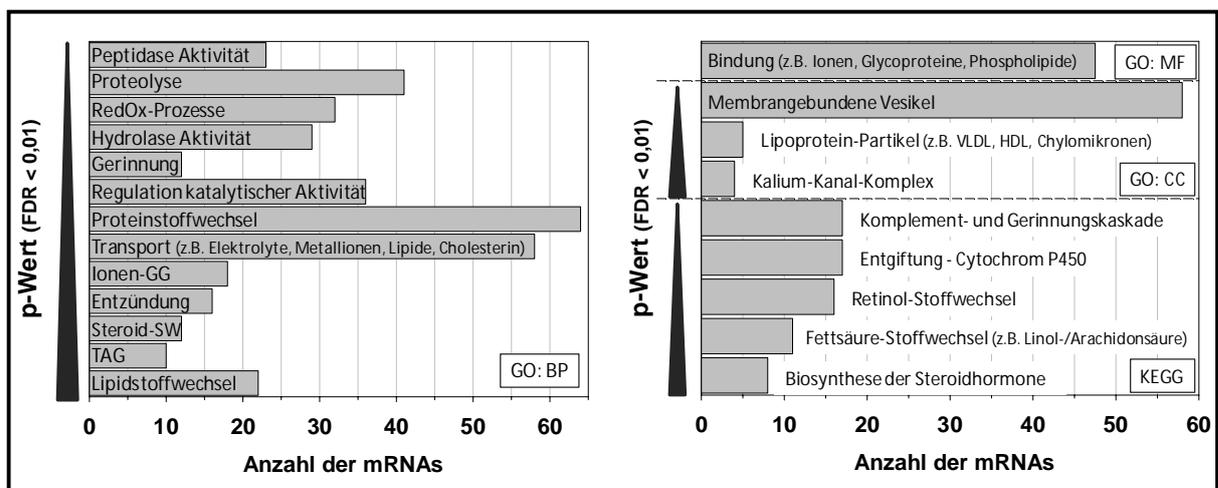


Abb. 35: Auswahl der Ergebnisse der *gene enrichment* Analysen der signifikant differenziell exprimierten mRNAs der Sequenzierung von RNA des Fettgewebes von UbC-Mäusen nach HFD

Dargestellt ist die Anzahl differenziell exprimierter mRNAs, welche signifikant einer bestimmten Gruppe von biologischen Prozessen (BP), molekularen Funktionen (MF) oder zellulären Komponenten (CC) zugeordnet werden konnten ($FDR < 0,01$). Die zur Auswertung genutzten Datenbanken waren *Gene Ontology* (GO) und die *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG).

GG - Gleichgewicht; SW - Stoffwechsel; TAG - Triacylglycerine

Aus den Ergebnissen der *gene enrichment* Analysen wird deutlich, dass eine Vielzahl unterschiedlicher biologischer Prozesse durch die Überexpression von IGF2BP2 beeinflusst wird (Abb. 35). Dabei scheinen sowohl verschiedenste Enzymfunktionen und -aktivitäten, das Gleichgewicht und der Transport von z.B. Elektrolyten, Metallionen oder Lipiden, die Komplement- und Gerinnungskaskade sowie allgemein der Protein- und Fettstoffwechsel beeinflusst zu werden. Die Tatsache, dass von allen untersuchten peripheren Organen im weißen Fettgewebe die meisten Transkripte differenziell exprimiert waren, macht deutlich, dass die in den IGF2BP2-Mäusen beobachteten Phänotypen in erster Linie mit einem veränderten Fettstoffwechsel assoziiert sind. Das zeigt sich nicht nur unter Standardbedingungen, sondern bestätigt sich auch in der veränderten mRNA-Expression der Mäuse nach der HFD verglichen zu den Kontrolltieren (siehe Abb. 35). Ebenso unterstreicht es die Hypothese einer essentiellen Beteiligung der peripheren Organe vor allem an dem beobachteten Glucosephänotyp. Die größte Anzahl an verstärkt exprimierten mRNAs war neben der allgemeinen Zuordnung dieser mRNAs zum Proteinstoffwechsel im Bereich der Transportfunktionen zu finden.

Dabei waren vornehmlich die Transportproteine der SLC-Familie (*solute carrier family*) affektiert, welche neben Elektrolyten und Metallionen auch geladene und ungeladene organische Moleküle wie bspw. Fettsäuren oder Aminosäuren transportieren. Daraus lässt sich auf eine veränderte Nährstoffverfügbarkeit in den Zellen schließen, die möglicherweise die Aktivität verschiedener Signalwege, wie z.B. der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade beeinflussen könnte oder aber auch als Konsequenz solch einer veränderten Stoffwechselaktivität resultieren kann. Eine Betrachtung der Glucosetransporter GLUT1 bis GLUT4 zeigte lediglich für den insulinunabhängigen Glucosetransporter GLUT2 eine verstärkte mRNA-Expression im Fettgewebe nach der HFD. In keinem anderen der drei Organe, weder unter Standardbedingungen noch nach der HFD, scheint sich die Menge der GLUTs signifikant verändert zu haben, womit eine verstärkte Expression dieser Transporter als mögliche Ursache der schnelleren Glucoseaufnahme nahezu ausgeschlossen werden kann. Dennoch wäre z.B. eine veränderte Regulation der Membranassoziation von GLUT4 durchaus denkbar. Weiterhin scheint auch der Plasmatransport von Lipiden mithilfe von Lipoprotein-Partikeln wie den Chylomikronen, VLDLs oder HDLs durch eine verstärkte Expression verschiedenster Apolipoproteine verändert zu sein. Dabei ist neben der absoluten Menge an Lipiden im Blut auch deren relativer Anteil an z.B. Cholesterin, Triacylglycerinen sowie der unterschiedlichen Lipoprotein-Partikel für die Entstehung von pathologischen Zuständen von großer Bedeutung. Auffällig war, dass die erhaltenen Kategorien der Clusteranalysen mittels der KEGG-Datenbank vornehmlich auf der verstärkten Expression einer Vielzahl verschiedener mRNAs aus der Familie der Cytochrome P450 (CYP) basierten. Die zur Gruppe der Oxidoreduktasen gehörenden CYPs sind in der Lage den Stoffwechsel von verschiedenen endogenen und exogenen Verbindungen wie bspw. Gallensäuren, Fettsäuren, Retinoiden, Steroiden oder Medikamenten zu katalysieren [Monostory und Dvorak 2011]. CYPs sind Enzyme, die eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Eikosanoide spielen. Das sind Abkömmlinge mehrfach ungesättigter C20-Fettsäuren wie bspw. der Arachidonsäure und zu ihnen gehören Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxane und Leukotriene. Die Expression der CYPs wird durch verschiedene Umwelteinflüsse, aber auch Diäten stimuliert [Nebert *et al.* 2013]. Dies konnte in den transgenen IGF2BP2-Tieren bestätigt werden, da die CYPs erst nach der HFD im Fettgewebe der Mäuse signifikant verstärkt exprimiert wurden. Eine veränderte Expression der CYPs kann also zu Störungen der Steroidbiosynthese, des Fettsäure-, Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels führen sowie in die Regulation von Vitamin D und Vitamin A (Retinoide) eingreifen [Nebert *et al.* 2013]. Dabei sind all diese Stoffwechselwege eng miteinander verbunden. Interessanterweise konnte für die Retinol-Dehydrogenase 9 (RDH9) sowohl in der Leber als auch im Fettgewebe der IGF2BP2-Mäuse eine verstärkte mRNA-Expression nach der HFD nachgewiesen werden (siehe Anhang, Tabelle A17). Für die RDH9 wurde bereits beschrieben, dass sie die Expression von CYPs und verschiedenen Enzymen, die an der Biosynthese, der Aktivierung oder dem Abbau von Steroidhormonen beteiligt sind, beeinflussen kann [Hu *et al.* 2007]. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass Retinol bzw. Vitamin A nicht nur in der Embryonalentwicklung, für das Sehvermögen sowie das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt, sondern auch metabolische Funktionen erfüllt und somit in der Pathogenese der Fettleibigkeit und von Diabetes involviert scheint [Trasino und Gudas 2015]. Auffällig in den Transkriptomanalysen der UbC-IGF2BP2-Tiere war ebenfalls, dass eine Vielzahl von Faktoren verstärkt exprimiert war, welche für das Immunsystem und Entzündungsreaktionen eine wichtige Bedeutung haben. Es ist bereits bekannt, dass im Fettgewebe adipöser Patienten eine chronische Entzündungsreaktion vom Immunsystem ausgelöst wird und diese als mögliche Ursache der auftretenden Insulinresistenz in Frage kommt [Shoelson *et al.* 2007, Patel *et al.* 2013]. Untersuchungen verschiedener Immunzellen wie Mastzellen und Makrophagen ergaben, dass im weißen Fettgewebe adipöser Menschen und Mäuse eine erhöhte Anzahl an Mastzellen beobachtet

wurde [Liu *et al.* 2009]. Liu und Kollegen konnten zeigen, dass ein Verlust reifer Mastzellen und die damit einhergehende reduzierte Menge an inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Proteasen im Serum und Fettgewebe zu einer verminderten diätinduzierten Gewichtszunahme sowie einer verbesserten Glucosetoleranz und einem veränderten Energieumsatz führt [Liu *et al.* 2009]. Diese Studien belegen eindeutig einen Zusammenhang von Entzündungsreaktionen und der Ausbildung einer Adipositas einhergehend mit der Entwicklung eines T2DM. Daher ist es durchaus denkbar, dass in den transgenen Mäusen nach der Diät auch Veränderungen im Immunsystem auftreten. Letztlich geben die Transkriptomanalysen erste Hinweise darauf, dass vornehmlich der Stoffwechsel im Fettgewebe der Mäuse verändert ist. Eine variierende Nährstoffverfügbarkeit durch z.B. die verstärkte Expression verschiedener Transporter sowie Störungen im Steroid- und Retinolstoffwechsel als auch des Immunsystems können daher als Folge der ubiquitären IGF2BP2-Überexpression und somit als mögliche Ursache der Phänotypen in Frage kommen.

Eine Analyse von differenziell exprimierten mRNAs, welche in allen drei oder je zwei der getesteten Organe signifikant ab- oder angereichert waren, ergab unter Standardbedingungen keine Übereinstimmung. Nach der HFD konnten lediglich 14 mRNAs identifiziert werden, welche sowohl in der Leber als auch im Fettgewebe affektiert waren (siehe Anhang, Tabelle A17). Eine *gene enrichment* Analyse dieser 14 Gene ergab zwar keine signifikante Anreicherung in einer der oben genannten Kategorien, jedoch konnten auch diese mRNAs zum Großteil denselben Gruppen zugeordnet werden, sodass auch hier ein nahezu einheitliches Bild entsteht. Darunter fanden sich z.B. mRNAs die in den Protein-, Fett-, Steroidhormon- sowie Retinolstoffwechsel involviert sind, aber auch in die Abläufe verschiedener Immunreaktionen eingreifen. Anzumerken ist hier, dass von den 14 in der Leber und dem Fettgewebe gemeinsam affektierten mRNAs sieben auf die gleiche Weise und sieben gegensätzlich reguliert waren. Das zeigt weiterhin, dass sich die Auswirkungen einer verstärkten Expression von IGF2BP2 in Abhängigkeit vom jeweiligen Organ und dessen Mikromilieu auf unterschiedliche Art und Weise manifestieren. Die im Allgemeinen eher verstärkte Expression der verschiedenen mRNAs kann möglicherweise auf eine stabilisierende Wirkung von IGF2BP2 bzw. einen Schutz seiner Zieltranskripte vor einem z.B. miRNA-vermittelten Abbau zurückgeführt werden. Die Ursache für den generell sehr geringen Anteil an differenziell exprimierten Genen im Vergleich zu bereits durchgeführten *in vitro* Analysen der IGF2BPs kann möglicherweise auch durch das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Organe *in vivo* sowie der Tatsache erklärt werden, dass IGF2BP2 als RNA-bindendes Protein vornehmlich die Translation seiner Zieltranskripte beeinflusst und somit nicht die mRNA-Menge selbst verändert [Li *et al.* 2012]. Auch die Funktionsweise von eventuell verändert regulierten miRNAs resultiert nicht zwangsläufig in einem Abbau ihrer Zieltranskripte [Liu *et al.* 2015]. Denkbar wäre eine durch die Überexpression von IGF2BP2 nur moderate Modulation einer Vielzahl an Faktoren, die sich vermutlich mit zunehmendem Alter der Mäuse weiter verstärkt und sich daher erst ab einem bestimmten Alter der Tiere deutlich manifestiert. All diese unterschiedlichen Effekte führen schließlich in ihrer Gesamtheit zu den beobachteten Phänotypen der IGF2BP2-Mäuse, ohne dass ein bestimmter Signalweg dramatisch forciert oder inhibiert zu sein scheint.

Eine Validierung der aus den RNA-Sequenzierungen erhaltenen Ergebnisse steht bisher noch aus. Die erhaltenen Daten lassen jedoch eine Vielzahl an verschiedensten Hypothesen vermuten. Weiterführende Untersuchungen sind daher von essentieller Bedeutung, um diese bestätigen und somit die molekularen Ursachen der hier beschriebenen Phänotypen der UbC-IGF2BP2-Tiere und damit die Funktion des Proteins im Stoffwechsel aufklären zu können.

5 Diskussion

5.1 Transgenes Mausmodell

Zur Untersuchung der Fragestellung, welche physiologischen Funktionen die humanen IGF2BPs im Glucosestoffwechsel und für das Wachstum von adulten gesunden Organismen besitzen, wurden transgene Mäuse generiert, welche die einzelnen IGF2BP-Familienmitglieder überexprimieren. Dafür wurde die etablierte Methode der pronukleären Mikroinjektion genutzt. Die dabei erhaltenen Mäuse überexprimierten die einzelnen IGF2BPs sowie GFP als Kontrolle konstitutiv. Mithilfe eines Albumin-Promotors (Alb) wurde eine leberspezifische und mittels eines Ubiquitin-Promotors (UbC) eine ubiquitäre Expression im gesamten Organismus erzielt. Insgesamt konnten auf diese Weise sieben verschiedene transgene Stämme generiert und analysiert werden: Alb-Kontrolle (GFP), Alb-IGF2BP1, Alb-IGF2BP2 und Alb-IGF2BP3 sowie UbC-Kontrolle (GFP), UbC-IGF2BP2_L und UbC-IGF2BP2_H. Es wurden jedoch keine Stämme mit einer ubiquitären Überexpression von IGF2BP1 und IGF2BP3 erhalten. Die Verpaarung der verschiedenen Stammtiere für UbC-IGF2BP1 und UbC-IGF2BP3 mit Wildtyp-Mäusen führte entweder nicht zur Weitergabe der fremden DNA oder es erfolgte trotz der erfolgreichen Integration der DNA ins Genom keine Synthese des transgenen Proteins. Zwei der vier Stammtiere für IGF2BP1 zeugten keine Nachkommen. Inwieweit eine ubiquitäre Überexpression von IGF2BP1 oder IGF2BP3 im gesunden Tier negative Auswirkungen induziert und bspw. zur Infertilität oder sogar Letalität führt, wurde nicht näher untersucht und bleibt daher vorerst unklar. Studien von Hansen und Kollegen zeigten aber bereits, dass IGF2BP1-knockout Mäuse starke Entwicklungsdefekte sowie einen Zwergenphänotyp aufwiesen und belegten damit die essentielle Rolle der IGF2BPs für die embryonale Entwicklung, Differenzierung und das Zellwachstum [Hansen *et al.* 2004]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine verstärkte Expression von sowohl IGF2BP1 als auch IGF2BP3 während der embryonalen und fetalen Entwicklung zu Defekten führen könnte, da die Expression beider Proteine normalerweise ab dem embryonalen Tag E12,5 stark zurückgeht und bis zur Geburt gänzlich eingestellt wird [Nielsen *et al.* 1999]. Eine erneute Expression der Proteine wurde vornehmlich in entarteten Zellen und Tumoren beobachtet [Bell *et al.* 2013]. In diesem Zusammenhang ist weiterhin anzumerken, dass in keinem der transgenen IGF2BP-Stämme verglichen zu den Kontrolltieren ein Auftreten von Tumoren festgestellt wurde, weder durch eine leberspezifische Expression von IGF2BP1/2/3 noch durch eine ubiquitäre Expression von IGF2BP2. Dennoch kann aufgrund der geringen Proteinmengen von IGF2BP1 und IGF2BP3 in der adulten Leber ein tumorinduzierendes Potenzial dieser Proteine nicht ausgeschlossen werden.

Bei der Methode der Mikroinjektion können in Abhängigkeit vom injizierten Konstrukt und dessen Größe mehrere Kopien der transgenen DNA zufällig in das Empfängergenom integrieren. Die erfolgreiche Expression des Transgens hängt dabei entscheidend vom Integrationsort innerhalb des Mausgenoms sowie der Anzahl an Kopien ab. In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus darauf, eine möglichst starke Überexpression der IGF2BPs zu erreichen, um die Funktion der IGF2BP-Proteine *in vivo* bestmöglich untersuchen und somit auch weniger starke Effekte nachweisen zu können. Daher stellte die Pronukleusinjektion eine geeignete und zu diesem Zeitpunkt bereits gut etablierte Methode dar. Ein weiterer Vorteil lag darin, dass mittels dieser Methode mehrere Stämme generiert werden konnten, die unterschiedliche Mengen des gleichen Proteins synthetisierten und somit nicht nur ein einziges Expressionslevel untersucht werden konnte, wie es z.B. bei einer Integration in den sogenannten ROSA26-Genlokus der Fall wäre [Mao *et al.* 2001]. Das ist für die Analyse der IGF2BPs von Bedeutung, da mehrere Tumorstudien belegen, dass quantitative Unterschiede in der Expression

der Proteine einen Einfluss auf die Überlebenschancen der Patienten und somit auf den Verlauf der Erkrankungen haben [Köbel *et al.* 2007, Köbel *et al.* 2009, Lochhead *et al.* 2012]. Aus diesem Grund war zunächst nur die Menge an synthetisiertem Protein ausschlaggebend und auf eine genomische Analyse der exakten Kopienzahl in den einzelnen Mausstämmen wurde vorerst verzichtet.

Da die transgenen Mäuse keine Verhaltensauffälligkeiten verglichen zu den Wildtyp-Tieren zeigten und im Fall der beiden genomisch unterschiedlichen UbC-IGF2BP2-Stämme auch nahezu identische Versuchsergebnisse erzielt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass durch die zufällige Integration der transgenen DNA kein essentielles Gen in den Mäusen beeinträchtigt wurde und die beobachteten Effekte als Resultat der IGF2BP2-Expression bewertet werden können. Anhand der Dokumentation der verschiedenen Zuchten können einige Aussagen bezüglich der Vererbung des Transgens getroffen werden. Grundlegend erfolgt auch die Weitergabe der transgenen DNA nach den mendelschen Regeln. Wird ein Stammtier, das nur eine Kopie des Transgens im Genom enthält, mit einem Wildtyp-Tier verpaart, so tragen 50 % der Nachkommen in der ersten Filialgeneration (F1) das Transgen [Gannon *et al.* 1990]. Dieser Anteil erhöht sich bereits auf 75 %, wenn das Stammtier zwei Kopien der transgenen DNA enthält. Die transgenen IGF2BP- und Kontrollmäuse wiesen in der F1-Generation einen maximalen Anteil an positiven Tieren von 57 % auf und wichen damit nur geringfügig von den theoretischen 50 % ab. Somit kann geschlossen werden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit nur eine transgene Kopie im Genom der Stammtiere vorlag. Die genomisch positiven Tiere der F1-Generation wurden anschließend untereinander verpaart und für jeden Stamm eine individuelle Zucht aufgebaut. Eine zusammenfassende Analyse der Generationen F2 bis F11 ergab, dass der Prozentsatz positiver Transgene bei den leberspezifischen Alb-IGF2BP3-Tieren sowie bei beiden ubiquitären UbC-IGF2BP2-Mäusen verglichen mit dem zugehörigen Kontrollstamm signifikant vermindert war. Ebenso wurde bei dem leberspezifischen Alb-IGF2BP2-Stamm sowie bei den bereits genannten Stämmen eine verminderte Anzahl an Nachkommen pro Wurf festgestellt (siehe Tabelle 9). Eine mögliche Ursache dafür könnte eine erhöhte intrauterine oder postnatale Sterblichkeit sein. Die Expression des Transgens könnte im schlimmsten Fall letal wirken und eine erhöhte Sterblichkeit der Embryonen noch im Mutterleib verursachen oder eine Trächtigkeit gänzlich verhindern. Ein weiterer Unterschied der beiden untersuchten Mausmodelle liegt darin, dass lediglich die ubiquitäre Überexpression bereits die Embryonalentwicklung der Mäuse beeinflussen könnte. Da die Leber der Nachkommen im Normalfall erst nach der Geburt selbstständig arbeitet und Albumin synthetisiert, erfolgt die Überexpression der IGF2BPs in der Leber möglicherweise auch erst nach der Geburt der Tiere. Damit ließe sich das ausschließliche Erhalten von leberspezifischen IGF2BP1- und IGF2BP3-Mäusen eventuell erklären, da die konstitutive und bereits embryonale Überexpression scheinbar negative Konsequenzen für die Embryonal- und Fetalentwicklung hat. Ein eindeutiger Beleg dafür bedarf jedoch einer erneuten Mikroinjektion und eingehenderen Untersuchungen diesbezüglich, um den Einfluss des Integrationsortes im Genom sowie das Eintreten nicht vorhersehbarer Zwischenfälle (wie bspw. ein vorzeitiges Versterben der Tiere durch Hierarchiekämpfe) komplett ausschließen zu können. Eine ubiquitäre Expression von IGF2BP2 sowie auch erwartungsgemäß von GFP scheint jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen an sich zu haben, abgesehen von einem eventuell auch embryonal bzw. fetal bereits auftretendem Größenwuchs der IGF2BP2-Mäuse. Zudem konnten während der Sektion von tragenden UbC-IGF2BP2-Tieren keine fehlgebildeten oder toten Embryonen beobachtet werden. Eine postnatale Sterblichkeit der Neugeborenen tritt dann ein, wenn die Tiere entweder selbst nicht lebensfähig sind oder von dem Muttertier gefressen werden. Neben der maternalen Unterscheidung von gesunden und kranken Nachkommen kann auch eine Unterernährung des Muttertieres zum Verlust des

Nachwuchses führen. So konnte bspw. bei den weiblichen UbC-IGF2BP2-Tieren zeitweise ein vermehrtes Auffressen der Neugeborenen beobachtet werden. Eventuell führte das durch IGF2BP2 verursachte Größenwachstum der Mäuse sowie auch der Nachkommen zu einer Unterversorgung der IGF2BP2-Weibchen mit dem üblichen Zuchtfutter, sodass diese durch das Fressen der Nachkommen ihren Proteinbedarf wieder zu decken versuchten. Ein eindeutiger Nachweis für dieses Verhalten bedarf jedoch einer sehr intensiven Beobachtung der Tiere und kann daher vorerst nicht erbracht werden. Eventuell führt das bereits embryonal verstärkte Größenwachstum der IGF2BP2-Tiere auch zu der beobachteten verminderten Anzahl von Jungtieren pro Wurf. Bezüglich der allgemeinen Lebenserwartung der transgenen Mäuse wurden zwar keine gezielten Versuche durchgeführt, dennoch lässt sich sagen, dass in jedem Stamm einige Tiere mindestens ein Alter von zwei Jahren erreichten.

Die ubiquitäre Expression der transgenen UbC-Konstrukte sowie die leberspezifische Expression der Alb-Konstrukte wurde sowohl auf RNA-Ebene mittels verschiedener PCR-Methoden als auch anhand der Proteinmengen mithilfe von *Western Blot* Analysen nachgewiesen (siehe Kapitel 4.4).

In allen UbC-Stämmen konnte die endogene IGF2BP2-mRNA gemessen und in den beiden IGF2BP2-Stämmen auch die Expression der exogenen humanen IGF2BP2-mRNA bestätigt werden. Die Leber, das weiße Fettgewebe sowie der Skelettmuskel wiesen im IGF2BP2_H-Stamm verglichen zum IGF2BP2_L-Stamm eine verhältnismäßig größere Menge der transgenen humanen IGF2BP2-mRNA auf. Ein Vergleich der Menge der endogenen mRNA mit deren Vorkommen in der naiven murinen Leberzelllinie AML12 verdeutlicht das vergleichsweise geringe Vorhandensein der IGF2BP2-mRNA in dem untersuchten Mausmodell (siehe Abb. 13). Zudem kann anhand dieser Befunde ein Rückschluss auf die Proteinmenge des IGF2BP2 in den Mäusen verglichen zu den AML12-Zellen gezogen werden. Die durchschnittlich 33-fach verminderte mRNA-Menge in den drei genannten Geweben der Tiere ist daher eine mögliche Erklärung für die meist nur schwachen Signale für das IGF2BP2-Protein im *Western Blot*. Während ca. 20 µg Gesamtprotein der AML12-Zellen ausreichten, um im *Western Blot* ein eindeutiges Signal zu detektieren (Daten nicht gezeigt), genügten 100 µg Gesamtprotein aus einem Gewebe nicht, um ein deutliches Signal zu erhalten. Daher war es auf konventionellem Wege mittels einer *Western Blot* Analyse nicht möglich, das endogene IGF2BP2-Protein im Gewebe nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde eine IGF2BP2-IP mit Gesamtprotein aus verschiedenen Geweben durchgeführt. Selbst nach einer Anreicherung des IGF2BP2-Proteins war eine Detektion des murinen endogenen Proteins in den Kontrolltieren schwierig. Die verstärkte Expression des IGF2BP2 in den beiden UbC-IGF2BP2-Stämmen zeigte sich jedoch eindeutig (siehe Abb. 14). Inwieweit sich die Proteinmengen von denen während der Embryonalentwicklung unterscheiden und ob die verstärkte Expression vor allem im IGF2BP2_H-Stamm noch im physiologischen Bereich liegt wurde bisher nicht weiter analysiert. Eine negative Auswirkung auf die Lebensqualität der Tiere scheint solch eine vermehrte Proteinmenge von IGF2BP2 jedoch nicht zu haben.

5.2 Beeinflussung des Glucose- und Energiestoffwechsels durch IGF2BP2

Die Überexpression des IGF2BP2-Proteins führte in den Mäusen zu einem eindeutigen metabolischen Phänotyp. Neben einer Reduktion der basalen Blutglucosemenge verbunden mit einer signifikanten Verminderung des Langzeitblutglucosewertes (HbA1c) konnte auch eine verbesserte Glucosetoleranz und Insulinsensitivität festgestellt werden. Dieser Effekt verstärkte sich nach der Durchführung einer 8-wöchigen HFD. Des Weiteren waren die Mäuse von Geburt an signifikant größer und wiesen auch erhöhte Organgewichte auf.

In einer aktuellen Publikation wurden die Ergebnisse von Versuchen mit Mäusen gezeigt, welche dem gleichen C57BL/6-Stamm angehören wie die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse, denen jedoch im Gegensatz zu unseren Tieren das IGF2BP2-Protein fehlte (IGF2BP2^{-/-}) [Dai *et al.* 2015]. Diese Tiere waren erwartungsgemäß kleiner, wobei sich der Größenunterschied erst durch eine verminderte Gewichtszunahme nach dem Absetzen der Mäuse, also im Alter von vier Wochen, manifestierte. Überraschenderweise besaßen die IGF2BP2-knockout Mäuse genau den gleichen Phänotyp einer verbesserten Glucosetoleranz wie unsere IGF2BP2-überexprimierenden Mäuse. Dai und Kollegen zeigten dies allerdings nur nach einer HFD-Behandlung ihrer Tiere. Neben einer unterschiedlichen Durchführung des Glucosetoleranztests muss in diesem Fall auch deren Mausmodell kritisch betrachtet werden. Der Verlust des IGF2BP2-Proteins wurde durch eine rekombinante Insertion in das zweite Exon der codierenden Sequenz erreicht, sodass die funktionelle Proteinstruktur im N-terminalen Bereich lediglich unterbrochen wurde [Dai *et al.* 2015]. Bisher wurden jedoch schon mehrere Isoformen des IGF2BP2-Proteins beschrieben. Neben der längsten und am häufigsten auftretenden Proteinvariante entstehen z.B. durch alternatives Spleißen das verkürzte p62-Protein sowie durch alternative Translationsinitiation eine N-terminal verkürzte p58-Isoform [Bell *et al.* 2013]. In murinen und humanen Zellen der Brustdrüse wurde auch für IGF2BP1 bereits eine kürzere Isoform beschrieben, welche trotz des Verlustes beider N-terminalen RRM-Domänen funktionell war und den durch das Fehlen der längsten Isoform auftretenden Phänotyp einer verminderten klonalen Aktivität kompensieren konnte [Fakhraldein *et al.* 2015]. Interessanterweise wurde der für die verkürzte Isoform verantwortliche potenzielle Transkriptionsstart im zweiten Intron des IGF2BP1-Gens identifiziert. Wie für IGF2BP2 bereits in Abb. 1 gezeigt, konnten auch für IGF2BP1 hoch konservierte Bereiche im zweiten und längsten Intron nachgewiesen werden, welche neben CpG-Inseln auch Histonmodifikationen aufweisen und daher mit dem Vorhandensein weiterer aktiver Promotoren assoziiert werden [Fakhraldein *et al.* 2015]. Das bedeutet, es existiert vermutlich eine bisher nicht vollständig charakterisierte Anzahl von verschiedenen IGF2BP-Isoformen, welche sich vornehmlich im N-terminalen Bereich der Proteinstruktur unterscheiden bzw. dieser völlig fehlt. Trotz des Nachweises des fehlenden IGF2BP2-Proteins im *Western Blot* bleibt offen, in welcher Region der von Dai und Kollegen eigens hergestellte Antikörper das IGF2BP2-Protein detektiert [Dai *et al.* 2015]. Ein negativer N-terminaler Proteinnachweis würde folglich keine Aussage über das Vorhandensein weiterer IGF2BP2-Varianten liefern, da eine Unterbrechung der codierenden Sequenz im zweiten Exon die Expression weiterer Proteinvarianten nicht ausschließt. In dem Transkript für die verkürzte IGF2BP1-Isoform, dem die ersten beiden Exons fehlen, wurde ein Startcodon identifiziert, welches die Translation im sechsten Exon des Gens initiieren könnte [Fakhraldein *et al.* 2015]. Eine Analyse verschiedener Isoformen von IGF2BP2 wurde in der Publikation von Dai und Kollegen nicht gezeigt. Neben der Frage, ob es sich also tatsächlich um einen vollständigen Verlust von IGF2BP2 handelt, zeigt auch das Signal für IGF2BP2 in der *Western Blot* Analyse erstens eine von uns nie nachweisbare hohe Intensität im Wildtyp-Tier und zweitens auch nicht das von uns beobachtete

charakteristische Bandenmuster, welches das Auftreten von mindestens zwei Isoformen des Proteins nachweist. Das deutet zudem darauf hin, dass der von Dai und Kollegen genutzte Antikörper nur eine Isoform detektiert bzw. vornehmlich im N-terminalen Bereich des Proteins bindet, während der von uns verwendete Antikörper den C-Terminus des Proteins detektiert und somit das Vorkommen mehrere Isoformen nachweisen kann. Der Vorteil des in dieser Arbeit analysierten Überexpressionsmodells zur Untersuchung der Proteinfunktion von IGF2BP2 liegt daher nicht nur darin, dass aufgrund der sehr schwer zu detektierenden Proteinmenge von IGF2BP2 im adulten Wildtyp-Tier eine Verstärkung der Proteinsynthese weitaus sinnvoller erscheint, sondern auch, dass die Synthese der humanen und am häufigsten exprimierten Proteinvariante des IGF2BP2 in den Mäusen forciert wurde. Eine vermehrte Expression der kürzeren p62-Isoform von IGF2BP2 ausschließlich in der Leber führte ebenso in Mäusen zu einer verbesserten Glucosetoleranz und bestätigt diesen Phänotyp in erster Linie für das Vorhandensein von IGF2BP2 und somit als Funktion des Proteins [Tybl *et al.* 2011]. Die Expression der Spleißvariante p62 war in den transgenen IGF2BP2-Mäusen basierend auf dem verwendeten artifiziellen DNA-Konstrukt nicht möglich. Eine alternative Translationsinitiation zur Generierung der p58-Isoform wäre jedoch denkbar, wurde aber nicht näher untersucht.

Die ubiquitäre Überexpression der vornehmlich längsten IGF2BP2-Isoform führte sowohl unter Standardbedingungen als auch nach einer HFD zu einer schnelleren Absenkung der Blutglucosekonzentration im OGTT einhergehend mit verminderten Insulinwerten. Die Menge an Glucose im Blut wird vornehmlich von den α - und β -Zellen im Pankreas kontrolliert und spiegelt den Nährstoff- und Energiestatus des Organismus wider. Das Verhältnis der beiden Hormone Insulin und Glucagon bestimmt somit das Ausmaß und die Richtung der einzelnen Stoffwechselwege, wie z.B. des Glucose- und Fettstoffwechsels. Ein Überschuss an Glucose führt zu einer verstärkten insulinvermittelten Einlagerung von Glykogen in die Leber. Interessanterweise zeigten nur die leberspezifischen Alb-IGF2BP2-Mäuse einen signifikant erhöhten Glykogengehalt in der Leber, jedoch nur nach einem erfolgten OGTT. Der anfänglich auch in diesen Mäusen beobachtete Trend einer verbesserten Glucosetoleranz bestätigte sich mit zunehmender Anzahl von Versuchstieren nicht. Ein Grund, warum in den UbC-IGF2BP2-Mäusen keine vermehrte Glykogenmenge in der Leber festgestellt werden konnte liegt vermutlich in dem Zusammenspiel weiterer IGF2BP2-überexprimierender Organe wie bspw. dem Skelettmuskel und dem Fettgewebe, welche die überschüssige Glucose rasch verbraucht haben könnten. Weiterhin lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Fähigkeit der UbC-IGF2BP2-Mäuse die Glucose schneller zu verstoffwechseln nicht allein durch die Leber bedingt ist. Eine Beeinflussung der endokrinen Funktion des Pankreas kann als Ursache für die beobachteten Veränderungen nahezu ausgeschlossen werden, da keine zur Blutglucosemenge inadäquat hohen Mengen an Insulin im Serum gemessen werden konnten und auch jegliche Berechnungen der Insulinsensitivität, -resistenz (HOMA-IR) sowie der Funktion der pankreatischen β -Zellen (HOMA-%B) keine Abweichungen zum Kontrollstamm aufwiesen. Eine schneller abfallende Glucosemenge im Blut hatte in den Tieren erwartungsgemäß auch eine schnellere Absenkung der Insulinkonzentration zur Folge. Im IPITT wurde unter Standardbedingungen keine veränderte Insulinwirkung der peripheren Gewebe festgestellt. Auch wenn IGF2BP2 keinen direkten Einfluss auf die Insulinsekretion hat, ist es dennoch in der Lage die Glucoseverstoffwechslung der Zellen vermutlich auf die gleiche Weise positiv zu beeinflussen und somit als eine Art intrazelluläres Insulin zu fungieren. In Zellkulturversuchen von Kolleginnen konnte infolge einer IGF2BP2-Überexpression neben einer verstärkten Glucoseaufnahme aus dem Medium auch eine gesteigerte Expression der mRNA von Enzymen der Glykolyse und Glykogensynthese sowie eine verminderte mRNA-Expression von Enzymen der Gluconeogenese festgestellt werden (unveröffentlichte Daten von Kristin Wächter und Marlen Mrotzek).

Des Weiteren führte IGF2BP2 zu einer vermehrten Phosphorylierung und damit Aktivierung der Kinase AKT, welche eine zentrale Stellung im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg einnimmt. Dabei spielt der Aktivitätsstatus von AKT eine entscheidende Rolle für den Stoffwechsel der Zellen, die Nährstoffverfügbarkeit, das Wachstum und die Proliferation [Lapante und Sabatini 2009]. Eine verbesserte Glucosetoleranz in Verbindung mit einer gesteigerten Aktivierung von AKT konnte auch in verschiedenen Tiermodellen, wie z.B. durch das gezielte Ausschalten der Phosphatase PTEN [Stiles *et al.* 2004] oder durch Überexpression der p62-Isoform [Tybl *et al.* 2011] gezeigt werden. In früheren Studien wiesen Dai und Kollegen bereits nach, dass IGF2BP2 nicht nur in der Lage ist an mTOR zu binden, sondern auch durch die mTOR-Komplexe 1 und 2 (mTORC1 und mTORC2) phosphoryliert wird [Dai *et al.* 2011, Dai *et al.* 2015]. Das legt nahe, dass IGF2BP2 nicht nur Substrat von mTOR ist, sondern möglicherweise auch die Aktivität der Kinase und somit den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg beeinflussen kann. Dieser regelt eine Vielzahl essentieller Funktionen wie z.B. den Zellzyklus, Translationsprozesse, Proliferation, Zellwachstum und Apoptose und wird durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen, Energieäquivalenten und Wachstumsfaktoren wie IGFs oder Insulin reguliert.

Ein weiterer zu beobachtender Phänotyp der UbC-IGF2BP2-Mäuse ist ihr gesteigertes Wachstum, das sowohl das Körpergewicht, das Gewicht der inneren Organe und das Längenwachstum (Scheitel-Steiß-Länge) betrifft. Dabei sind die Tiere durchschnittlich 5 - 10 % schwerer und mit 0,5 cm auch ca. 5 % länger als die Kontrollmäuse. Anhand der Zufuhr an Kalorien sowie der ausgeschiedenen Menge an Energie konnte eine grobe Berechnung des Energieumsatzes der Tiere durchgeführt werden. Aufgrund des Größenzuwachses der Tiere ergab sich durch ein signifikant günstigeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis auch ein verminderter Energieumsatz der IGF2BP2-Tiere, welcher die relativ reduzierte Futteraufnahme erklärt. In den IGF2BP2^{-/-}-Mäusen wurde wiederum, im Einklang mit unseren Ergebnissen, eine verminderte Körpermasse verbunden mit einem reduzierten Körperfettanteil festgestellt [Dai *et al.* 2015]. Als Ursache für das Wachstumsdefizit fanden die Forscher einen um 10 % gesteigerten Energieumsatz der Tiere, welcher angeblich durch eine verstärkte Expression des *uncoupling proteins* UCP1 bedingt ist. UCP1 wird in den Mitochondrien des braunen Fettgewebes exprimiert und dient der Entkopplung der Atmungskette zur Thermogenese. Eine verstärkte Expression und Aktivierung von UCP1 vermindert die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung und damit die Energiegewinnung in Form von ATP. Dai und Kollegen untersuchten in diesem Zusammenhang die Menge an mitochondrialer DNA und stellten fest, dass die Tiere ohne IGF2BP2 eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien aufwiesen und deuteten dies als eine Art Kompensationsmechanismus [Dai *et al.* 2015]. Einige Jahre zuvor wurde bereits berichtet, dass IGF2BP2 auch mRNAs bindet, die in den Prozess der oxidativen Phosphorylierung involviert sind [Boudoukha *et al.* 2010] sowie für Komponenten der Elektronentransportkette codieren. Ein Verlust von IGF2BP2 führte z.B. zu einer Aktivitätsminderung der Komplexe I und IV [Janiszewska *et al.* 2012]. In Glioblastomzellen konnte gezeigt werden, dass IGF2BP2 an mRNAs bindet, die für Untereinheiten des mitochondrialen Atmungskettenkomplexes IV codieren [Janiszewska *et al.* 2012]. Dabei wird vermutet, dass IGF2BP2 diese mRNAs in die Nähe der Mitochondrien bringt, wo ihre Translation und der Einbau in die Mitochondrienmembran erfolgen kann. Ebenso scheint IGF2BP2 an der Formierung des Komplexes I beteiligt zu sein, da eine Interaktion mit Proteinen aus Untereinheiten dieses Komplexes nachgewiesen werden konnte [Janiszewska *et al.* 2012]. Diese Studien legen nahe, dass IGF2BP2 die zelluläre Energieproduktion beeinflussen kann [Boudoukha *et al.* 2010, Janiszewska *et al.* 2012]. Daher scheint es durchaus plausibel, dass IGF2BP2 auch einen Einfluss auf den Stoffwechsel der Mitochondrien haben könnte. Dai und Kollegen postulierten folglich, dass der Verlust von IGF2BP2 die Translation der UCP1-mRNA forciert (ohne die mRNA-Menge selbst zu beeinflussen),

vermehrt UCP1-Protein gebildet wird, verbunden mit einer Verminderung der oxidativen Kapazität und diese wiederum ursächlich für die vermehrte Bildung von Mitochondrien ist, um den Energieverlust durch Wärme besser kompensieren zu können [Dai *et al.* 2015]. Unsere Analysen können diese Hypothese bisher allerdings nicht unterstützen. Zwar wurde in den RNA-Sequenzierungen im Skelettmuskel geschlechtsabhängig eine verminderte UCP1-Expression in den weiblichen UbC-IGF2BP2_H-Mäusen festgestellt und diese auch in qPCR-Messungen im weißen Fettgewebe bestätigt, allerdings konnten bisher weder veränderte Expressionslevel von UCP1 im *Western Blot* des braunen Fettgewebes der UbC-IGF2BP2-Tiere detektiert, noch die *in vitro* Luciferase-Versuche von Dai und Kollegen rekapituliert werden (unveröffentlichte Daten von Herrn Peter Zorn). Damit kann aus unseren bisherigen Ergebnissen der von Dai und Kollegen postulierte Mechanismus nicht bestätigt werden. Eine simplere Erklärung für den gestiegenen Energieumsatz der IGF2BP2^{-/-}-Tiere liefert, wie auch bei den Überexpressionsmäusen, das veränderte Wachstum der Tiere. Trotz der unveränderten absoluten Futterraufnahme diskutieren die Forscher nicht die auf das Körpergewicht der Tiere relativierte Nahrungszufuhr, die aufgrund des signifikant verminderten Gewichtes der Mäuse vermutlich erhöht war. Im Umkehrschluss könnte daher ein Fehlen von IGF2BP2 zu einem verminderten postnatalen Wachstum und damit einhergehend zu einem ungünstigeren Oberflächen-Volumen-Verhältnis führen. Das wiederum bedingt den gesteigerten Energieumsatz und die erhöhte Nahrungszufuhr. Eine veränderte basale Körpertemperatur, z.B. verursacht durch eine veränderte UCP1-bedingte Wärmeproduktion, konnte weder für die IGF2BP2^{-/-}-Mäuse [Dai *et al.* 2015] noch für unsere UbC-IGF2BP2-Tiere nachgewiesen werden. Dennoch bleibt ungeklärt, inwieweit eine veränderte Biogenese der Mitochondrien verbunden mit einem möglichen Anstieg von UCP1 den Stoffwechsel der IGF2BP2^{-/-}-Tiere beeinflusst. Als Ursache für den beobachteten Glucosephänotyp scheint UCP1 jedoch nicht in Frage zu kommen.

Ein bereits häufig beschriebenes Zieltranskript von IGF2BP2, welches letztlich auch für dessen Namensgebung verantwortlich war, ist die mRNA des vornehmlich embryonalen Wachstumsfaktors IGF2 [Nielsen *et al.* 1999, Dai *et al.* 2011]. Die Bindung von IGF2BP2 an den hoch strukturierten 5'UTR der IGF2 *leader 3*-mRNA und die damit verbundene IRES-vermittelte Initiation der IGF2-Translation wird durch eine von mTORC1 katalysierte doppelte Phosphorylierung am IGF2BP2 forciert [Dai *et al.* 2011]. Da die Aktivität von mTORC1 von der Aminosäureverfügbarkeit reguliert wird, sind auch die Phosphorylierungen von IGF2BP2 [Dai *et al.* 2011] und somit die Synthese von IGF2 und das embryonale Wachstum nährstoffabhängig, was bereits mehrfach gezeigt wurde [Kwong *et al.* 2006, Sharif *et al.* 2007]. Als mögliche Erklärung für den beobachteten Wachstumsphänotyp wurde daher zunächst eine vermehrte Synthese der Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2 vermutet. Interessanterweise zeigten sich weder veränderte Level von IGF1 und IGF2 im Serum der UbC-IGF2BP2-Tiere noch eine veränderte IGF2-Konzentration in deren Leber. In den IGF2BP2^{-/-}-Mäusen wurde lediglich die Menge von IGF1 im Serum gemessen und auch dabei keine Abweichung vom Wildtyp-Tier festgestellt [Dai *et al.* 2015]. In verschiedenen Studien der IGF2BPs wurden häufig widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der IGF2-Regulation veröffentlicht. Während das vermehrte Auftreten der p62-Isoform sowohl in der Leber der Maus als auch in humanen Proben des Hepatozellulären Karzinoms mit einer gesteigerten IGF2-mRNA-Menge korreliert wurde, gibt es keine Analysen, die einen direkten Einfluss auf eine gesteigerte Proteinsynthese des IGF2 nachweisen [Tybl *et al.* 2011, Kessler *et al.* 2013]. Auch in *in vitro* Untersuchungen der längsten IGF2BP2-Proteinvariante in Zellen des Rhabdomyosarkoms wurde lediglich mittels Luciferase-Versuchen eine gesteigerte Translation der IGF2-mRNA durch IGF2BP2 festgestellt [Dai *et al.* 2011]. Ein Ausschalten des IGF2BP2 in murinen Myoblasten zeigte in

qPCR-Messungen einen zweifachen Abfall der Menge der IGF2-mRNA [Boudoukha *et al.* 2010]. Erstaunlicherweise konnte in primären Myoblasten aus der Maus nicht einmal eine Bindung von IGF2BP2 an die IGF2-mRNA bestätigt werden [Li *et al.* 2012]. Dass eine veränderte mRNA-Menge nicht zwangsläufig eine veränderte Proteinmenge nach sich ziehen muss, wird durch die *in vivo* Studien von Tessier und Kollegen deutlich. Die Überexpression von IGF2BP1 in den Epithelzellen der Brustdrüsen von laktierenden Mäusen führte zwar zu einer Induktion der Transkription von IGF2, äußerte sich jedoch nicht in einer gesteigerten Proteinmenge [Tessier *et al.* 2004]. Als Ursache vermuteten die Forscher einen gesteigerten Transport des IGF2 aus den Zellen heraus oder einen verstärkten Abbau des Proteins, was sie durch die bereits nachgewiesene IGF2BP1-vermittelte Lokalisierung der IGF2-mRNA begründeten [Tessier *et al.* 2004]. In murinen embryonalen Fibroblasten sowie in Mäusen führte der Verlust von IGF2BP1 nicht zu einer veränderten mRNA-Menge des IGF2, aber zu einem verringerten Proteingehalt bzw. einer verringerten Translationseffizienz der IGF2-mRNA [Dai *et al.* 2013, Hansen *et al.* 2004]. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu den ersten *in vitro* Untersuchungen der IGF2BPs in denen gezeigt wurde, dass IGF2BP1 die Translation von IGF2 hemmt und somit die Proteinmenge des IGF2 in Anwesenheit von IGF2BP1 reduziert sein müsste [Nielsen *et al.* 1999]. Im Einklang damit zeigten Liao und Kollegen in Zellen der chronisch myeloischen Leukämie, dass das Fehlen von IGF2BP1 die mRNA- und Proteinmenge von IGF2 steigert [Liao *et al.* 2004]. Jedoch fanden sie keine veränderte Translationseffizienz und konnten ebenso keinen Einfluss auf den Abbau der mRNA nachweisen [Liao *et al.* 2004]. Auch für IGF2BP3, das dritte Mitglied der Proteinfamilie, wurde in humanen Tumoren eine positive Korrelation mit der Expression von IGF2 festgestellt [Liao *et al.* 2005, Suvasini *et al.* 2011]. Diese Analysen verdeutlichen die vielfältige und komplexe Regulation der IGF2-Synthese, welche sowohl einer strengen als auch dynamischen Kontrolle innerhalb der verschiedenen Entwicklungsstadien unterliegt. Dabei scheinen neben dem Entwicklungsstadium bzw. dem Alter der untersuchten Probe auch der Wirtsorganismus und sein Gesundheitszustand eine Rolle zu spielen. Das IGF2-Gen ist eine komplexe Transkriptionseinheit mit vier verschiedenen Promotoren [de Moor *et al.* 1995]. Jeder dieser Promotoren codiert für einen individuellen 5'UTR, den sogenannten *leader*. Das bedeutet, dass sich die verschiedenen IGF2-mRNAs zwar in ihrem 5'UTR unterscheiden, ihre codierende Sequenz sowie auch der 3'UTR jedoch identisch sind und sie daher alle für das gleiche IGF2-Protein codieren. Dass die Promotoren eine entwicklungsabhängige und gewebespezifische Expression aufweisen, verdeutlicht die enorme Relevanz der exakten aber auch unterschiedlichen Regulation der Synthese des Wachstumsfaktors. Für die IGF2BPs wurde vornehmlich eine Bindung an den 5'UTR der IGF2 *leader 3*-mRNA beschrieben [Nielsen *et al.* 1999, Liao *et al.* 2005, Dai *et al.* 2011]. Der verantwortliche Promotor ist jedoch in Feten und Neugeborenen, vor allem in der Leber, am aktivsten und seine Aktivität wird postnatal nach wenigen Monaten stark reduziert oder gewebeabhängig sogar ganz eingestellt [Li *et al.* 1997]. Nielsen und Kollegen konnten nachweisen, dass während der IGF2-Synthese ausgehend von *leader 4* die *leader 3*-mRNA untranslatiert in 100S RNP-Komplexen vorlag und eine erneute Aktivierung und damit Translation dieser mRNA nur in exponentiell wachsenden Zellen des Rhabdomyosarkoms erfolgte [Nielsen *et al.* 1995]. Das würde auch die erneute und verstärkte IGF2-Synthese in Tumoren, z.B. dem Hepatozellulären Karzinom, erklären [Thorgeirsson *et al.* 2002]. Davon abzugrenzen ist jedoch die Regulation der IGF2-Expression in gesunden adulten Zellen und Organismen, in denen vornehmlich die IGF2 *leader 4*-mRNA für eine konstitutive Expression von IGF2 sorgt [Nielsen *et al.* 1995]. Inwieweit die Regulation der IGF2 *leader 3*-mRNA durch IGF2BP2 unter diesen Bedingungen überhaupt eine Rolle spielt ist bisher ungeklärt. In fetalen sowie in Tumorgeweben scheinen möglicherweise ähnliche Voraussetzungen für eine Induktion der IGF2BP-Synthese sowie auch der Translationsinitiation der IGF2 *leader 3*-mRNA vorzuliegen, die von denen in gesunden Geweben

deutlich abweichen. Für IGF2BP1 wurde bereits gezeigt, dass die *in vitro* Situation genau den gegenteiligen Effekt zeigt, wie er im Mausmodell beobachtet wurde [Nielsen *et al.* 1999, Tessier *et al.* 2004]. Eine mögliche Erklärung liefert eine weitere Bindungsstelle im 3'UTR der IGF2-mRNA, welche für alle Transkripte identisch und möglicherweise für eine angemessene IGF2-Synthese von entscheidender Bedeutung ist [Hansen *et al.* 2004, Nielsen *et al.* 2004]. Ob eine Beeinflussung der Menge der IGF2-mRNA in den UbC-IGF2BP2-Mäusen vorliegt wurde bisher nicht untersucht. Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt ist die unterschiedliche Expression sowohl der Wachstumsfaktoren IGF1 und IGF2 in verschiedenen Entwicklungsstadien als auch zwischen Mensch und Nagetier [Nielsen 1992]. Während IGF2 seine Funktionen hauptsächlich in fetalen Entwicklungsphasen ausübt, scheint IGF1 diese oder vergleichbare Funktionen im adulten Organismus zu übernehmen. Die transkriptionelle Aktivität von IGF2 ist während der frühen Entwicklung hoch und nimmt nach der Geburt in nahezu allen Geweben stark ab [Nielsen 1992]. Dabei korreliert in Nagetieren das Serumlevel von IGF2 mit der Expression der IGF2-mRNA und ist daher in Feten hoch, nimmt zur Geburt hin ab und bleibt im adulten Stadium gering. Die IGF1-Menge hingegen ist in Feten gering, aber steigt während der Pubertät an und ist in adulten Ratten am höchsten [Nielsen 1992]. Im Menschen ist die IGF2-mRNA-Menge ebenso in Feten erhöht im Vergleich zu erwachsenen Personen. Das Serumlevel scheint jedoch nicht mit der Menge der IGF2-mRNA zu korrelieren und steigt im Gegensatz zur Ratte ausgehend vom Fetus mit zunehmendem Alter an [Nielsen 1992]. Der Grund für diese Diskrepanz könnte einerseits in der schnellen embryonalen Aufnahme sowie dem Abbau von IGF2 liegen, aber andererseits auch durch die unterschiedlich regulierte Translation der vornehmlich fetalen *leader 3*-mRNA bzw. der adult vorkommenden *leader 4*- und *leader 1*-mRNA in der Leber bedingt sein [Nielsen 1992]. Auch diese Befunde verdeutlichen die komplexe und streng regulierte Kontrolle der Expression dieser Wachstumsfaktoren. Über eine Regulation von IGF1 durch die IGF2BPs gibt es bisher keine Studien, was sicherlich nicht zuletzt durch die fehlende Expression von IGF2BP1 und IGF2BP3 in der adulten Maus begründet ist. Schließlich scheint die Überexpression von IGF2BP2 in den adulten UbC-Mäusen keine veränderte Menge von IGF2, und auch nicht von IGF1, im Serum oder der Leber zu verursachen. Die genaue Regulation der verschiedenen IGF2-Promotoren müsste unter den jeweiligen endogenen Bedingungen eingehender untersucht werden, um eventuelle Rückkopplungsmechanismen der anderen Promotoren sowie die Beeinflussung weiterer von IGF2BP2 kontrollierter Zieltranskripte in die Betrachtungen mit einbeziehen zu können. Der beobachtete Wachstumseffekt der UbC-IGF2BP2-Mäuse muss also eine komplexere Ursache haben, die jedoch den Einfluss von Wachstumsfaktoren wie IGF2 nicht generell ausschließt. Das Wachstumsdefizit der IGF2BP1-knockout Mäuse konnte auch nur indirekt durch eine mögliche Inhibierung der Translation von IGF2 erklärt werden, wobei keine veränderte mRNA-Menge von IGF2 oder IGF1 sowie des Wachstumshormons (GH) im Gehirn nachgewiesen werden konnte [Hansen *et al.* 2004].

Eine unmittelbare Beeinflussung der Expression von IGF2BP2 erfolgt durch den Transkriptionsfaktor HMGA2. Dieser forciert durch eine direkte Bindung im ersten Intron des IGF2BP2-Gens dessen Transkription [Cleyne *et al.* 2007]. Das Fehlen von HMGA2 führte in Mäusen zu einem Zwergenphänotyp [Zhou *et al.* 1995] verbunden mit einer gestörten Entwicklung des Muskelgewebes sowie einer verminderten Proliferation von Myoblasten [Li *et al.* 2012]. Ebenso konnten die Forscher eine Reduktion der mRNA-Menge von IGF2BP2 beobachten, wobei eine Detektion des Proteins im *Western Blot* nicht möglich war. Eine Überexpression von HMGA2 in Myoblasten zeigte jedoch sowohl eine erhöhte RNA- als auch Proteinmenge von IGF2BP2 [Li *et al.* 2012]. Die Forscher überexprimierten IGF2BP2 in HMGA2-knockout Myoblasten und beobachteten, dass IGF2BP2 den

zuvor beobachteten Phänotyp der gestörten Proliferation dieser Zellen größtenteils wieder aufhob. Ursächlich für die proliferationsfördernde Wirkung des IGF2BP2-Proteins war die ebenso veränderte Expression verschiedener Zieltranskripte von IGF2BP2, welche eine wichtige Rolle für das Wachstum der Zellen haben. So konnten Li und Kollegen ein vermindertes Proteinlevel von MYC, SP1 und IGF1R sowohl in IGF2BP2- als auch HMGA2-defizienten Myoblasten nachweisen. Eine Beeinflussung der mRNA-Menge dieser Transkripte blieb allerdings aus. Diese Studien belegen die essentielle Regulation sowie das Zusammenspiel von IGF2BP2 und HMGA2 und konnten zeigen, dass die in den HMGA2-knockout Mäusen beobachteten Wachstumseffekte vornehmlich durch das Fehlen von IGF2BP2 und folglich die verminderte Translation von Zieltranskripten verursacht wurden [Li *et al.* 2012]. Des Weiteren waren diese Wachstumseffekte unabhängig von der Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren, da in den untersuchten Myoblasten keine Bindung von IGF2BP2 an die IGF2-mRNA nachgewiesen werden konnte [Li *et al.* 2012]. Eine posttranskriptionelle Regulation von IGF2BP2 und HMGA2 wurde bereits für die miRNA let-7 durch deren Bindung im 3'UTR dieser mRNAs beschrieben [Zhu *et al.* 2011]. Die miRNA let-7 gehört zu einer gut untersuchten Familie von miRNAs, welche neben der Bedeutung für verschiedene Entwicklungsprozesse auch eine Rolle in der Entstehung von z.B. Tumoren spielt [Roush und Slack 2008]. Durch die Kontrolle der Expression von verschiedenen onkogenen Faktoren wird dieser miRNA eine tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben. Unterstützt wird dieser Aspekt weiterhin durch die negative Beeinflussung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges, welcher für den Glucosestoffwechsel sowie die Proliferation von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt. Dabei bindet und inhibiert die miRNA let-7 die Translation verschiedener Zieltranskripte wie z.B. IGF1R, INSR, IRS2, PI3KIP1, AKT2, TSC1 und RICTOR [Zhu *et al.* 2011]. Eine Überexpression von let-7b in Tumorzellen aus der Leber und der Lunge führte auch zu einer verminderten Expression des Transkriptionsfaktors HMGA2 sowie der RNA-bindenden Proteine LIN28B und IGF2BP1/2 [Boyerinas *et al.* 2008]. Untersuchungen in Tumorzellen von Hals-Kopf-Tumoren zeigten, dass eine Reduktion der miRNA let-7 zu einer gesteigerten IGF2BP2-Synthese führte, was ebenfalls eine direkte Regulation von IGF2BP2 durch diese miRNA bestätigt [Alajez *et al.* 2012]. In einem weiteren Mausmodell, wiesen Tiere mit einer Überexpression von LIN28A/B einen vergleichbaren Phänotyp auf, wie ihn auch die UbC-IGF2BP2-Tiere besitzen. Die LIN28-Mäuse sind größer und schlanker im Vergleich zu den Kontrolltieren, sind gegenüber der Entwicklung einer Fettleibigkeit während einer HFD resistent und weisen ebenso eine verbesserte Glucosetoleranz und Insulinsensitivität vor und nach einer HFD auf [Zhu *et al.* 2011]. Zur Familie der RNA-bindenden Proteine LIN28 gehören die beiden paralogen Proteine LIN28A und LIN28B, welche die Biogenese der miRNA let-7 blockieren und damit die Synthese von let-7 inhibieren [Piskounova *et al.* 2011]. LIN28 wird hauptsächlich embryonal gebildet und ist für die Koordination der zeitlichen Abläufe während der Entwicklung essentiell [Moss *et al.* 1997]. Seine Expression wird zudem let-7-abhängig reguliert und ist im adulten Organismus bis auf den Herz- und Skelettmuskel nahezu eingestellt [Shinoda *et al.* 2013, Yang und Moss 2003]. Erwartungsgemäß besaßen die LIN28-überexprimierenden Mäuse in den metabolisch wichtigen Organen wie der Leber, dem Skelettmuskel und dem Fettgewebe eine verminderte Menge der miRNA let-7 [Zhu *et al.* 2011]. Dabei konnten die Forscher weiterhin zeigen, dass umgekehrt eine vermehrte Synthese der miRNA let-7 in der adulten Maus zu einem Wachstumsdefizit, erhöhten Glucosekonzentrationen und einer verschlechterten Glucosetoleranz führte. Verantwortlich für die in den LIN28 und let-7 überexprimierenden Mäusen beobachteten Effekte ist eine Modulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges. Dabei führt LIN28 zu einer gesteigerten Phosphorylierung von AKT, S6K, EIF4EBP1, IGF1R und INSR. Eine zusätzliche Überexpression von let-7 in den LIN28-Mäusen schwächte die durch LIN28 vermittelte Phosphorylierung von AKT, S6K und 4EBP1 jedoch nur, sodass Zhu und Kollegen schlussfolgerten, dass die Effekte von LIN28 nur partiell durch

den Verlust der miRNA let-7 zu erklären sind und beide Faktoren unabhängig voneinander in der Lage sind den Glucosestoffwechsel durch eine gegenläufige Regulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges zu beeinflussen. Die in den meisten adulten Geweben beobachtete verminderte Expression von LIN28 sowie der Anstieg der miRNA let-7 im adulten Organismus lassen nicht nur eine strenge Regulation der Faktoren selbst, sondern auch eine an bestimmte zeitliche Entwicklungsphasen angepasste Kontrolle von Wachstum und Stoffwechsel vermuten [Zhu *et al.* 2011]. Die von Wachstumsfaktoren unabhängige Modulation des Wachstums und dessen enge Verknüpfung mit dem Metabolismus wird erneut dadurch bestärkt, dass sich die gesehenen Effekte in den LIN28-Tieren nicht durch die Abwesenheit von IGF2 veränderten [Zhu *et al.* 2011]. Das bedeutet, dass in diesem Fall IGF2 keinen Einfluss auf den ausgeprägten Phänotyp einschließlich des gesteigerten Größenwachstums der Tiere hatte, obwohl bereits gezeigt wurde, dass auch LIN28 die IGF2-mRNA bindet und ihre Translation forcieren kann [Polesskaya *et al.* 2007]. Wie schon erwähnt sind IGF2BP2 und HMGA2 auch Zieltranskripte der miRNA-Familie let-7. Eine *in vitro* Überexpression von LIN28 in Myoblasten und embryonalen Fibroblasten zeigte genau wie in den LIN28-Mäusen neben der Reduktion von let-7 auch eine gesteigerte Expression der mRNA aller IGF2BPs sowie von HMGA2 [Zhu *et al.* 2011]. Aufgrund dieser Studien lässt sich zunächst schlussfolgern, dass LIN28, HMGA2 und die IGF2BPs nicht nur während derselben Entwicklungsstadien exprimiert werden, sondern auch die gemeinsame Fähigkeit besitzen das Wachstum und somit die Körpergröße von Organismen zu kontrollieren [Jønson *et al.* 2014]. Der knockout von HMGA2, IGF2BP1 oder LIN28 führte in Mäusen jeweils zu einem Zwergenphänotyp [Zhou *et al.* 1995, Hansen *et al.* 2004, Zhu *et al.* 2011]. Mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen kann zudem bestätigt werden, dass auch IGF2BP2 das Wachstum signifikant beeinflusst und in unserem Überexpressionsmodell zu einem vermehrten Größenwachstum der Tiere führte. Eine weitere Gemeinsamkeit von HMGA2, LIN28 und den IGF2BPs ist ihre Regulation durch miRNAs, wie z.B. durch die miRNA let-7. Aber wie beeinflussen sich diese Faktoren gegenseitig? Für IGF2BP3 konnte bereits gezeigt werden, dass es die Aktivitäten der drei anderen Faktoren koordinieren kann, indem es die mRNAs von HMGA2 und LIN28 in RNPs einbindet und diese so vor einer Bindung durch die miRNA let-7 und damit vor dem Abbau schützt [Jønson *et al.* 2014]. Dass der bei einer Überexpression von IGF2BP3 beobachtete Anstieg der LIN28-mRNA durch eine Behinderung des let-7-vermittelten Abbaus resultiert, bewiesen Jønson und Kollegen dadurch, dass ein durch den Verlust der miRNA let-7 induzierter Anstieg von LIN28 nicht durch eine zusätzliche Überexpression von IGF2BP3 gesteigert werden konnte. Aktuelle Studien unserer Arbeitsgruppe untersuchten das Wechselspiel zwischen HMGA2, LIN28 und IGF2BP1 und fanden eine Art Dreiecksbeziehung, da sich die drei Komponenten gegenseitig beeinflussen [Busch *et al.* 2016]. In Zellen des Ovarialkarzinoms konnte nicht nur gezeigt werden, dass die Expression der IGF2BPs, vornehmlich von IGF2BP1, entscheidend von der Menge der miRNA let-7 abhängt, sondern auch, dass die Familie der miRNA let-7 eine wichtige Rolle in der posttranskriptionellen Regulation von LIN28 und HMGA2 spielt. Was bereits für IGF2BP3 beobachtet werden konnte, wurde nun auch für IGF2BP1 bestätigt. Das Protein ist in der Lage mRNAs, wie die von HMGA2, LIN28 und sogar IGF2BP1 selbst, in mRNPs einzubinden und diese somit vor einem miRNA-vermittelten Abbau zu schützen [Busch *et al.* 2016]. Eine Überexpression von IGF2BP1 führte zu einer mRNA-Bindung und einem dosisabhängigen Anstieg der Proteine von LIN28, HMGA2 und IGF2BP1 selbst. Erstaunlicherweise traten diese Effekte nicht in Abwesenheit der miRNA let-7 ein, sodass geschlussfolgert werden konnte, dass die Beeinträchtigung der durch let-7 vermittelten Funktionen eine Voraussetzung für die beobachteten Effekte ist. Auch eine Überexpression von LIN28 führte zu einem Anstieg der IGF2BP1- und HMGA2-Proteinmenge, wobei HMGA2 lediglich die Expression von IGF2BP1 forcierte [Busch *et al.* 2016]. Das Zusammenspiel dieser drei Faktoren sowie die damit verbundene Inhibierung

der tumorsuppressiven Wirkungen der miRNA let-7 scheinen das onkogene Potenzial in Tumorzellen maßgeblich zu fördern [Busch *et al.* 2016]. Neben IGF2BP1 konnte auch eine gesteigerte Expression von HMGA2 und LIN28 durch IGF2BP2 gezeigt werden. Diese experimentellen Befunde, die vorhandene Sequenzhomologie sowie die Identifizierung derselben RNA-bindenden Motive [Hafner *et al.* 2010] bestärken die Hypothese der redundanten Funktionsweise der paralogen IGF2BP-Familienmitglieder. Wie bereits für IGF2BP1 und IGF2BP3 gezeigt, kann also auch für IGF2BP2 eine schützende Rolle gegenüber dem miRNA-vermittelten Abbau seiner Ziel-mRNAs angenommen werden [Jønson *et al.* 2014, Busch *et al.* 2016]. Ausschlaggebender für die Erfüllung ihrer Funktionen ist jedoch die zeitlich regulierte Expression der Proteine sowie das Vorhandensein der jeweiligen Kooperationspartner. Während für IGF2BP1 und IGF2BP3 eine verstärkte adulte Expression hauptsächlich in entarteten Zellen nachgewiesen wurde, scheint IGF2BP2 seine Funktionen durch eine moderate Expression in gesunden adulten Geweben auszuüben [Bell *et al.* 2013]. Unterstützt wird diese Annahme durch eine vergleichbare onkofetale Expression von LIN28 [Yang *et al.* 2003] und HMGA2 [Zhou *et al.* 1996] sowie das gegensätzliche Auftreten der miRNA let-7, deren Expression erst mit fortschreitender Entwicklung zunimmt [Nishino *et al.* 2013]. Das *in vitro* beschriebene potenzielle Zusammenspiel der IGF2BPs mit LIN28 und HMGA2 kann also vermutlich auch durch die Überexpression von IGF2BP2 im Organismus beeinflusst und aus dem Gleichgewicht gebracht werden, da IGF2BP2 prinzipiell in der Lage ist, die Expression von HMGA2 und LIN28 zu forcieren [Busch *et al.* 2016]. In welcher Form dies geschieht, ob durch eine direkte Bindung der mRNAs oder das Einbinden in schützende mRNPs ist bisher ungeklärt. Der entscheidende Aspekt liegt jedoch in der antagonistischen Wirkung der IGF2BPs gegenüber der let-7 miRNA-Familie und der damit einhergehenden Beeinflussung der durch diese miRNAs regulierten Effekte, unabhängig davon, ob es durch das gesteigerte LIN28-Vorkommen zu einer verminderten Biogenese von let-7 kommt oder deren Ziel-mRNAs durch die von IGF2BP2 möglicherweise forcierte mRNP-Bildung geschützt werden. Eine erste Analyse von Zieltranskripten der Familie der miRNA let-7 in den RNA-Sequenzierungsdaten aus dem Fettgewebe der UbC-IGF2BP2-Tiere geben weitere Hinweise auf eine Beteiligung von let-7 an den Phänotypen. Dazu wurde eine Abfrage verschiedener Datenbanken, welche Informationen zu bereits experimentell ermittelten miRNA-mRNA-Interaktionen enthalten, mithilfe des R-Paketes multiMiR [Ru *et al.* 2014] in Version 1.0.1 durchgeführt. Von den 2675 differenziell exprimierten mRNAs im Fettgewebe der Mäuse nach der HFD wurden 931 validierte miRNA-mRNA-Interaktionen aufgezeigt. Speziell für eine Interaktion mit den miRNAs der let-7-Familie konnten insgesamt 34 verschiedene Ziel-mRNAs identifiziert werden. Davon sind 28 mRNAs aufgrund der Überexpression von IGF2BP2 verstärkt exprimiert, darunter auch Lin28A, und nur sechs mRNAs vermindert exprimiert. Diese Befunde bestätigen zunächst die Hypothese, dass IGF2BP2 antagonistisch zur miRNA let-7 wirkt. Die damit verbundene Aufhebung der Inhibierung verschiedenster Zieltranskripte der miRNA let-7 führt zu einer gesteigerten Aktivität z.B. des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges und somit nicht nur zu einer Beeinflussung des Stoffwechsels und Energiehaushaltes, sondern auch der Proliferation und dem Wachstum [Zhu *et al.* 2011]. Während die miRNA let-7 im gesunden adulten Organismus notwendig für eine normale Glucosehomöostase ist und durch ihre Inhibierung in entarteten Zellen die Verstoffwechslung von Glucose forciert wird, wird für die UbC-IGF2BP2-Mäuse lediglich eine moderat verminderte Menge von let-7 mit als Ursache der verbesserten Glucosetoleranz sowie des gesteigerten Wachstums in Betracht gezogen. Das Antreiben des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges wird nicht nur durch eigene *in vitro* Expressionsanalysen von IGF2BP2 aufgrund einer gesteigerten AKT-Phosphorylierung, sondern auch von anderen *in vivo* Mausmodellen suggeriert, die z.B. durch einen Knockout von PTEN oder die Überexpression von p62 sowie LIN28 einen vergleichbaren oder entgegengesetzten Phänotyp aufwiesen [Stiles *et al.* 2004, Tybl *et al.* 2011, Zhu *et al.* 2011]. In Zellen

des Hepatozellulären Karzinoms wurde ebenso der fördernde Einfluss einer vermehrten IGF2BP2-Synthese auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg bestätigt, indem eine gesteigerte Phosphorylierung von AKT, mTOR und ERK beobachtet werden konnte [Liu *et al.* 2015]. Da bereits bekannt ist, dass IGF2 im Hepatozellulären Karzinom vermehrt gebildet wird [Cariani *et al.* 1988], nahmen Liu und Kollegen an, dass die Modulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges aus der gesteigerten IGF2-Menge resultierte. Allerdings wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht, ob die vermehrte IGF2-Produktion eine Konsequenz des Anstieges von IGF2BP2 ist oder eine Deregulierung anderer Mechanismen dafür ursächlich ist [Liu *et al.* 2015]. Des Weiteren ist zu bedenken, dass IGF2 in vielen Tumoren dereguliert ist, was vermutlich durch die Nutzung embryonaler Mechanismen in entarteten Zellen begründet ist, welche im adulten und gesunden Organismus keine Rolle spielen. Möglich wäre auch eine Kombination beider Mechanismen, die in den UbC-IGF2BP2-Tieren das Größenwachstum bedingen. So könnte IGF2 während der embryonalen Entwicklung zu einem vermehrten Wachstum führen, wobei für IGF2BP1 auch eine Beeinflussung des Wachstums in Stammzellen gezeigt wurde [Nishino *et al.* 2013], und mit zunehmendem Alter der Tiere wird dieser ursprünglich embryonale Effekt durch eine Modulation für den Stoffwechsel wichtiger Signalwege aufrechterhalten, was die unveränderte Menge der IGFs in der adulten Maus erklären würde.

Neben einer verbesserten Glucosetoleranz und dem gesteigerten Wachstum zeigten die ubiquitär IGF2BP2-überexprimierenden Mäuse auch eine Resistenz gegenüber den Folgen einer HFD. Sie nahmen im Vergleich zu den Kontrolltieren wesentlich weniger an Gewicht zu, trotz einer unveränderten Kalorienzufuhr und einem verminderten Energieumsatz. Die gewählte Art der HFD stellt eine geeignete Methode dar, um bei den Tieren in relativ kurzer Zeit eine Fettleibigkeit zu induzieren, verbunden mit ersten Anzeichen metabolischer Erkrankungen wie z.B. eines T2DM [Pacini *et al.* 2013, Wang und Liao 2012]. In den Kontrollmäusen konnte das Ausmaß dieser Folgen im Vergleich zu den UbC-IGF2BP2-Tieren verstärkt beobachtet werden. Die gefasteten Tiere wiesen signifikant höhere Glucosekonzentrationen im Blut auf und zeigten auch im OGTT eine deutlich verschlechterte Glucosetoleranz im Vergleich zu den Kontrollmäusen unter Standarddiät. Der hohe Anteil an Fett im Futter verursachte bei ihnen in wesentlich kürzerer Zeit eine Fettleibigkeit verbunden mit der beginnenden Entwicklung eines T2DM. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass IGF2BP2 den Tieren einen gewissen Schutz vor der Entwicklung einer Fettleibigkeit verleiht, verbunden mit einem verminderten T2DM-Risiko. Das wird auch durch die verbesserte Insulinsensitivität der peripheren Organe verdeutlicht und lässt neben der Beeinflussung des Glucosestoffwechsels durch IGF2BP2 auch eine Modulation im Fettstoffwechsel vermuten. Bei den Transkriptomanalysen zeigte sich dies dadurch, dass unabhängig von der Diät der Mäuse die stärkste Veränderung der Expression im Fettgewebe erfolgte. Dass es auch eine Verbindung zwischen IGF2BP2 und dem Fettstoffwechsel gibt, konnte in Studien mit der verkürzten p62-Isoform bereits nachgewiesen werden. Die selektive Überexpression von p62 in der Leber forcierte die Entstehung einer Steatose [Tybl *et al.* 2011]. Die molekulare Ursache für die Akkumulation von Fett in der Leber fanden die Forscher in einer von p62 vermittelten Modulation lipogener Transkriptionsfaktoren wie bspw. dem *carbohydrate responsive element binding protein* (ChREBP, auch bekannt als MLXIPL) und dem *sterol regulatory element binding transcription factor 1* (SREBP1), deren Synthese durch Glucose oder Insulin stimuliert wird und die eine wichtige Funktion in der Regulation des Fettstoffwechsels haben [Laggai *et al.* 2014]. In den transgenen p62-Mäusen führte die vermehrte Synthese von SREBP1 zu einem Anstieg der Fettsäure-Elongase ELOVL6, welche die Elongation von C16-Fettsäuren zu C18-Fettsäuren katalysiert. Die vermehrte Synthese von C18-Fettsäuren und der damit

verbundene Abfall der C16-Menge veränderte folglich das Fettsäureprofil der Mäuse. Es ist bekannt, dass pathologische Mechanismen neben einer variierenden Menge der Fettsäuren im Organismus hauptsächlich durch Veränderungen im Verteilungsmuster der Fette verursacht werden. Dabei können die Fettsäuren selbst eine aktivierende oder inhibierende Wirkung auf essentielle Enzyme der Fettsäuresynthese oder der β -Oxidation haben. Für die Palmitoleinsäure (C16:1) wurde bereits ein stimulierender Effekt auf die Insulinwirkungen im Muskel sowie eine Beeinflussung der Ablagerung von Fett in der Leber gezeigt und diese Fettsäure folglich als wichtiges Lipidhormon eingestuft [Cao *et al.* 2008]. Für die in den p62-Mäusen beobachteten Effekte konnte letztlich postuliert werden, dass aufgrund der Verminderung der Menge der C16-Fettsäuren die Fettsäuresynthese forciert und gleichermaßen durch den verminderten Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien die β -Oxidation inhibiert wird [Laggai *et al.* 2014]. Interessanterweise konnten die Forscher keine veränderte Menge an Triacylglycerinen oder Cholesterin im Serum der Tiere nachweisen. Das deckt sich mit den unveränderten Triacylglycerinkonzentrationen im Serum sowie der Leber und im Skelettmuskel der UbC-IGF2BP2-Mäuse und legt nahe, dass die absolute Menge an Triacylglycerinen nur bedingt einen Rückschluss auf Veränderungen im Fettstoffwechsel zulässt. Das konnte auch in Tieren beobachtet werden, denen die Fettsäure-bindenden Proteine 4 und 5 (*fatty acid binding protein*, FABP) fehlten [Maeda *et al.* 2005]. Die Tiere zeigten ein vermehrtes Vorkommen kürzerer Fettsäuren (C14 bis C16) und waren vor einer Fettleibigkeit, Insulinresistenz, T2DM sowie vor einer Steatose geschützt. Die Forscher fanden zwar eine 4-fach erhöhte Menge an Palmitoleinsäure, aber die Tiere wiesen ebenso keine veränderte Menge an freien Fettsäuren im Blut auf [Maeda *et al.* 2005]. Daraus schlussfolgerten sie, dass der Transport und die Verfügbarkeit von freien Fettsäuren für die einzelnen Gewebe und die durch sie induzierten zellulären Reaktionen entscheidender für die Regulation des Stoffwechsels sind, als die absolute Konzentration im Serum [Maeda *et al.* 2005]. ELOVL6^{-/-}-Tiere zeigten ähnliche Effekte, trotz der unveränderten Anfälligkeit für eine Steatose oder Fettleibigkeit [Matsuzaka *et al.* 2007]. Auch in den beiden genannten Tiermodellen wurde die verbesserte Glucosetoleranz bzw. erhöhte Insulinsensitivität mit einer vermehrten AKT-Phosphorylierung und folglich einem forcierten PI3K/AKT/mTOR-Signalweg begründet. Dabei wird deutlich, dass auch eine Modulation im Fettstoffwechsel, z.B. durch das verstärkte Auftreten kurzkettiger Fettsäuren, die Insulinwirkung und damit den Glucosestoffwechsel deutlich beeinflussen kann, unabhängig von der Ausbildung einer Steatose oder Fettleibigkeit [Maeda *et al.* 2005, Matsuzaka und Shimano 2009]. Die UbC-IGF2BP2-Tiere zeigten während und nach der HFD eindeutig sowohl eine Resistenz gegenüber der Ausprägung einer Fettleibigkeit als auch eine verbesserte Insulinsensitivität im Vergleich zu den Kontrolltieren. In den RNA-Sequenzierungen im Fettgewebe nach der HFD konnte eine signifikant verminderte Expression von FABP5 und eine vermehrte Expression von FABP1 sowie der Elongasen ELOVL2 und ELOVL7 festgestellt werden (FDR < 0,1). Trotz keiner differenziellen Expression der lipogenen Transkriptionsfaktoren SREBP1/2 und ChREBP zeigen auch die Ergebnisse der Clusteranalysen in den verschiedenen Kategorien eine eindeutige Beeinflussung des Lipidstoffwechsels in den UbC-IGF2BP2-Mäusen. Ein Großteil der differenziell exprimierten Gene ist in den Zyklus der Lipoprotein-Partikel, welche entscheidend für den Transport und die Verteilung der Fette im Organismus sind, aber auch direkt in den Stoffwechsel verschiedener Fettsäuren sowie der Biosynthese von Steroidhormonen involviert. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass auch die Veränderungen im Fettstoffwechsel der UbC-IGF2BP2-Mäuse einen entscheidenden Beitrag zu dem beobachteten Phänotyp der Mäuse leisten. Eingehendere Analysen sowie eine Validierung der mRNA-basierten Ergebnisse sind daher von enormer Bedeutung, um die durch IGF2BP2 verursachten molekularen Veränderungen greifbar zu machen und letztlich deren Konsequenz für den Stoffwechsel zu verstehen.

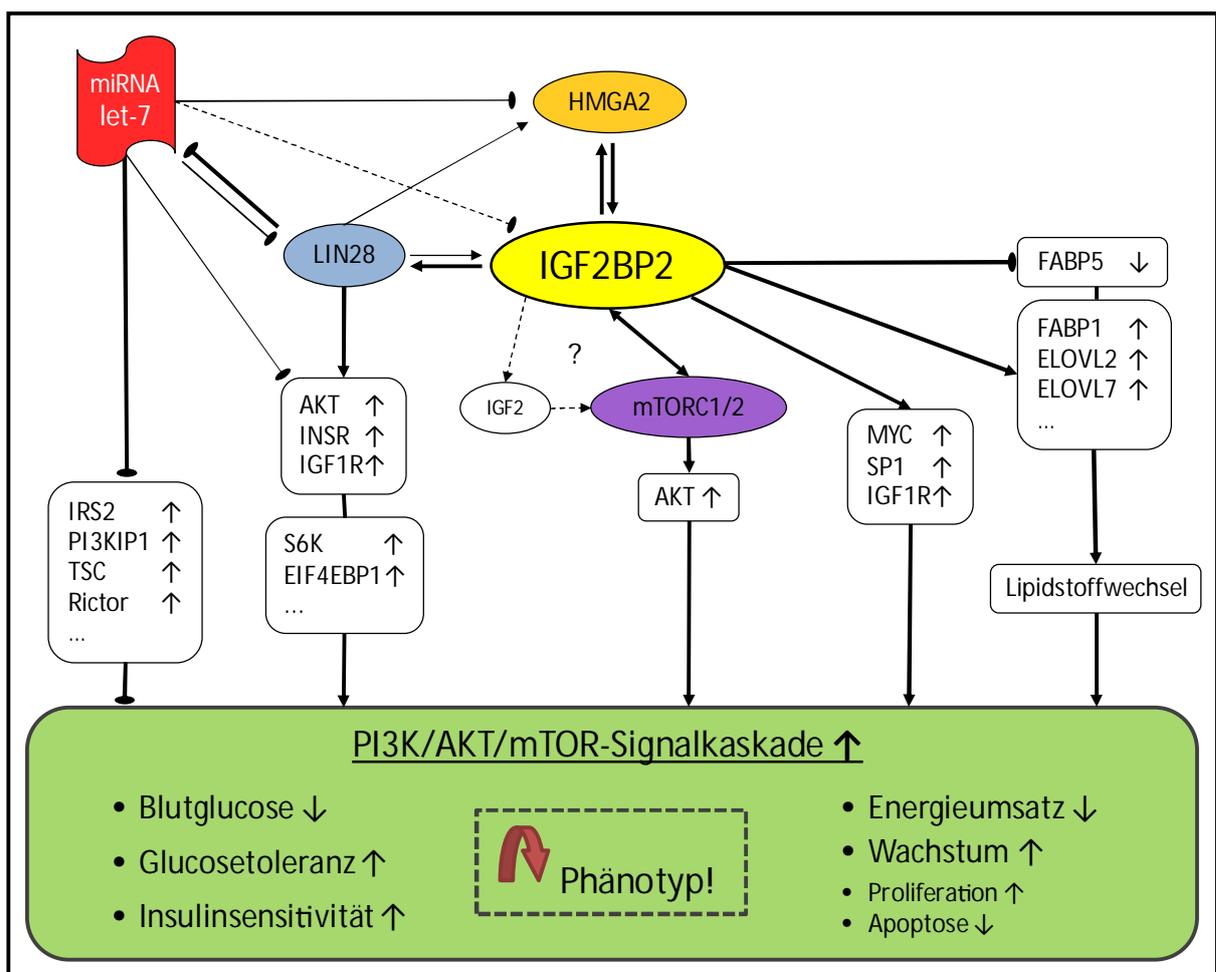


Abb. 36: Hypothetische Zusammenfassung der molekularen Wechselwirkungen von IGF2BP2

Schematische Darstellung der Expressionsregulation von IGF2BP2 und seinen Zieltranskripten. Spitze Pfeile symbolisieren eine aktivierende, abgerundete Pfeile eine inhibierende Wirkung, wobei die Stärke der Linien die Relevanz der von IGF2BP2 ausgehenden Regulationen verdeutlicht und die gestrichelten Pfeile hypothetisch sind. Pfeile innerhalb der Boxen symbolisieren eine durch IGF2BP2 ausgelöste aktivierende (↑) oder inhibierende (↓) Wirkung zum einen auf die Translation der aufgelisteten Ziel-mRNAs und zum anderen auf die phänotypischen Ausprägungen innerhalb der grünen Box. IGF2BP2 fördert die Translation von HMGA2 und LIN28, was entweder direkt durch eine gesteigerte Translation oder durch den Schutz der mRNAs vor einem let-7-vermittelten Abbau erfolgt. LIN28 inhibiert wiederum die Biogenese der miRNA let-7, welche ihre suppressive Wirkung nicht mehr ausüben kann. Die Auswirkungen einer gesteigerten IGF2BP2-Synthese auf verschiedenste Zieltranskripte führen in der Summe zu einer Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges, wodurch sich die beobachteten Phänotypen in dem hier untersuchten transgenen Mausmodell erklären würden.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mithilfe von transgenen Mäusen die Funktionen der IGF2BPs, speziell von IGF2BP2, durch deren konstitutive Überexpression im Organismus aufklären zu können. Neben zahlreichen deskriptiven genomischen Korrelationsstudien konnte auch in ersten *in vivo* Untersuchungen eines Knockouts von IGF2BP2 ein tatsächlicher Einfluss des Proteins auf den Stoffwechsel der Tiere belegt werden. Daher stellte sich die Frage, ob eine vermehrte Synthese der humanen Variante des in der adulten Maus eher gering exprimierten IGF2BP2-Proteins den Glucosestoffwechsel positiv beeinflussen kann und somit eine therapeutische Relevanz für die Behandlung von Stoffwechselstörungen haben könnte. Zur Klärung dieser Frage wurden erstmalig transgene Mäuse mit einer verstärkten ubiquitären Expression des humanen IGF2BP2, aber auch Mausstämme mit einer leberspezifischen Überexpression der humanen IGF2BPs etabliert und charakterisiert. Eine auf die Leber beschränkte Expression von IGF2BP1, IGF2BP2 oder IGF2BP3 führte in den Tieren kaum zu Veränderungen. Im Gegensatz dazu resultierte eine ubiquitär in allen Organen vermehrte IGF2BP2-Expression in einer Vielzahl an phänotypischen Veränderungen in Bezug auf die Glucosehomöostase sowie das Wachstum der Mäuse.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das mRNA-bindende Protein IGF2BP2 ein essentieller Modulator für den Glucose- und Fettstoffwechsel ist und ebenso das Wachstum von Zellen und Organismen entscheidend beeinflussen kann. Die UbC-IGF2BP2-Mäuse waren bereits im Alter von fünf Tagen signifikant größer im Vergleich zu den Kontrolltieren und wiesen auch im Alter von einem Jahr neben einem signifikant gesteigertem Körpergewicht und einer verlängerten Tibia signifikant erhöhte Organgewichte sowie ein signifikant verstärktes Längenwachstum auf. Aufgrund dieser Größenzunahme der Mäuse verglichen zu den Kontrollen verminderte sich ihr täglicher Energieumsatz. Neben dem Wachstumsphänotyp konnte in den IGF2BP2-Tieren auch eine signifikant verbesserte Glucosetoleranz während des OGTT einhergehend mit signifikant verminderten Insulinwerten festgestellt werden sowie eine unveränderte Menge an Glykogen in Leber und Skelettmuskel. Diese Befunde wurden während der Durchführung einer Hochfettdiät weiter verstärkt. Eine täglich erhöhte Kalorienzufuhr führte in den IGF2BP2-Mäusen zu einem verminderten Gewichtszuwachs und resultierte auch in einer verminderten Glucosebelastung im OGTT sowie einer im IPITT gemessenen signifikant verbesserten Insulinwirkung. Diese Ergebnisse suggerieren ein durch IGF2BP2 ausgelöstes verzögertes Auftreten einer Adipositas sowie Insulinresistenz verbunden mit einem verminderten Risiko einen Typ 2 Diabetes mellitus zu entwickeln. Demnach kann dem humanen IGF2BP2-Protein ein intrinsischer Effekt zugeschrieben werden, welcher sich in einer insulinähnlichen Modulation des Glucosestoffwechsels äußert. IGF2BP2 wirkt also physiologisch gesehen als eine Art intrazelluläres Insulin, da es ohne die Insulinhomöostase selbst zu beeinflussen zu vergleichbaren Effekten führt.

Bisher sind die molekularen Mechanismen und Zieltranskripte von IGF2BP2, deren Modulationen ausschlaggebend für die beobachteten Phänotypen sind, weitestgehend unbekannt. Dennoch lässt sich aus den Ergebnissen schlussfolgern, dass IGF2BP2 seine pleiotropen Funktionen organspezifisch zum einen durch eine Beeinflussung der Translation verschiedenster mRNAs, einschließlich einiger für den Glucose- und Fettstoffwechsel essentieller Transkriptionsfaktoren und zum anderen durch die Inhibierung der normalerweise antagonistischen Wirkungen z.B. der miRNA let-7 erfüllen kann. Eine Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Veränderungen ist von großer medizinischer Bedeutung, um einen tieferen Einblick in die pathologischen Mechanismen der Entstehung eines metabolischen Syndroms einschließlich eines Typ 2 Diabetes mellitus zu erhalten, dessen Ausprägung das humane IGF2BP2 scheinbar zu verlangsamen vermag.

7 Literaturverzeichnis

- Ahn S-M, Byun K, Cho K, Kim JY, Yoo JS, Kim D, Paek SH, Kim SU, Simpson RJ, Lee B. 2008. Human Microglial Cells Synthesize Albumin in Brain. *PLoS ONE* 3: e2829.
- Alajez NM, Shi W, Wong D, Lenarduzzi M, Waldron J, Weinreb I, Liu F-F. 2012. Lin28b Promotes Head and Neck Cancer Progression via Modulation of the Insulin-Like Growth Factor Survival Pathway. *Oncotarget* 3: 1641-1652.
- Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. 2008. Genetic Mapping in Human Disease. *Science (New York, NY)* 322: 881-888.
- Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F *et al.* 2010. Duale Reihe Physiologie. *Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart*.
- Bell J, Wächter K, Mühleck B, Pazaitis N, Köhn M, Lederer M, Hüttelmaier S. 2013. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci* 70: 2657-2675.
- Bernstein PL, Herrick DJ, Prokipcak RD, Ross J. 1992. Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes & Development* 6: 642-654.
- Blackburn A, Dressendorfer R, Blum W, Erhard M, Brem G, Strasburger C, Wolf E. 1997. Interactions of insulin-like growth factor (IGF)-II and growth hormone in vivo: circulating levels of IGF-I and IGF-binding proteins in transgenic mice. *European Journal of Endocrinology* 137: 701-708.
- Boguski MS. 2002. Comparative genomics: The mouse that roared. *Nature* 420: 515-516.
- Boudoukha S, Cuvellier S, Polesskaya A. 2010. Role of the RNA-Binding Protein IMP-2 in Muscle Cell Motility. *Molecular and Cellular Biology* 30: 5710-5725.
- Boudoukha S, Rivera Vargas T, Dang I, Kropp J, Cuvellier S, Gautreau A, Polesskaya A. 2014. MiRNA let-7g regulates skeletal myoblast motility via Pinch-2. *FEBS Letters* 588: 1623-1629.
- Boyerinas B, Park S-M, Shomron N, Hedegaard MM, Vinther J, Andersen JS, Feig C, Xu J, Burge CB, Peter ME. 2008. Identification of Let-7-Regulated Oncofetal Genes. *Cancer Research* 68: 2587-2591.
- Brants JR, Ayoubi TAY, Chada K, Marchal K, Van de Ven WJM, Petit MMR. 2004. Differential regulation of the insulin-like growth factor II mRNA-binding protein genes by architectural transcription factor HMGA2. *FEBS Letters* 569: 277-283.
- Busch B, Bley N, Müller S, Glaß M, Misiak D, Lederer M, Vetter M, Strauß H-G, Thomssen C, Hüttelmaier S. 2016. The oncogenic triangle of HMGA2, LIN28B and IGF2BP1 antagonizes tumor-suppressive actions of the let-7 family. *Nucleic Acids Research*.
- Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. 2008. Identification of a Lipokine, a Lipid Hormone Linking Adipose Tissue to Systemic Metabolism. *Cell* 134: 933-944.
- Capecchi MR. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288-1292.
- Cariani E, Lasserre C, Seurin D, Hamelin B, Kemeny F, Franco D, Czech MP, Ullrich A, Brechot C. 1988. Differential Expression of Insulin-like Growth Factor II mRNA in Human Primary Liver Cancers, Benign Liver Tumors, and Liver Cirrhosis. *Cancer Research* 48: 6844-6849.
- Chao JA, Patskovsky Y, Patel V, Levy M, Almo SC, Singer RH. 2010. ZBP1 recognition of β -actin zipcode induces RNA looping. *Genes & Development* 24: 148-158.
- Chistiakov DA, Nikitin AG, Smetanina SA, Bel'chikova LN, Suplotova LA, Shestakova MV, Nosikov VV. 2012. The rs11705701 G>A Polymorphism of IGF2BP2 is Associated With IGF2BP2 mRNA and Protein Levels in the Visceral Adipose Tissue - A Link to Type 2 Diabetes Susceptibility. *The Review of Diabetic Studies : RDS* 9: 112-122.
- Cho YM, Kim TH, Lim S, Choi SH, Shin HD, Lee HK, Park KS, Jang HC. 2008. Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. *Diabetologia* 52: 253-261.

- Christiansen J, Kolte AM, Hansen TvO, Nielsen FC. 2009. IGF2 mRNA-binding protein 2: biological function and putative role in type 2 diabetes. *Journal of Molecular Endocrinology* 43: 187-195.
- Cleynen I, Brants JR, Peeters K, Deckers R, Debiec-Rychter M, Sciot R, Van de Ven WJM, Petit MMR. 2007. HMGA2 Regulates Transcription of the Imp2 Gene via an Intronic Regulatory Element in Cooperation with Nuclear Factor- κ B. *Molecular Cancer Research* 5: 363-372.
- Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fitzgerald S *et al.* 2015. Ensembl 2015. *Nucleic Acids Research* 43: D662-D669.
- Dai N, Christiansen J, Nielsen FC, Avruch J. 2013. mTOR complex 2 phosphorylates IMP1 cotranslationally to promote IGF2 production and the proliferation of mouse embryonic fibroblasts. *Genes & Development* 27: 301-312.
- Dai N, Rapley J, Angel M, Yanik MF, Blower MD, Avruch J. 2011. mTOR phosphorylates IMP2 to promote IGF2 mRNA translation by internal ribosomal entry. *Genes & Development* 25: 1159-1172.
- Dai N, Zhao L, Wrighting D, Krämer D, Majithia A, Wang Y, Cracan V, Borges-Rivera D, Mootha Vamsi K, Nahrendorf M *et al.* 2015. IGF2BP2/IMP2-Deficient Mice Resist Obesity through Enhanced Translation of Ucp1 mRNA and Other mRNAs Encoding Mitochondrial Proteins. *Cell Metabolism* 21: 609-621.
- de Moor CH, Jansen M, Bonte EJ, Thomas AA, Sussenbach JS, Van Den Brande JL. 1995. Proteins binding to the leader of the 6.0 kb mRNA of human insulin-like growth factor 2 influence translation. *Biochemical Journal* 307: 225-231.
- DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertsen EJ. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345: 78-80.
- Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE. 2005. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16: 421-439.
- Deshler JO, Hightett MI, Schnapp BJ. 1997. Localization of Xenopus Vg1 mRNA by Vera Protein and the Endoplasmic Reticulum. *Science* 276: 1128-1131.
- Devedjian J-C, George M, Casellas A, Pujol A, Visa J, Pelegrín M, Gros L, Bosch F. 2000. Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in β cells develop type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 105: 731-740.
- diabetesDE, Deutsche Diabetes-Hilfe und Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG). 2016. Deutscher Gesundheitsbericht, Diabetes 2016 Die Bestandsaufnahme. *Kirchheim + Co GmbH*.
- Doria A, Patti M-E, Kahn CR. 2008. The Emerging Genetic Architecture of Type 2 Diabetes. *Cell metabolism* 8: 186-200.
- Doyle GA, Betz NA, Leeds PF, Fleisig AJ, Prokipcak RD, Ross J. 1998. The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research* 26: 5036-5044.
- Du Bois D, Du Bois E. 1916. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Archives of Internal Medicine* 17: 863-871.
- Duesing K, Fatemifar G, Charpentier G, Marre M, Tichet J, Hercberg S, Balkau B, Froguel P, Gibson F. 2008. Evaluation of the Association of IGF2BP2 Variants With Type 2 Diabetes in French Caucasians. *Diabetes* 57: 1992-1996.
- Elcheva I, Goswami S, Noubissi FK, Spiegelman VS. 2009. CRD-BP protects the coding region of β TrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation. *Molecular cell* 35: 240-246.
- Fakhralddeen SA, Clark RJ, Roopra A, Chin EN, Huang W, Castorino J, Wisinski KB, Kim T, Spiegelman VS, Alexander CM. 2015. Two Isoforms of the RNA Binding Protein, Coding Region Determinant-binding Protein (CRD-BP/IGF2BP1), Are Expressed in Breast Epithelium and Support Clonogenic Growth of Breast Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry* 290: 13386-13400.
- Farina KL, Hüttelmaier S, Musunuru K, Darnell R, Singer RH. 2003. Two ZBP1 KH domains facilitate β -actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *The Journal of Cell Biology* 160: 77-87.

- Findeis-Hosey JJ, Xu H. 2011. The use of insulin like-growth factor II messenger RNA binding protein-3 in diagnostic pathology. *Human Pathology* 42: 303-314.
- Freathy RM, Bennett AJ, Ring SM, Shields B, Groves CJ, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Lindgren CM, Lango H *et al.* 2009. Type 2 Diabetes Risk Alleles are Associated with Reduced Size at Birth. *Diabetes* 58: 1428-1433.
- Fujii Y, Kishi Y, Gotoh Y. 2013. IMP2 regulates differentiation potentials of mouse neocortical neural precursor cells. *Genes to Cells* 18: 79-89.
- Gamboa-Meléndez MA, Huerta-Chagoya A, Moreno-Macías H, Vázquez-Cárdenas P, Ordóñez-Sánchez ML, Rodríguez-Guillén R, Riba L, Rodríguez-Torres M, Guerra-García MT, Guillén-Pineda LE *et al.* 2012. Contribution of Common Genetic Variation to the Risk of Type 2 Diabetes in the Mexican Mestizo Population. *Diabetes* 61: 3314-3321.
- Gannon F, Powell R, Barry T, McEvoy TG, Sreenan JM. 1990. Transgenic farm animals. *Journal of Biotechnology* 16: 155-170.
- Git A, Standart N. 2002. The KH domains of Xenopus Vg1RBP mediate RNA binding and self-association. *RNA* 8: 1319-1333.
- Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS letters* 582: 1977-1986.
- Gong C, Li Z, Ramanujan K, Clay I, Zhang Y, Lemire-Brachat S, Glass David J. 2015. A Long Non-coding RNA, LncMyoD, Regulates Skeletal Muscle Differentiation by Blocking IMP2-Mediated mRNA Translation. *Developmental Cell* 34: 181-191.
- Gordon J, Ruddle F. 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214: 1244-1246.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 7380-7384.
- Grarup N, Rose CS, Andersson EA, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, Clausen JO, Rasmussen SS, Jørgensen T, Sandbæk A *et al.* 2007. Studies of Association of Variants Near the HHEX, CDKN2A/B, and IGF2BP2 Genes With Type 2 Diabetes and Impaired Insulin Release in 10,705 Danish Subjects: Validation and Extension of Genome-Wide Association Studies. *Diabetes* 56: 3105-3111.
- Groenewoud MJ, Dekker JM, Fritsche A, Reiling E, Nijpels G, Heine RJ, Maassen JA, Machicao F, Schäfer SA, Häring HU *et al.* 2008. Variants of CDKAL1 and IGF2BP2 affect first-phase insulin secretion during hyperglycaemic clamps. *Diabetologia* 51: 1659-1663.
- Gu L, Shigemasa, K., & Ohama, K. 2004. Increased expression of IGF II mRNA-binding protein 1 mRNA is associated with an advanced clinical stage and poor prognosis in patients with ovarian cancer. *International Journal of Oncology* 24: 671-678.
- Gu T, Horová E, Möllsten A, Seman NA, Falhammar H, Prázný M, Brismar K, Gu HF. 2012. IGF2BP2 and IGF2 genetic effects in diabetes and diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes and its Complications* 26: 393-398.
- Gu W, Wells AL, Pan F, Singer RH. 2008. Feedback Regulation between Zipcode Binding Protein 1 and β -Catenin mRNAs in Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology* 28: 4963-4974.
- Guyton AC, Hall JE. 2006. Textbook of Medical Physiology. Elsevier Saunders, Philadelphia, Pennsylvania 11th edition: p. 975.
- Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M, Jungkamp A-C, Munschauer M *et al.* 2010. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 141: 129-141.
- Halberg N, Wernstedt I, Scherer PE. 2008. The Adipocyte as an Endocrine Cell. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 37: 753-xi.
- Hammer NA, Hansen TvO, Byskov AG, Rajpert-De Meyts E, Grøndahl ML, Bredkjær HE, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC. 2005. Expression of IGF-II mRNA-binding proteins (IMPs) in gonads and testicular cancer. *Reproduction* 130: 203-212.

- Hansen TVO, Hammer NA, Nielsen J, Madsen M, Dalbaeck C, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC. 2004. Dwarfism and Impaired Gut Development in Insulin-Like Growth Factor II mRNA-Binding Protein 1-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology* 24: 4448-4464.
- Havin L, Git A, Elisha Z, Oberman F, Yaniv K, Schwartz SP, Standart N, Yisraeli JK. 1998. RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes & Development* 12: 1593-1598.
- Heinrich PC, Müller M, Graeve L, (Hrsg.). 2014. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 9. Auflage.
- Herder C, Rathmann W, Strassburger K, Finner H, Grallert H, Huth C, Meisinger C, Gieger C, Martin S, Giani G *et al.* 2008. Variants of the PPARG, IGF2BP2, CDKAL1, HHEX, and TCF7L2 Genes Confer Risk of Type 2 Diabetes Independently of BMI in the German KORA Studies. *Horm Metab Res* 40: 722-726.
- Horikawa Y, Miyake K, Yasuda K, Enya M, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y *et al.* 2008. Replication of Genome-Wide Association Studies of Type 2 Diabetes Susceptibility in Japan. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93: 3136-3141.
- Hotta K, Kitamoto A, Kitamoto T, Mizusawa S, Teranishi H, So R, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, Ochi H *et al.* 2012. Association between type 2 diabetes genetic susceptibility loci and visceral and subcutaneous fat area as determined by computed tomography. *J Hum Genet* 57: 305-310.
- Hu P, Zhang M, Napoli JL. 2007. Ontogeny of rdh9 (Crad3) expression: ablation causes changes in retinoid and steroid metabolizing enzymes, but RXR and androgen signaling seem normal. *Biochimica et biophysica acta* 1770: 694-705.
- Huang Q, Yin J-y, Dai X-p, Pei Q, Dong M, Zhou Z-g, Huang X, Yu M, Zhou H-h, Liu Z-q. 2010. IGF2BP2 variations influence repaglinide response and risk of type 2 diabetes in Chinese population. *Acta Pharmacologica Sinica* 31: 709-717.
- Hüttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH. 2005. Spatial regulation of [beta]-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438: 512-515.
- IDF International Diabetes Federation. 2013. IDF Diabetes Atlas. *Brussels, Belgium: International Diabetes Federation* 6th edition: <http://www.diabetesatlas.org/>.
- IDF International Diabetes Federation 2015. IDF Diabetes Atlas. *Brussels, Belgium: International Diabetes Federation* 7th edition: <http://www.diabetesatlas.org/>.
- Janiszewska M, Suvà ML, Riggi N, Houtkooper RH, Auwerx J, Clément-Schatlo V, Radovanovic I, Rheinbay E, Provero P, Stamenkovic I. 2012. Imp2 controls oxidative phosphorylation and is crucial for preserving glioblastoma cancer stem cells. *Genes & Development* 26: 1926-1944.
- Jia H, Yu L, Jiang Z, Ji Q. 2011. Association Between IGF2BP2 rs4402960 Polymorphism and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-analysis. *Archives of Medical Research* 42: 361-367.
- Jønson L, Christiansen J, Hansen Thomas VO, Vikeså J, Yamamoto Y, Nielsen Finn C. 2014. IMP3 RNP Safe Houses Prevent miRNA-Directed HMGA2 mRNA Decay in Cancer and Development. *Cell Reports* 7: 539-551.
- Jønson L, Vikesaa J, Krogh A, Nielsen LK, Hansen Tv, Borup R, Johnsen AH, Christiansen J, Nielsen FC. 2007. Molecular Composition of IMP1 Ribonucleoprotein Granules. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 798-811.
- Kawasaki K, Yamada S, Ogata K, Saito Y, Takahama A, Yamada T, Matsumoto K, Kose H. 2015. Use of Drosophila as an Evaluation Method Reveals imp as a Candidate Gene for Type 2 Diabetes in Rat Locus Niddm22. *Journal of Diabetes Research* 2015: 758564.
- Kerner W, Brückel J. 2012. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel* 7: S84-S87.
- Kessler SM, Pokorny J, Zimmer V, Laggai S, Lammert F, Bohle RM, Kiemer AK. 2013. IGF2 mRNA binding protein p62/IMP2-2 in hepatocellular carcinoma: antiapoptotic action is independent of IGF2/PI3K signaling. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 304: G328-G336.

- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* 14: R36-R36.
- Kirchhoff K, Machicao F, Haupt A, Schäfer SA, Tschritter O, Staiger H, Stefan N, Häring H-U, Fritsche A. 2008. Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. *Diabetologia* 51: 597-601.
- Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH. 1994. Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *The Journal of Cell Biology* 127: 441-451.
- Köbel M, Weidensdorfer D, Reinke C, Lederer M, Schmitt WD, Zeng K, Thomssen C, Hauptmann S, Huttelmaier S. 2007. Expression of the RNA-binding protein IMP1 correlates with poor prognosis in ovarian carcinoma. *Oncogene* 26: 7584-7589.
- Köbel M, Xu H, Bourne PA, Spaulding BO, Shih I-M, Mao T-L, Soslow RA, Ewanowich CA, Kalloger SE, Mehl E *et al.* 2009. IGF2BP3 (IMP3) expression is a marker of unfavorable prognosis in ovarian carcinoma of clear cell subtype. *Mod Pathol* 22: 469-475.
- König M, Holzhütter H-G. 2014. Homöostase der Blutglucose. Computersimulationen zentraler Leberfunktionen. *systembiologie de* 08: 53-57.
- Kwong WY, Miller DJ, Ursell E, Wild AE, Wilkins AP, Osmond C, Anthony FW, Fleming TP. 2006. Imprinted gene expression in the rat embryo-fetal axis is altered in response to periconceptual maternal low protein diet. *Reproduction* 132: 265-277.
- Laggai S, Kessler SM, Boettcher S, Lebrun V, Gemperlein K, Lederer E, Leclercq IA, Mueller R, Hartmann RW, Haybaeck J *et al.* 2014. The IGF2 mRNA binding protein p62/IGF2BP2-2 induces fatty acid elongation as a critical feature of steatosis. *Journal of Lipid Research* 55: 1087-1097.
- Laplante M, Sabatini DM. 2009. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 122: 3589-3594.
- Lasram K, Ben Halim N, Benrahma H, Mediène-Benchekor S, Arfa I, Hsouna S, Kefi R, Jamoussi H, Ben Ammar S, Bahri S *et al.* 2015. Contribution of CDKAL1 rs7756992 and IGF2BP2 rs4402960 polymorphisms in type 2 diabetes, diabetic complications, obesity risk and hypertension in the Tunisian population. *Journal of Diabetes* 7: 102-113.
- Le HTT, Sorrell AM, Siddle K. 2012. Two Isoforms of the mRNA Binding Protein IGF2BP2 Are Generated by Alternative Translational Initiation. *PLoS ONE* 7: e33140.
- Lewis JP, Palmer ND, Hicks PJ, Sale MM, Langefeld CD, Freedman BI, Divers J, Bowden DW. 2008. Association Analysis in African Americans of European-Derived Type 2 Diabetes Single Nucleotide Polymorphisms From Whole-Genome Association Studies. *Diabetes* 57: 2220-2225.
- Li X, Allayee H, Xiang AH, Trigo E, Hartiala J, Lawrence JM, Buchanan TA, Watanabe RM. 2009. Variation in IGF2BP2 Interacts With Adiposity to Alter Insulin Sensitivity in Mexican Americans. *Obesity (Silver Spring, Md)* 17: 729-736.
- Li X, Nong Z, Ekström C, Larsson E, Nordlinder H, Hofmann WJ, Trautwein C, Odenthal M, Dienes HP, Ekström TJ *et al.* 1997. Disrupted IGF2 Promoter Control by Silencing of Promoter P1 in Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research* 57: 2048-2054.
- Li Z, Gilbert JA, Zhang Y, Zhang M, Qiu Q, Ramanujan K, Shavlakadze T, Eash JK, Scaramozza A, Goddeeris MM *et al.* 2012. An HMGA2-IGF2BP2 Axis Regulates Myoblast Proliferation and Myogenesis. *Developmental cell* 23: 1176-1188.
- Liao B, Hu Y, Brewer G. 2011. RNA-binding Protein Insulin-like Growth Factor mRNA-binding Protein 3 (IMP-3) Promotes Cell Survival via Insulin-like Growth Factor II Signaling after Ionizing Radiation. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 31145-31152.
- Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G. 2005. The RNA-binding Protein IMP-3 Is a Translational Activator of Insulin-like Growth Factor II Leader-3 mRNA during Proliferation of Human K562 Leukemia Cells. *Journal of Biological Chemistry* 280: 18517-18524.
- Liao B, Patel M, Hu Y, Charles S, Herrick DJ, Brewer G. 2004. Targeted Knockdown of the RNA-binding Protein CRD-BP Promotes Cell Proliferation via an Insulin-like Growth Factor II-dependent Pathway in Human K562 Leukemia Cells. *Journal of Biological Chemistry* 279: 48716-48724.

- Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30: 923-930.
- Lin TP. 1966. Microinjection of Mouse Eggs. *Science* 151: 333-337.
- Liu Fy, Zhou Sj, Deng Yi, Zhang Zy, Zhang El, Wu Zb, Huang Zy, Chen Xp. 2015. MiR-216b is involved in pathogenesis and progression of hepatocellular carcinoma through HBx-miR-216b-IGF2BP2 signaling pathway. *Cell Death & Disease* 6: e1670.
- Liu J-P, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75: 59-72.
- Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ *et al.* 2009. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med* 15: 940-945.
- Liu Y, Yu L, Zhang D, Chen Z, Zhou DZ, Zhao T, Li S, Wang T, Hu X, Feng GY *et al.* 2008. Positive association between variations in CDKAL1 and type 2 diabetes in Han Chinese individuals. *Diabetologia* 51: 2134-2137.
- Lochhead P, Imamura Y, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, Liao X, Qian ZR, Nishihara R, Wu K, Meyerhardt JA *et al.* 2012. Insulin-like growth factor 2 messenger RNA binding protein 3 (IGF2BP3) is a marker of unfavourable prognosis in colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 48: 3405-3413.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. 2002. Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science* 295: 868-872.
- Lu D, Vohra P, Chu PG, Woda B, Rock KL, Jiang Z. 2009. An Oncofetal Protein IMP3: A New Molecular Marker for the Detection of Esophageal Adenocarcinoma and High-grade Dysplasia. *The American Journal of Surgical Pathology* 33: 521-525.
- Lu M, Nakamura RM, Dent ED, Zhang J-Y, Nielsen FC, Christiansen J, Chan EKL, Tan EM. 2001. Aberrant Expression of Fetal RNA-Binding Protein p62 in Liver Cancer and Liver Cirrhosis. *The American Journal of Pathology* 159: 945-953.
- Lunde BM, Moore C, Varani G. 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 479-490.
- Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, Berglund G, Altshuler D, Nilsson P, Groop L. 2008. Clinical Risk Factors, DNA Variants, and the Development of Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 359: 2220-2232.
- Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, Cao Q, Atsumi G, Malone H, Krishnan B *et al.* 2005. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metabolism* 1: 107-119.
- Mao X, Fujiwara Y, Chapdelaine A, Yang H, Orkin SH. 2001. Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood* 97: 324-326.
- Marselli L, Thorne J, Dahiya S, Sgroi DC, Sharma A, Bonner-Weir S, Marchetti P, Weir GC. 2010. Gene Expression Profiles of Beta-Cell Enriched Tissue Obtained by Laser Capture Microdissection from Subjects with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* 5: e11499.
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *2011* 17.
- Matsuzaka T, Shimano H. 2009. Elovl6: a new player in fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Journal of Molecular Medicine* 87: 379-384.
- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Kato T, Atsumi A, Yamamoto T, Inoue N, Ishikawa M, Okada S, Ishigaki N *et al.* 2007. Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 13: 1193-1202.
- Meyer M, Kircher M. 2010. Illumina Sequencing Library Preparation for Highly Multiplexed Target Capture and Sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols* 2010: pdb.prot5448.
- Mongroo PS, Noubissi FK, Cuatrecasas M, Kalabis J, King CE, Johnstone CN, Bowser MJ, Castells A, Spiegelman VS, Rustgi AK. 2011. IMP-1 displays crosstalk with K-Ras and modulates colon cancer cell survival through the novel pro-apoptotic protein CYFIP2. *Cancer research* 71: 2172-2182.

- Monostory K, Dvorak Z. 2011. Steroid Regulation of Drug-Metabolizing Cytochromes P450. *Current Drug Metabolism* 12: 154-172.
- Moss EG, Lee RC, Ambros V. 1997. The Cold Shock Domain Protein LIN-28 Controls Developmental Timing in *C. elegans* and Is Regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 88: 637-646.
- Müller-Pillasch F, Lacher U, Wallrapp C, Micha A, Zimmerhackl F, Hameister H, Varga G, Friess H, Büchler M, Beger HG *et al.* 1997. Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene* 14: 2729-2733.
- Mueller-Pillasch F, Pohl B, Wilda M, Lacher U, Beil M, Wallrapp C, Hameister H, Knöchel W, Adler G, Gress TM. 1999. Expression of the highly conserved RNA binding protein KOC in embryogenesis. *Mechanisms of Development* 88: 95-99.
- Munro TP, Kwon S, Schnapp BJ, St Johnston D. 2006. A repeated IMP-binding motif controls oskar mRNA translation and anchoring independently of *Drosophila melanogaster* IMP. *The Journal of Cell Biology* 172: 577-588.
- Nagy A, Perrimon N, Sandmeyer S, Plasterk R. 2003. Tailoring the genome: the power of genetic approaches. *Nature Genetics* 33: 276 - 284.
- Nahon JL, Tratner I, Poliard A, Presse F, Poiret M, Gal A, Sala-Trepat JM, Legrès L, Feldmann G, Bernuau D. 1988. Albumin and alpha-fetoprotein gene expression in various nonhepatic rat tissues. *Journal of Biological Chemistry* 263: 11436-11442.
- Nebert DW, Wikvall K, Miller WL. 2013. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 368.
- Ng MCY, Park KS, Oh B, Tam CHT, Cho YM, Shin HD, Lam VKL, Ma RCW, So WY, Cho YS *et al.* 2008. Implication of Genetic Variants Near TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, and FTO in Type 2 Diabetes and Obesity in 6,719 Asians. *Diabetes* 57: 2226-2233.
- Nielsen FC. 1992. The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Progress in Growth Factor Research* 4: 257-290.
- Nielsen FC, Nielsen J, Kristensen MA, Koch G, Christiansen J. 2002. Cytoplasmic trafficking of IGF-II mRNA-binding protein by conserved KH domains. *Journal of Cell Science* 115: 2087-2097.
- Nielsen FC, Ostergaard L, Nielsen J, Christiansen J. 1995. Growth-dependent translation of IGF-II mRNA by a rapamycin-sensitive pathway. *Nature* 377: 358-362.
- Nielsen J, Adolph SK, Rajpert-De Meyts E, Lykke-Andersen J, Koch G, Christiansen J, Nielsen FC. 2003. Nuclear transit of human zipcode-binding protein IMP1. *Biochemical Journal* 376: 383-391.
- Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC. 1999. A Family of Insulin-Like Growth Factor II mRNA-Binding Proteins Represses Translation in Late Development. *Molecular and Cellular Biology* 19: 1262-1270.
- Nielsen J, Kristensen MA, Willemoës M, Nielsen FC, Christiansen J. 2004. Sequential dimerization of human zipcode-binding protein IMP1 on RNA: a cooperative mechanism providing RNP stability. *Nucleic Acids Research* 32: 4368-4376.
- Nishino J, Kim S, Zhu Y, Zhu H, Morrison SJ. 2013. A network of heterochronic genes including *Imp1* regulates temporal changes in stem cell properties. *eLife* 2: e00924.
- Noubissi FK, Elcheva I, Bhatia N, Shakoory A, Ougolkov A, Liu J, Minamoto T, Ross J, Fuchs SY, Spiegelman VS. 2006. CRD-BP mediates stabilization of [beta]TrCP1 and c-myc mRNA in response to [beta]-catenin signalling. *Nature* 441: 898-901.
- Oleynikov Y, Singer RH. 2003. Real-Time Visualization of ZBP1 Association with β -Actin mRNA during Transcription and Localization. *Current Biology* 13: 199-207.
- Pacini G, Mari A. 2003. Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and β -cell function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 17: 305-322.
- Pacini G, Omar B, Ahrén B. 2013. Methods and Models for Metabolic Assessment in Mice. *Journal of Diabetes Research* 2013: 8.
- Palmer ND, Goodarzi MO, Langefeld CD, Ziegler J, Norris JM, Haffner SM, Bryer-Ash M, Bergman RN, Wagenknecht LE, Taylor KD *et al.* 2008. Quantitative Trait Analysis of Type 2 Diabetes Susceptibility Loci Identified From Whole Genome Association Studies in the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Diabetes* 57: 1093-1100.

- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611-615.
- Pan F, Hüttelmaier S, Singer RH, Gu W. 2007. ZBP2 Facilitates Binding of ZBP1 to β -Actin mRNA during Transcription. *Molecular and Cellular Biology* 27: 8340-8351.
- Parikh H, Lyssenko V, Groop LC. 2009. Prioritizing genes for follow-up from genome wide association studies using information on gene expression in tissues relevant for type 2 diabetes mellitus. *BMC Medical Genomics* 2: 72-72.
- Patel PS, Buras ED, Balasubramanyam A. 2013. The Role of the Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Journal of Obesity* 2013: 616193.
- Patel VL, Mitra S, Harris R, Buxbaum AR, Lionnet T, Brenowitz M, Girvin M, Levy M, Almo SC, Singer RH *et al.* 2012. Spatial arrangement of an RNA zipcode identifies mRNAs under post-transcriptional control. *Genes & Development* 26: 43-53.
- Pecioska S, Zillikens MC, Henneman P, Snijders PJ, Oostra BA, van Duijn CM, Aulchenko YS. 2010. Association between Type 2 Diabetes Loci and Measures of Fatness. *PLoS ONE* 5: e8541.
- Perry ACF, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, Yanagimachi R. 1999. Mammalian Transgenesis by Intracytoplasmic Sperm Injection. *Science* 284: 1180-1183.
- Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. 2002. Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2140-2145.
- Piskounova E, Polyarchou C, Thornton JE, Hagan JP, LaPierre RJ, Pothoulakis C, Iliopoulos D, Gregory RI. 2011. Oncogenic Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell* 147: 1066-1079.
- Poleskaya A, Cuvellier S, Naguibneva I, Duquet A, Moss EG, Harel-Bellan A. 2007. Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes & Development* 21: 1125-1138.
- Prokunina-Olsson L HJ, Jackson AU *et al.* 2008. A novel variant of IGF2BP2 is associated with type 2 diabetes and affects expression of a functional splicing isoform. *Diabetes* 57(Suppl 1):A61.
- Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H. 2008. IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod Pathol* 21: 431-437.
- Pulizzi N, Lyssenko V, Jonsson A, Osmond C, Laakso M, Kajantie E, Barker DJ, Groop LC, Eriksson JG. 2009. Interaction between prenatal growth and high-risk genotypes in the development of type 2 diabetes. *Diabetologia* 52: 825-829.
- Qu H-Q, Grant SFA, Bradfield JP, Kim C, Frackelton E, Hakonarson H, Polychronakos C. 2008. Association Analysis of Type 2 Diabetes Loci in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 57: 1983-1986.
- R Core Team. 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.*
- Raj SM, Howson JMM, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Field SF, Stevens HE, Todd JA. 2009. No association of multiple type 2 diabetes loci with type 1 diabetes. *Diabetologia* 52: 2109-2116.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139-140.
- Rodriguez S, Eiriksdottir G, Gaunt TR, Harris TB, Launer LJ, Gudnason V, Day INM. 2010. IGF2BP1, IGF2BP2 and IGF2BP3 genotype, haplotype and genetic model studies in metabolic syndrome traits and diabetes. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 20: 310-318.
- Rogler CE, Yang D, Rossetti L, Donohoe J, Alt E, Chang CJ, Rosenfeld R, Neely K, Hintz R. 1994. Altered body composition and increased frequency of diverse malignancies in insulin-like growth factor-II transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* 269: 13779-13784.
- Rong R, Hanson RL, Ortiz D, Wiedrich C, Kobes S, Knowler WC, Bogardus C, Baier LJ. 2009. Association Analysis of Variation in/Near FTO, CDKAL1, SLC30A8, HHEX, EXT2, IGF2BP2, LOC387761, and CDKN2B With Type 2 Diabetes and Related Quantitative Traits in Pima Indians. *Diabetes* 58: 478-488.

- Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH. 1997. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Molecular and Cellular Biology* 17: 2158-2165.
- Roush S, Slack FJ. 2008. The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology* 18: 505-516.
- Ru Y, Kechris KJ, Tabakoff B, Hoffman P, Radcliffe RA, Bowler R, Mahaffey S, Rossi S, Calin GA, Bemis L *et al.* 2014. The multiMiR R package and database: integration of microRNA–target interactions along with their disease and drug associations. *Nucleic Acids Research* 42: e133-e133.
- Ruchat S-M, Elks CE, Loos RJF, Vohl M-C, Weisnagel SJ, Rankinen T, Bouchard C, Pérusse L. 2008. Association between insulin secretion, insulin sensitivity and type 2 diabetes susceptibility variants identified in genome-wide association studies. *Acta Diabetologica* 46: 217-226.
- Ruchat SM, Elks CE, Loos RJF, Vohl MC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Bouchard C, Pérusse L. 2009. Evidence of Interaction between Type 2 Diabetes Susceptibility Genes and Dietary Fat Intake for Adiposity and Glucose Homeostasis-Related Phenotypes. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics* 2: 225-234.
- Runge S, Nielsen FC, Nielsen J, Lykke-Andersen J, Wewer UM, Christiansen J. 2000. H19 RNA Binds Four Molecules of Insulin-like Growth Factor II mRNA-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 275: 29562-29569.
- Saito M, Iwawaki T, Taya C, Yonekawa H, Noda M, Inui Y, Mekada E, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K. 2001. Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotech* 19: 746-750.
- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PIW, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ *et al.* 2007. Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. *Science* 316: 1331-1336.
- Schaeffer V, Hansen KM, Morris DR, LeBoeuf RC, Abrass CK. 2012. RNA-binding protein IGF2BP2/IMP2 is required for laminin- β 2 mRNA translation and is modulated by glucose concentration. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 303: F75-F82.
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU *et al.* 2007. A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants. *Science (New York, NY)* 316: 1341-1345.
- Shamay A, Homans R, Fuerman Y, Levin I, Barash H, Silanikove N, Mabeesh SJ. 2005. Expression of Albumin in Nonhepatic Tissues and its Synthesis by the Bovine Mammary Gland. *Journal of Dairy Science* 88: 569-576.
- Sharif J, Nakamura M, Ito T, Kimura Y, Nagamune T, Mitsuya K, Okamura K. 2007. Food Restriction in Pregnant Mice Can Induce Changes in Histone Modifications and Suppress Gene Expression in Fetus. *Nucleic Acids Symposium Series* 51: 125-126.
- Shimomura O. 2005. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy* 217: 3-15.
- Shinoda G, Shyh-Chang N, de Soysa TY, Zhu H, Seligson MT, Shah SP, Abo-Sido N, Yabuuchi A, Hagan JP, Gregory RI *et al.* 2013. Fetal deficiency of Lin28 programs life-long aberrations in growth and glucose metabolism. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31: 1563-1573.
- Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. 2007. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology* 132: 2169-2180.
- Sjögren M, Lyssenko V, Jonsson A, Berglund G, Nilsson P, Groop L, Orho-Melander M. 2008. The search for putative unifying genetic factors for components of the metabolic syndrome. *Diabetologia* 51: 2242-2251.
- Soriano P, Cone R, Mulligan R, Jaenisch R. 1986. Tissue-specific and ectopic expression of genes introduced into transgenic mice by retroviruses. *Science* 234: 1409-1413.
- Spagnoli FM, Brivanlou AH. 2006. The RNA-binding protein, Vg1RBP, is required for pancreatic fate specification. *Developmental Biology* 292: 442-456.
- Sparanese D, Lee CH. 2007. CRD-BP shields c-myc and MDR-1 RNA from endonucleolytic attack by a mammalian endoribonuclease. *Nucleic Acids Research* 35: 1209-1221.

- Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, 1998. Online Lexikon der Physik. <http://www.spektrum.de/lexikon/physik/kalorimetrische-bombe/7726>.
- Stančáková A, Kuulasmaa T, Paananen J, Jackson AU, Bonnycastle LL, Collins FS, Boehnke M, Kuusisto J, Laakso M. 2009. Association of 18 Confirmed Susceptibility Loci for Type 2 Diabetes With Indices of Insulin Release, Proinsulin Conversion, and Insulin Sensitivity in 5,327 Nondiabetic Finnish Men. *Diabetes* 58: 2129-2136.
- Statistisches Bundesamt, Fachserie 12 Reihe 4, Seite 4. 2014. Gesundheit - Todesursachen in Deutschland. *Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2016*: <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>.
- Stiles B, Wang Y, Stahl A, Bassilian S, Lee WP, Kim Y-J, Sherwin R, Devaskar S, Lesche R, Magnuson MA *et al.* 2004. Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2082-2087.
- Stöhr N, Köhn M, Lederer M, Glaß M, Reinke C, Singer RH, Hüttelmaier S. 2012. IGF2BP1 promotes cell migration by regulating MK5 and PTEN signaling. *Genes & Development* 26: 176-189.
- Suvasini R, Shruti B, Thota B, Shinde SV, Friedmann-Morvinski D, Nawaz Z, Prasanna KV, Thennarasu K, Hegde AS, Arivazhagan A *et al.* 2011. Insulin Growth Factor-2 Binding Protein 3 (IGF2BP3) Is a Glioblastoma-specific Marker That Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase (PI3K/MAPK) Pathways by Modulating IGF-2. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 25882-25890.
- Tessier CR, Doyle GA, Clark BA, Pitot HC, Ross J. 2004. Mammary Tumor Induction in Transgenic Mice Expressing an RNA-Binding Protein. *Cancer research* 64: 209-214.
- Thorgeirsson SS, Grisham JW. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 31: 339-346.
- Trasino SE, Gudas LJ. 2015. Vitamin A: a missing link in diabetes? *Diabetes management (London, England)* 5: 359-367.
- Tybl E, Shi F-D, Kessler SM, Tierling S, Walter J, Bohle RM, Wieland S, Zhang J, Tan EM, Kiemer AK. 2011. Overexpression of the IGF2-mRNA binding protein p62 in transgenic mice induces a steatotic phenotype. *Journal of Hepatology* 54: 994-1001.
- Ueki I, Ooi GT, Tremblay ML, Hurst KR, Bach LA, Boisclair YR. 2000. Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 6868-6873.
- van Hoek M, Langendonk JG, de Rooij SR, Sijbrands EJJ, Roseboom TJ. 2009. Genetic Variant in the IGF2BP2 Gene May Interact With Fetal Malnutrition to Affect Glucose Metabolism. *Diabetes* 58: 1440-1444.
- Vikesaa J, Hansen TVO, Jønson L, Borup R, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC. 2006. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *The EMBO Journal* 25: 1456-1468.
- Wächter K, Köhn M, Stöhr N, Hüttelmaier S. 2013. Subcellular localization and RNP formation of IGF2BPs (IGF2 mRNA-binding proteins) is modulated by distinct RNA-binding domains. *Biological Chemistry* 394: 1077-1090.
- Wagner M, Kunsch S, Duerschmied D, Beil M, Adler G, Mueller F, Gress TM. 2003. Transgenic overexpression of the oncofetal RNA binding protein KOC leads to remodeling of the exocrine pancreas. *Gastroenterology* 124: 1901-1914.
- Walter O, Prasad M, Lu S, Quinlan RM, Edmiston KL, Khan A. 2009. IMP3 is a novel biomarker for triple negative invasive mammary carcinoma associated with a more aggressive phenotype. *Human Pathology* 40: 1528-1533.
- Wang C-Y, Liao JK. 2012. A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 821: 421-433.
- Wang Y, Nie M, Li W, Ping F, Hu Y, Ma L, Gao J, Liu J. 2011. Association of Six Single Nucleotide Polymorphisms with Gestational Diabetes Mellitus in a Chinese Population. *PLoS ONE* 6: e26953.

- Webster RJ, Warrington NM, Beilby JP, Frayling TM, Palmer LJ. 2010. The longitudinal association of common susceptibility variants for type 2 diabetes and obesity with fasting glucose level and BMI. *BMC Medical Genetics* 11: 140-140.
- Weidensdorfer D, Stöhr N, Baude A, Lederer M, Köhn M, Schierhorn A, Buchmeier S, Wahle E, Hüttelmaier S. 2009. Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA* 15: 104-115.
- Weinlich S, Hüttelmaier S, Schierhorn A, Behrens S-E, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH. 2009. IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA* 15: 1528-1542.
- 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 & Metabolism* 86: 1930-1935.
- Winkler C, Raab J, Grallert H, Ziegler A-G. 2012. Lack of Association of Type 2 Diabetes Susceptibility Genotypes and Body Weight on the Development of Islet Autoimmunity and Type 1 Diabetes. *PLoS ONE* 7: e35410.
- Wu H-H, Liu N-J, Yang Z, Tao X-M, Du Y-P, Wang X-C, Lu B, Zhang Z-Y, Hu R-M, Wen J. 2014. IGF2BP2 and obesity interaction analysis for type 2 diabetes mellitus in Chinese Han population. *European Journal of Medical Research* 19: 40-40.
- Wu J, Wu J, Zhou Y, Zou H, Guo S, Liu J, Lu L, Xu H. 2011. Quantitative assessment of the variation in IGF2BP2 gene and type 2 diabetes risk. *Acta Diabetologica* 49: 87-97.
- Wu Y, Li H, Loos RJF, Yu Z, Ye X, Chen L, Pan A, Hu FB, Lin X. 2008. Common Variants in CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, SLC30A8, and HHEX/IDE Genes Are Associated With Type 2 Diabetes and Impaired Fasting Glucose in a Chinese Han Population. *Diabetes* 57: 2834-2842.
- Yakar S, Liu J-L, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7324-7329.
- Yang D-H, Moss EG. 2003. Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expression Patterns* 3: 719-726.
- Yaniv K, Yisraeli JK. 2002. The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis. *Gene* 287: 49-54.
- Yisraeli JK. 2005. VICKZ proteins: a multi-talented family of regulatory RNA-binding proteins. *Biology of the Cell* 97: 87-96.
- Zaina S, Pettersson L, Thomsen AB, Chai C-M, Qi Z, Thyberg J, Nilsson J. 2003. Shortened Life Span, Bradycardia, and Hypotension in Mice with Targeted Expression of an Igf2 Transgene in Smooth Muscle Cells. *Endocrinology* 144: 2695-2703.
- Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JRB, Rayner NW, Freathy RM *et al.* 2007. Multiple type 2 diabetes susceptibility genes following genome-wide association scan in UK samples. *Science (New York, NY)* 316: 1336-1341.
- Zhang HL, Eom T, Oleynikov Y, Shenoy SM, Liebelt DA, Dichtenberg JB, Singer RH, Bassell GJ. 2001a. Neurotrophin-Induced Transport of a β -Actin mRNP Complex Increases β -Actin Levels and Stimulates Growth Cone Motility. *Neuron* 31: 261-275.
- Zhang J-Y, Chan EKL, Peng X-X, Lu M, Wang X, Mueller F, Tan EM. 2001b. Autoimmune Responses to mRNA Binding Proteins p62 and Koc in Diverse Malignancies. *Clinical Immunology* 100: 149-156.
- Zhang L, Liu Y, Hao S, Woda BA, Lu D. 2011. IMP2 Expression Distinguishes Endometrioid From Serous Endometrial Adenocarcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology* 35: 868-872.
- Zhang LF, Pei Q, Yang GP, Zhao YC, Mu YF, Huang Q, Zhu YL. 2014. The Effect of IGF2BP2 Gene Polymorphisms on Pioglitazone Response in Chinese Type 2 Diabetes Patients *Pharmacology* 94: 115-122.
- Zhang Q, Yaniv K, Oberman F, Wolke U, Git A, Fromer M, Taylor WL, Meyer D, Standart N, Raz E *et al.* 1999. Vg1 RBP intracellular distribution and evolutionarily conserved expression at multiple stages during development. *Mechanisms of Development* 88: 101-106.

- Zhao J, Li M, Bradfield JP, Wang K, Zhang H, Sleiman P, Kim CE, Annaiah K, Glaberson W, Glessner JT *et al.* 2009. Examination of Type 2 Diabetes Loci Implicates CDKAL1 as a Birth Weight Gene. *Diabetes* 58: 2414-2418.
- Zhao Y, Ma Y-S, Fang Y, Liu L, Wu S-D, Fu D, Wang X-F. 2011. IGF2BP2 Genetic Variation and Type 2 Diabetes: A Global Meta-Analysis. *DNA and Cell Biology* 31: 713-720.
- Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K. 1995. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 376: 771-774.
- Zhou X, Benson KF, Przybysz K, Liu J, Hou Y, Cherath L, Chada K. 1996. Genomic structure and expression of the murine Hmgi-c gene. *Nucleic Acids Research* 24: 4071-4077.
- Zhu H, Shyh-Chang N, Segrè AV, Shinoda G, Shah SP, Einhorn WS, Takeuchi A, Engreitz JM, Hagan JP, Kharas MG *et al.* 2011. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* 147: 81-94.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Darstellung des IGF2BP2-Gens sowie der Domänenstruktur des Proteins	9
Abb. 2	Intrazelluläre Signalübertragung des Insulins	17
Abb. 3	Genotypisierungs-PCR genomischer DNA aus der Schwanzspitze verschiedener Mäuse...	28
Abb. 4	Nachweis des transgenen BiPro-IGF2BP2-Proteins in der Schwanzspitze der Mäuse	28
Abb. 5	Verlauf der Glucosekonzentration während eines OGTT in einem gesunden Probanden (Normal) und einem Patienten mit einem T2DM (Diabetes)	30
Abb. 6	Schema des Versuchsablaufs der Diätbehandlung	36
Abb. 7	Bombenkalorimeter	37
Abb. 8	Beispiel eines experimentell bestimmten Temperaturverlaufs während der kalorimetrischen Verbrennung einer Kotprobe	38
Abb. 9	Expression der IGF2BP-RNA während der Embryonalentwicklung in der Maus	55
Abb. 10	IGF2BP-Expression in der adulten Maus	56
Abb. 11	Schematische Darstellung der DNA-Konstrukte für die Erzeugung transgener Mäuse	58
Abb. 12	Nachweis der ubiquitären Überexpression der transgenen Proteine	61
Abb. 13	Expression der murinen sowie humanen mRNA von IGF2BP2 in Leber, Muskel und Fett der UbC-Mäuse	62
Abb. 14	Immunpräzipitation von IGF2BP2 in verschiedenen Organen der UbC-Mäuse	63
Abb. 15	Expression der mRNA des IGF2BP1-Transgens unter Kontrolle des Albumin-Promotors...	64
Abb. 16	Nachweis der Überexpression der Albumin-Konstrukte in der Leber	65
Abb. 17	Prozentuale Gewichtsveränderungen der ½ - und 1-jährigen UbC-Mäuse	69
Abb. 18	Visueller Größenvergleich der UbC-Mäuse im Alter von 1 Jahr	70
Abb. 19	Konzentration der IGFs im Serum und der Leber 1-jähriger IGF2BP2-Mäuse	71
Abb. 20	Tägliche Nahrungsaufnahme der UbC-Mäuse im Alter von 1 Jahr	72
Abb. 21	Täglicher Energieumsatz der UbC-Mäuse im Alter von 1 Jahr	73
Abb. 22	Entwicklung der basalen Blutglucosewerte der UbC-Mäuse mit zunehmendem Alter	75
Abb. 23	Oraler Glucosetoleranztest der UbC-Stämme	77
Abb. 24	Insulinkonzentrationen während des OGTT der UbC-Mäuse	79
Abb. 25	Intraperitonealer Insulintoleranztest der 1-jährigen UbC-Mäuse	80
Abb. 26	Glykogengehalt in Leber und Muskel 1-jähriger UbC-Mäuse	81
Abb. 27	Glykogengehalt in der Leber 1-jähriger Alb-IGF2BP2-Mäuse	81
Abb. 28	Veränderungen des Körpergewichtes 1-jähriger UbC-Mäuse während der Hochfettdiät (HFD)	85
Abb. 29	Täglicher Energieumsatz der UbC-Mäuse nach 6-wöchiger HFD	87

Abb. 30	Veränderungen der basalen Blutglucosewerte der UbC-Mäuse vor und während der HFD	88
Abb. 31	Oraler Glucosetoleranztest der UbC-Stämme nach 8-wöchiger HFD.....	89
Abb. 32	Insulinkonzentrationen während des OGTT der UbC-Mäuse nach 8-wöchiger HFD	90
Abb. 33	Intraperitonealer Insulintoleranztest der UbC-Mäuse nach 8-wöchiger HFD	91
Abb. 34	Prozentsatz differenziell exprimierter mRNAs in verschiedenen Geweben der UbC-Mäuse	94
Abb. 35	Auswahl der Ergebnisse der <i>gene enrichment</i> Analysen der signifikant differenziell exprimierten mRNAs der Sequenzierung von RNA des Fettgewebes von UbC-Mäusen nach HFD.....	95
Abb. 36	Hypothetische Zusammenfassung der molekularen Wechselwirkungen von IGF2BP2....	113

Abbildungen im Anhang

Abb. A1	Expression der transgenen Proteine in verschiedenen Organen der UbC-Tiere	XIV
Abb. A2	Vergleich der transgenen Proteinexpression zwischen den Alb- und UbC-IGF2BP2-Mäusen	XIV
Abb. A3	Entwicklung des Körpergewichtes der UbC-Mäuse mit zunehmendem Alter.....	XVI
Abb. A4	Prozentuale Veränderungen der Organgewichte der 1-jährigen Alb-Mäuse	XVII
Abb. A5	Konzentration der IGFs im Serum und der Leber 1-jähriger UbC-Mäuse.....	XVIII
Abb. A6	Konzentration der IGFs im Serum und der Leber 1-jähriger Alb-Mäuse	XIX
Abb. A7	Tägliche Nahrungsaufnahme der UbC-Mäuse während der HFD	XX
Abb. A8	Entwicklung der basalen Blutglucosewerte der UbC-Mäuse mit zunehmendem Alter ...	XXIII
Abb. A9	Veränderungen der basalen Blutglucosewerte der UbC-Mäuse während der HFD	XXIII
Abb. A10	Körpergewichtsveränderungen der 1-jährigen UbC-Mäuse während der HFD.....	XXIII
Abb. A11	Oraler Glucosetoleranztest (OGTT) der leberspezifischen Alb-Stämme	XXV
Abb. A12	Insulinkonzentrationen während des OGTT der 1-jährigen Alb-IGF2BP2-Mäuse.....	XXV
Abb. A13	Oraler Glucosetoleranztest (OGTT) der UbC-Stämme.....	XXVI
Abb. A14	Oraler Glucosetoleranztest (OGTT) der UbC-Stämme nach der HFD	XXVI
Abb. A15	Insulinkonzentrationen während des OGTT der UbC-Mäuse	XXVII
Abb. A16	Insulinkonzentrationen während des OGTT der UbC-Mäuse nach der HFD	XXVII
Abb. A17	C-Peptidkonzentration während des OGTT der UbC-Mäuse nach 8-wöchiger HFD	XXVIII
Abb. A18	Intraperitonealer Insulintoleranztest (IPITT) der 1-jährigen UbC-Mäuse.....	XXIX
Abb. A19	Intraperitonealer Insulintoleranztest (IPITT) der 1-jährigen UbC-Mäuse nach der HFD.....	XXIX
Abb. A20	Glykogengehalt in Leber und Skelettmuskel der UbC-Mäuse	XXX

Abb. A21	Glykogengehalt in der Leber der Alb-Mäuse	XXX
Abb. A22	Vergleich der Glucosekonzentrationen im OGTT der UbC-Stämme vor und nach der HFD	XXXII
Abb. A23	Vergleich der Insulinkonzentrationen im OGTT der UbC-Stämme vor und nach der HFD	XXXII
Abb. A24	Vergleich der Glucosekonzentrationen im IPITT der UbC-Stämme vor und nach der HFD	XXXIII

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht der für die transgenen Mäuse verwendeten Futtermittel	35
Tabelle 2	Übersicht der Daten der kalorimetrischen Verbrennungsversuche	40
Tabelle 3	Übersicht der berechneten Werte für den Korrelationsfaktor x	42
Tabelle 4	Übersicht der verwendeten Primer	48
Tabelle 5	Übersicht der verwendeten Antikörper	51
Tabelle 6	Übersicht der verwendeten ELISA-Kits.....	53
Tabelle 7	Übersicht der klonierten DNA-Konstrukte zur Erzeugung transgener Mausstämmen.....	58
Tabelle 8	Übersicht der transgenen Mausstämmen.....	59
Tabelle 9	Vererbung der transgenen DNA in den verschiedenen Mausstämmen	60
Tabelle 10	Messwerte für die Tibialänge sowie das Körpergewicht der UbC-Mäuse.....	67
Tabelle 11	Messwerte für die Tibialänge sowie das Körpergewicht der leberspezifischen Alb-Mäuse im Alter von 1 Jahr	67
Tabelle 12	Prozentuale Veränderungen der Organgewichte 5 Tage alter UbC-Tiere.....	68
Tabelle 13	Prozentualer Anteil an glykiertem Hämoglobin (HbA1c) in UbC-Tieren im Alter von ½ und 1 Jahr	75
Tabelle 14	Blutglucosewerte der UbC- und Alb-IGF2BP-Mäuse nach 6 stündigem Fasten	76
Tabelle 15	Insulinwerte der UbC- und Alb-IGF2BP2-Mäuse nach 6-stündigem Fasten.....	78
Tabelle 16	Zusammenfassung der Ergebnisse der 1-jährigen transgenen IGF2BP-Mäuse	83
Tabelle 17	Zusammenfassung der Ergebnisse der 1-jährigen UbC-IGF2BP2-Mäuse	93

Tabellen im Anhang

Tabelle A1	Absolute Messdaten der Körper- und Organgewichte 5 Tage alter UbC-Mäuse	XV
Tabelle A2	Messdaten für die absoluten und relativen Körper- und Organgewichte sowie für die Tibialänge der UbC-Stämme im Alter von ½ Jahr	XV
Tabelle A3	Messdaten für die absoluten und relativen Körper- und Organgewichte sowie für die Tibialänge der UbC-Stämme im Alter von 1 Jahr	XVI

Tabelle A4	Messdaten für die absoluten und relativen Körper- und Organgewichte sowie für die Tibiallänge des Alb-IGF2BP2-Stammes im Alter von ½ und 1 Jahr	XVII
Tabelle A5	Messdaten für absoluten und relativen Körper- und Organgewichte sowie für die Tibiallänge der leberspezifischen Alb-Stämme im Alter von 1 Jahr	XVIII
Tabelle A6	Tägliche Futter- und Wasseraufnahme der UbC-Mäuse.....	XIX
Tabelle A7	Tägliche Energiezufuhr der UbC-Stämme	XX
Tabelle A8	Menge und Energiegehalt des Kots der UbC-Mäuse	XXI
Tabelle A9	Energiebilanz der transgenen UbC-Mäuse.....	XXI
Tabelle A10	Parameter für die Berechnung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses der 1-jährigen UbC-Stämme	XXII
Tabelle A11	Körpertemperatur der UbC-Mäuse.....	XXII
Tabelle A12	Veränderungen des Körpergewichtes der UbC-Mäuse während der Hochfettdiät (HFD)	XXIV
Tabelle A13	Basale Blutglucosewerte der 1-jährigen Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten der Diät.....	XXIV
Tabelle A14	Prozentualer Anteil an glykiertem Hämoglobin (HbA1c) in den UbC-Mäusen.....	XXIV
Tabelle A15	HOMA-IR und HOMA-%B der transgenen UbC- und Alb-IGF2BP2-Mäuse.....	XXVIII
Tabelle A16	Klinisch-chemische Befunde im Serum und Gewebe der UbC-Stämme	XXXI
Tabelle A17	Differenziell exprimierte mRNAs in Leber und Fett der UbC-Mäuse nach der HFD ...	XXXIII

8.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A>C	Basenaustausch von Adenin (A) zu Cytosin (C)
ACTB	β-Aktin
ad	lateinisch: „auf“
<i>ad libitum</i>	lateinisch: „nach Belieben“
AKT	Proteinkinase B (PKB)
Alb	Albumin
AML12	<i>alpha mouse liver 12 cell line</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B	Benzoessäure
BiPro	Birken-Profilin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BP	biologische Prozesse

BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BTRC	<i>beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>
BUN	Blut-Harnstoff-Stickstoff (<i>blood urea nitrogen</i>)
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches AMP (<i>cyclic AMP</i>)
CC	<i>cellular components</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CDS	codierende Sequenz
ChREB	<i>carbohydrate responsive element binding protein</i>
cm	Zentimeter
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
C _T	<i>cycle threshold</i>
C-terminal	Carboxyterminal
CYP	Cytochrom P450
DIO	<i>diet induced obesity</i>
dL	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (Nukleosid = Adenosin, Guanosin, Thymidin oder Cytidin)
E	Energie
E12,5	12,5 Tage alter Embryo (E - embryonales Alter in Tagen)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEF2	<i>eukaryotic translation elongation factor 2</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4e</i>
EIF4EBP1	<i>EIF4E binding protein 1</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ELOVL	<i>fatty acid elongase</i>
ERK	<i>extracellular regulated MAPK</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lateinisch: „und andere“)
EW	Einwaage
F	Filialgeneration
FABP	<i>fatty acid binding protein</i>
FBS	fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FDR	<i>false discovery rate</i>
FOXO	<i>forkhead box protein O</i>
G	<i>Gauge</i>
g	Gramm
G>A	Basenaustausch von Guanin (G) zu Adenin (A)
G>T	Basenaustausch von Guanin (G) zu Thymin (T)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GG	Gleichgewicht

GH	Wachstumshormon (<i>growth hormone</i>) oder Somatotropin
GLP1	glucagonähnliches Peptid 1 (<i>glucagon like peptide 1</i>)
GLUT	Glucosetransporter
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSK3	Glykogensynthasekinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Enzym, das GTP hydrolytisch spaltet
GWAS	genomweite Assoziationsstudien
H	Enthalpie
h	Stunde (lateinisch: <i>hora</i>)
H ₂ O	Wasser
H3K27	Modifikation am Lysin 27 des Histon 3-Proteins
H3K4	Modifikation am Lysin 4 des Histon 3-Proteins
HA	Hämagglutinin
HbA1c	Hämoglobin A1c
HBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HCV	Hepatitis C Virus
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HEK293T	<i>human embryonic kidney 293 cell line, containing simian virus 40 large T antigen</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-EthanSulfonsäure
HFD	Hochfettdiät
HMGA2	<i>high mobility group AT-hook 2</i>
HOMA	<i>homeostasis model assessment</i>
hsa	Mensch (lateinisch: " <i>Homo sapiens</i> ")
HuH7	<i>hepatocellular carcinoma cell line</i>
I.E.	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
I2H	Mausstamm UbC-IGF2BP2_H (H - <i>high expression of IGF2BP2</i>)
I2L	Mausstamm UbC-IGF2BP2_L (L - <i>low expression of IGF2BP2</i>)
IGF1/2	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1/2 (<i>Insulin-like growth factor 1/2</i>)
IGF1R	IGF1-Rezeptor
IGF2BP1/2/3	IGF2 mRNA bindendes Protein 1/2/3 (<i>IGF2 mRNA-binding protein 1/2/3</i>)
<i>in vitro</i>	unter künstlichen Bedingungen im Labor beobachtet oder durchgeführt (lateinisch: "im Glas")
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus beobachtet oder durchgeführt (lateinisch: "im Lebendigen")
INSR	Insulinrezeptor
IP	Immunpräzipitation
IPITT	intraperitonealer Insulintoleranztest
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
J	Joule
K	Kelvin
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KH	<i>hnRNP K Homology</i>
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kJ	Kilojoule
KOF	Körperoberfläche
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
L	Liter
lncRNA	lange nicht-codierende RNA
M	Molarität (Stoffmengenkonzentration) in mol/L
m ²	Quadratmeter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDR1	<i>multidrug resistance protein 1</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase
MF	molekulare Funktionen
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
miRNA	microRNA
mL	Milliliter
MLU	Martin-Luther-Universität
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mmu	Hausmaus (lateinisch: " <i>Mus musculus</i> ")
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPI-CBG	Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1/2	<i>mTOR-complex 1/2</i>
mU	<i>Milliunits</i>
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
N	Anzahl der unabhängigen Messungen
n	Anzahl der untersuchten Tiere bzw. Proben
n.d.	nicht detektierbar
n.s.	nicht signifikant
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ncRNA	nicht-codierende RNA
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
norm.	normalisiert
NRAS	<i>neuroblastoma ras oncogene</i>
N-terminal	Aminoterminal
OGTT	oraler Glucosetoleranztest
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p58	Isoform des IGF2BP2 (58 kDa)
p62	Isoform des IGF2BP2 (62 kDa)
p66	längste Isoform des IGF2BP2 (66 kDa)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphat buffered saline</i>)
PBST	PBS + Tween® 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE3B	Phosphodiesterase 3B
PDK1	phosphoinositidabhängige Kinase 1 (<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase 1</i>)
pH	pH-Wert (lateinisch: <i>potentia Hydrogenii</i>)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI3KIP1	<i>PI3K interacting protein 1</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKB	Proteinkinase B (AKT)
PKCλ	Proteinkinase C, Isoform λ (lambda)
PPIA	Peptidylprolylisomerase A
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	<i>real time quantitative PCR</i>
R	molare Gaskonstante ($R = 8,314 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$)
Rab	<i>ras-related gtp-binding protein</i>
RBP	RNA-bindendes Protein
RDH9	Retinol-Dehydrogenase 9
rel.	relativ
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
rRNA	ribosomale RNA
rs	<i>reference SNP ID</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S6K	<i>ribosomal protein S6 kinase</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)

SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SREBP1	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
SW	Stoffwechsel
T	Temperatur
T1DM	Typ 1 Diabetes mellitus
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAG	Triacylglycerin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (Bakterium)
TL	Tibialänge
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon (Thyreoidea = Schilddrüse)
TUBA1A	Tubulin, alpha 1a
Tween® 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	innere Energie
u./o.	und/oder
UbC	Ubiquitin C
UCP1	<i>mitochondrial uncoupling protein 1</i>
UTR	untranslatierter Bereich (<i>untranslated region</i>)
UV	ultraviolett
V	Volt
VCL	Vinculin
Vg1RBP	<i>Vg1-mRNA binding protein</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
W	Wasserwert (Wärmekapazität des Kalorimeters)
w/v	<i>weight/volume</i> (bezogen auf 100 mL der Lösung)
WAP	<i>whhey acidic promoter</i>
WT	Wildtyp
ZAMED	Zentrum für Angewandte Medizinische und Humanbiologische Forschung
ZBP1	<i>zipcode binding protein 1</i>
ZMG	Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung
α	Alpha
β	Beta
$\Delta_v H$	Verbrennungsenthalpie
$\Delta_v U$	Verbrennungsenergie
Δv_g	Stöchiometrikoeffizient der Gase
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
Ω	Ohm, Einheit des elektrischen Widerstandes
$^{\circ}C$	Grad Celsius

8.4 Weitere Abbildungen und Ergebnistabellen

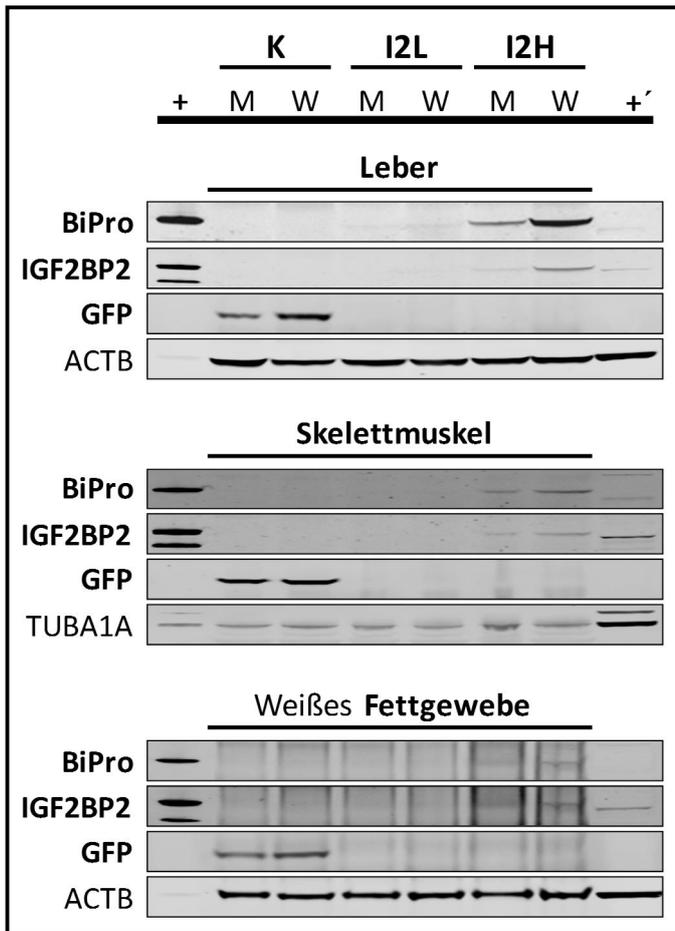


Abb. A1: Expression der transgenen Proteine in verschiedenen Organen der UbC-Tiere. Gezeigt sind *Western Blot* Analysen der Leber, des Skelettmuskels sowie des weißen Fettgewebes der ubiquitär überexprimierenden Mausstämme. Dazu wurde aus je drei männlichen (M) und drei weiblichen (W) Organen das Gesamtprotein isoliert und zu gleichen Teilen geschlechtsspezifisch gemischt, sodass jede Probe insgesamt drei Tiere repräsentiert. Als Positivkontrollen wurde links Gesamtprotein von HEK293T-Zellen aufgetragen, welche zuvor mit dem BiPro-IGF2BP2-Konstrukt transient transfiziert worden sind (+) und rechts Gesamtprotein von naiven AML12-Zellen aufgetragen, welche zuvor mit dem BiPro-IGF2BP2-Konstrukt transient transfiziert worden sind (+) geladen. β -Aktin (ACTB) bzw. α -Tubulin 1A (TUBA1A) dienten als Ladekontrolle. Zur Detektion des humanen IGF2BP2-Proteins wurde ein *Tag*-spezifischer BiPro-Antikörper und ein spezifisch gegen IGF2BP2 gerichteter Antikörper genutzt, der sowohl murines als auch humanes Protein erkannte.

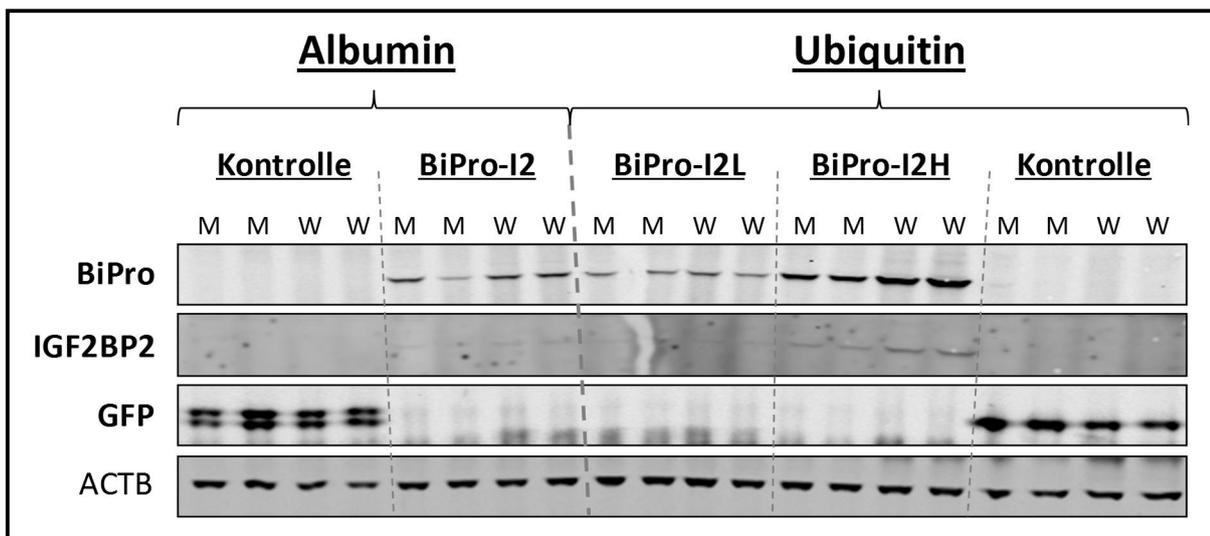


Abb. A2: Vergleich der transgenen Proteinexpression zwischen den Alb- und UbC-IGF2BP2-Mäusen. Gezeigt ist eine *Western Blot* Analyse der Lebern der beiden GFP-Kontrollstämme sowie des Alb-BiPro-IGF2BP2- (BiPro-I2) als auch der beiden UbC-BiPro-IGF2BP2-Stämme (BiPro-I2L und -I2H). Zur Detektion des humanen IGF2BP2 wurde ein BiPro-*Tag*-Antikörper und ein spezifischer IGF2BP2-Antikörper genutzt, der sowohl murines als auch humanes Protein erkannte. Eine BiPro-*Tag*-spezifische Detektion in den Kontrolltieren des Alb-BiPro-GFP-Stammes erfolgte nicht. β -Aktin (ACTB) diente als Ladekontrolle. Analyse durchgeführt von Frau C. Misiak. M - Männchen, W - Weibchen

Tabelle A1:

Absolute Messdaten der Körper- und Organ-gewichte 5 Tage alter UbC-Mäuse

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$;
*** - $p < 0,001$

Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den UbC-Kontrollstamm.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm:

$n_M = 9 - 12$, $n_W = 9 - 12$

Absolute Gewichtsdaten				
5 Tage				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
Körper g	M	3,31 ± 0,11	3,62 ± 0,11	4,08 ± 0,05 ***
	W	3,27 ± 0,11	3,68 ± 0,09 *	3,91 ± 0,11 **
Leber mg	M	101,57 ± 3,62	116,73 ± 5,05 *	119,03 ± 2,53 **
	W	105,73 ± 3,25	128,87 ± 5,54 **	120,51 ± 4,67 *
Herz mg	M	16,70 ± 0,66	18,48 ± 1,07	19,68 ± 0,54 **
	W	17,34 ± 0,55	20,61 ± 1,30 *	19,72 ± 0,44 **
Gehirn mg	M	207,85 ± 4,03	203,67 ± 2,18	247,07 ± 4,91 ***
	W	204,15 ± 4,52	201,25 ± 3,07	241,31 ± 8,75 **

Tabelle A2:

Messdaten für die absoluten und relativen Körper- und Organ-gewichte sowie für die Tibialänge der UbC-Stämme im Alter von ½ Jahr

* - $p < 0,05$

** - $p < 0,01$

*** - $p < 0,001$

Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die UbC-Kontrolltiere.

M - Männchen

W - Weibchen

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm:

$n_M = 11 - 16$, $n_W = 10 - 12$

Absolute Messwerte				
½ Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
Körper g	M	30,20 ± 0,50	30,23 ± 0,66	32,79 ± 0,62 **
	W	23,88 ± 0,54	24,49 ± 0,45	26,76 ± 0,54 **
Tibialänge mm	M	18,34 ± 0,04	18,46 ± 0,11 *	19,08 ± 0,10 ***
	W	18,17 ± 0,06	18,36 ± 0,07	18,75 ± 0,08 ***
Relative Werte normalisiert zur Tibialänge (TL)				
½ Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
Körper/TL g/mm	M	1,64 ± 0,03	1,64 ± 0,03	1,72 ± 0,03
	W	1,32 ± 0,03	1,33 ± 0,02	1,41 ± 0,02 *
Leber/TL mg/mm	M	61,41 ± 2,05	62,12 ± 2,32	65,82 ± 2,30
	W	53,57 ± 1,77	50,50 ± 2,03	56,13 ± 2,38
Herz/TL mg/mm	M	6,91 ± 0,19	7,25 ± 0,16	7,74 ± 0,24 *
	W	5,83 ± 0,15	6,17 ± 0,19	6,72 ± 0,20 **
Lunge/TL mg/mm	M	7,95 ± 0,36	7,88 ± 0,17	8,19 ± 0,18
	W	7,60 ± 0,34	7,53 ± 0,27	7,96 ± 0,17
Nieren/TL mg/mm	M	17,77 ± 0,58	17,06 ± 0,49	18,77 ± 0,35 *
	W	13,55 ± 0,41	14,04 ± 0,65	14,76 ± 0,58
Gehirn/TL mg/mm	M	24,09 ± 0,23	25,15 ± 0,25 **	25,93 ± 0,25 ***
	W	24,55 ± 0,27	25,16 ± 0,17	26,02 ± 0,44 *

Tabelle A3:

Messdaten für die absoluten und relativen Körper- und Organ-gewichte sowie für die Tibiallänge der UbC-Stämme im Alter von 1 Jahr

* - $p < 0,05$
 ** - $p < 0,01$
 *** - $p < 0,001$

Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die UbC-Kontrolltiere.

TL - Tibiallänge

M - Männchen
 W - Weibchen

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm:

Standarddiät:
 $n_M = 9 - 26$, $n_W = 11 - 29$

Hochfett-diät:
 $n_M = 9 - 15$, $n_W = 4 - 14$

Standarddiät				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
Körper g	M	32,18 ± 0,61	34,13 ± 0,67 *	35,67 ± 0,41 ***
	W	27,42 ± 0,51	28,61 ± 0,65	31,17 ± 0,52 ***
Tibiallänge mm	M	18,47 ± 0,05	18,68 ± 0,04 **	19,21 ± 0,07 ***
	W	18,44 ± 0,04	18,84 ± 0,05 ***	19,03 ± 0,08 ***
Körper/TL g/mm	M	1,76 ± 0,03	1,84 ± 0,04	1,86 ± 0,02 **
	W	1,49 ± 0,03	1,52 ± 0,03	1,63 ± 0,02 ***
Leber/TL mg/mm	M	67,07 ± 2,02	68,61 ± 1,87	69,39 ± 1,82
	W	58,40 ± 1,69	64,11 ± 3,65	69,15 ± 1,72 ***
Herz/TL mg/mm	M	7,67 ± 0,21	7,20 ± 0,61	9,04 ± 0,22 ***
	W	6,56 ± 0,22	7,10 ± 0,30	7,97 ± 0,26 ***
Lunge/TL mg/mm	M	8,36 ± 0,12	7,57 ± 0,68	9,47 ± 0,16 ***
	W	8,28 ± 0,18	8,53 ± 0,19	9,93 ± 0,29 ***
Nieren/TL mg/mm	M	18,73 ± 0,41	19,21 ± 0,49	22,63 ± 0,64 ***
	W	15,61 ± 0,37	16,48 ± 0,64	18,47 ± 0,48 ***
Gehirn/TL mg/mm	M	23,88 ± 0,19	25,08 ± 0,20 **	26,24 ± 0,30 ***
	W	24,57 ± 0,16	25,69 ± 0,31 **	26,95 ± 0,29 ***
Hochfett-diät				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
Tibiallänge mm	M	18,66 ± 0,05	18,90 ± 0,07 **	19,34 ± 0,08 ***
	W	18,56 ± 0,07	18,87 ± 0,06 **	19,43 ± 0,11 ***
Leber/TL mg/mm	M	91,14 ± 8,80	70,16 ± 5,48	62,71 ± 3,35
	W	57,62 ± 1,78	59,99 ± 3,92	64,98 ± 2,65
Herz/TL mg/mm	M	8,16 ± 0,30	7,95 ± 0,21	8,48 ± 0,20
	W	7,20 ± 0,19	7,44 ± 0,17	8,65 ± 0,38 **
Lunge/TL mg/mm	M	9,42 ± 0,51	9,00 ± 0,18	9,83 ± 0,15 *
	W	8,63 ± 0,23	9,06 ± 0,15	11,56 ± 1,04 **
Nieren/TL mg/mm	M	21,76 ± 0,79	19,49 ± 0,61	21,98 ± 0,41
	W	17,22 ± 0,61	17,57 ± 0,42	19,49 ± 0,83
Gehirn/TL mg/mm	M	25,00 ± 0,26	25,23 ± 0,18	25,87 ± 0,46
	W	24,96 ± 0,36	26,02 ± 0,28 *	27,68 ± 0,62 **

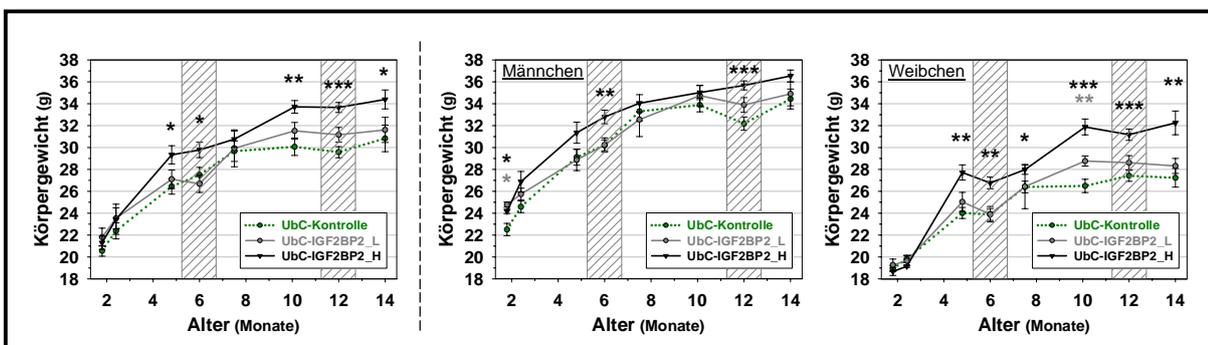


Abb. A3: Entwicklung des Körpergewichtes der UbC-Mäuse mit zunehmendem Alter
 Gezeigt sind die absoluten Körpergewichtsdaten der UbC-Stämme in verschiedenen Altersstadien. Die grau schraffierten Bereiche indizieren, dass sich die ½ und 1 Jahr alten Tiere im gefasteten Zustand (zu Beginn des OGTT) befanden. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf den UbC-Kontrollstamm. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter: $n_M = 4-26$ (Ø 8-12), $n_W = 3-29$ (Ø 9-13)

Tabelle A4: Messdaten für die absoluten und relativen Körper- und Organgewichte sowie für die Tibiallänge des Alb-IGF2BP2-Stammes im Alter von ½ und 1 Jahr

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Alb-Kontrollen. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter: $n_M=9-14$, $n_W=10-13$; M-Männchen, W-Weibchen

Absolute Messwerte					
		½ Jahr		1 Jahr	
		Kontrolle	IGF2BP2	Kontrolle	IGF2BP2
Körper g	M	30,24 ± 0,61	27,91 ± 0,53 *	33,47 ± 0,51	31,49 ± 0,90
	W	22,81 ± 0,39	22,77 ± 0,38	26,16 ± 0,50	26,57 ± 0,69
Tibiallänge mm	M	18,34 ± 0,04	18,01 ± 0,10 *	18,42 ± 0,05	18,36 ± 0,09
	W	17,99 ± 0,08	17,96 ± 0,10	18,25 ± 0,08	18,57 ± 0,11 *
Relative Werte normalisiert zur Tibiallänge (TL)					
		½ Jahr		1 Jahr	
		Kontrolle	IGF2BP2	Kontrolle	IGF2BP2
Körper/TL g/mm	M	1,65 ± 0,03	1,55 ± 0,02 *	1,81 ± 0,03	1,70 ± 0,04
	W	1,27 ± 0,02	1,28 ± 0,02	1,43 ± 0,03	1,45 ± 0,04
Leber/TL mg/mm	M	63,40 ± 1,92	60,34 ± 1,93	73,10 ± 1,60	71,09 ± 3,08
	W	47,98 ± 1,90	50,31 ± 1,48	62,81 ± 3,41	63,78 ± 1,55
Herz/TL mg/mm	M	7,27 ± 0,17	6,79 ± 0,11 *	7,75 ± 0,20	7,53 ± 0,18
	W	6,16 ± 0,32	5,90 ± 0,23	6,72 ± 0,15	6,42 ± 0,15
Lunge/TL mg/mm	M	7,80 ± 0,13	7,61 ± 0,16	8,32 ± 0,12	8,68 ± 0,38
	W	7,36 ± 0,13	7,77 ± 0,14	8,32 ± 0,16	8,41 ± 0,15
Nieren/TL mg/mm	M	17,91 ± 0,54	17,76 ± 0,50	19,65 ± 0,44	20,54 ± 0,82
	W	13,70 ± 0,58	14,19 ± 0,76	16,05 ± 0,61	15,98 ± 0,48
Gehirn/TL mg/mm	M	24,24 ± 0,20	25,49 ± 0,17 ***	24,38 ± 0,30	25,12 ± 0,35
	W	24,72 ± 0,22	25,64 ± 0,27 *	24,38 ± 0,24	25,46 ± 0,24 **

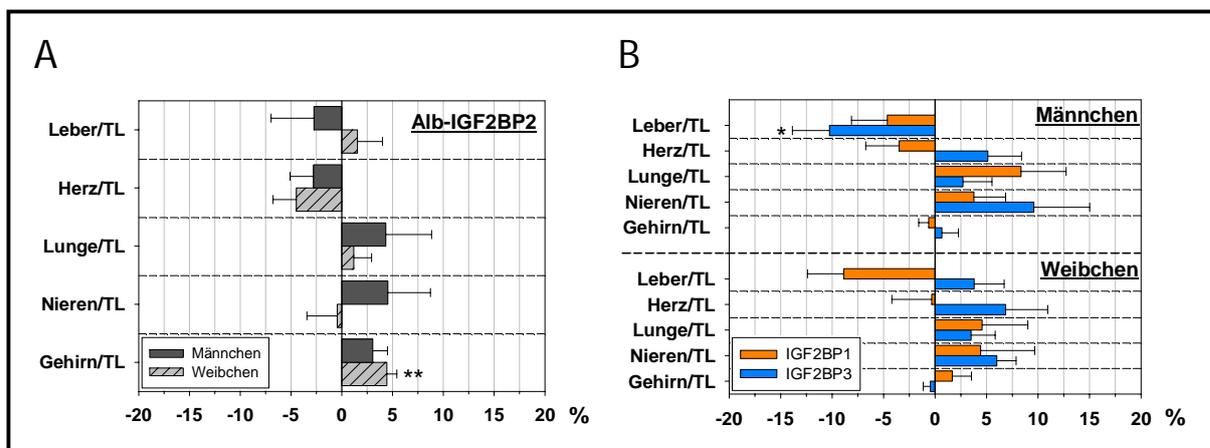


Abb. A4: Prozentuale Veränderungen der Organgewichte der 1-jährigen Alb-Mäuse

Gezeigt sind die prozentualen Unterschiede der relativen Gewichtsdaten von (A) Alb-IGF2BP2- sowie (B) Alb-IGF2BP1- (orange) und Alb-IGF2BP3-Tieren (blau) verglichen zu den Alb-Kontrollen ($\cong 0\%$).

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den Alb-Kontrollstamm.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 8 - 14$, $n_W = 10 - 12$

Tabelle A5: Messdaten für absoluten und relativen Körper- und Organgewichte sowie für die Tibiallänge der leberspezifischen Alb-Stämme im Alter von 1 Jahr

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Alb-Kontrollen. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 8 - 14$, $n_W = 10 - 13$; M - Männchen, W - Weibchen

Absolute Messwerte					
1 Jahr					
		Kontrolle	IGF2BP1	IGF2BP2	IGF2BP3
Körper g	M	33,47 ± 0,51	31,98 ± 0,56	31,49 ± 0,90	32,32 ± 0,53
	W	26,16 ± 0,50	28,21 ± 0,78 *	26,57 ± 0,69	29,73 ± 0,49 ***
Tibiallänge mm	M	18,42 ± 0,05	18,37 ± 0,06	18,36 ± 0,09	18,38 ± 0,05
	W	18,25 ± 0,08	18,55 ± 0,09 *	18,57 ± 0,11 *	18,66 ± 0,06 ***
Relative Werte normalisiert zur Tibiallänge (TL)					
1 Jahr					
		Kontrolle	IGF2BP1	IGF2BP2	IGF2BP3
Körper/TL g/mm	M	1,81 ± 0,03	1,73 ± 0,03	1,70 ± 0,04	1,75 ± 0,03
	W	1,43 ± 0,03	1,52 ± 0,04	1,45 ± 0,04	1,60 ± 0,02 ***
Leber/TL mg/mm	M	73,10 ± 1,60	69,70 ± 2,54	71,09 ± 3,08	65,60 ± 2,63 *
	W	62,81 ± 3,41	57,24 ± 2,21	63,78 ± 1,55	65,20 ± 1,83
Herz/TL mg/mm	M	7,75 ± 0,20	7,48 ± 0,25	7,53 ± 0,18	8,14 ± 0,25
	W	6,72 ± 0,15	6,70 ± 0,26	6,42 ± 0,15	7,18 ± 0,27
Lunge/TL mg/mm	M	8,32 ± 0,12	9,02 ± 0,36	8,68 ± 0,38	8,55 ± 0,23
	W	8,32 ± 0,16	8,70 ± 0,37	8,41 ± 0,15	8,61 ± 0,19
Nieren/TL mg/mm	M	19,65 ± 0,44	20,39 ± 0,61	20,54 ± 0,82	21,53 ± 1,07
	W	16,05 ± 0,61	16,76 ± 0,84	15,98 ± 0,48	17,01 ± 0,30
Gehirn/TL mg/mm	M	24,38 ± 0,30	24,23 ± 0,24	25,12 ± 0,35	24,54 ± 0,39
	W	24,38 ± 0,24	24,78 ± 0,45	25,46 ± 0,24 **	24,26 ± 0,17

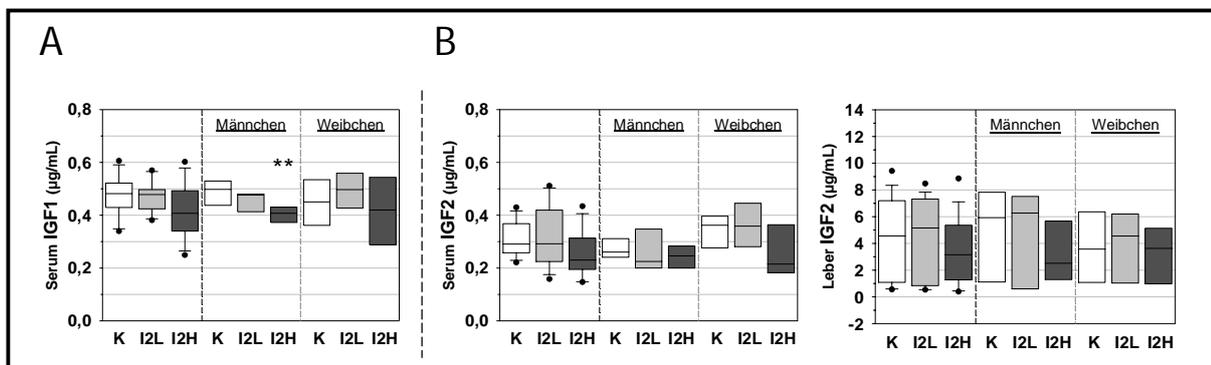


Abb. A5: Konzentration der IGFs im Serum und der Leber 1-jähriger UbC-Mäuse

Dargestellt sind die Konzentrationen von (A) IGF1 und (B) IGF2 im Serum bzw. der Leber von Tieren des IGF2BP2_L- (I2L) sowie des IGF2BP2_H-Stammes (I2H) verglichen mit den UbC-Kontrolltieren (K). Das Serum wurde dafür aus unbehandelten Tieren gewonnen, wohingegen die Lebern aus Tieren stammten, welche zuvor einen OGTT durchliefen. ** - $p < 0,01$ Die Signifikanz bezieht sich auf die UbC-Kontrolltiere. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 6 - 8$, $n_W = 6 - 8$

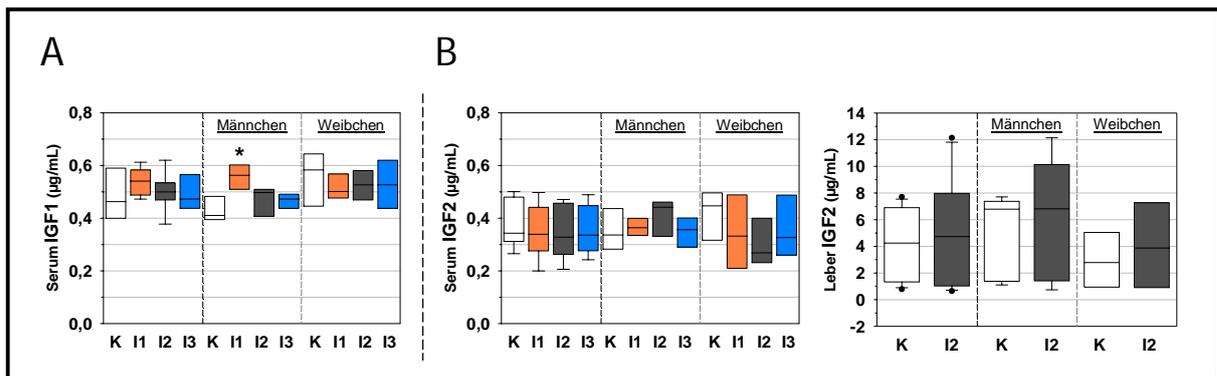


Abb. A6: Konzentration der IGFs im Serum und der Leber 1-jähriger Alb-Mäuse

Dargestellt sind die Konzentrationen von (A) IGF1 und (B) IGF2 im Serum bzw. der Leber von Tieren des IGF2BP1 (I1), IGF2BP2 (I2) sowie des IGF2BP3-Stammes (I3) verglichen mit den Alb-Kontrolltieren (K). Das Serum wurde dafür aus unbehandelten Tieren gewonnen, wohingegen die Lebern aus Tieren stammten, welche zuvor einen OGTT durchliefen. * - $p < 0,05$ Die Signifikanz bezieht sich auf den Alb-Kontrollstamm. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 4 - 9$, $n_W = 4 - 7$

Tabelle A6:

Tägliche Futter- und Wasseraufnahme der UbC-Mäuse

Aufgelistet sind sowohl die absoluten als auch relativen Werte bezogen auf das individuelle Körpergewicht (KGW) der Tiere.

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$;
*** - $p < 0,001$

Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den UbC-Kontrollstamm.

M - Männchen

W - Weibchen

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm:

Standarddiät:

$n_M = 3 - 7$, $n_W = (1) - 9$

Hochfetttdiät:

$n_M = 11 - 15$, $n_W = 8 - 14$

Tägliche Nahrungsaufnahme				
Standarddiät				
1 Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
Futter g		$3,66 \pm 0,10$	$3,44 \pm 0,08$	$3,61 \pm 0,07$
	M	$3,76 \pm 0,11$	$3,63 \pm 0,09$	$3,52 \pm 0,04$
	W	$3,35 \pm 0,12$	$3,20 \pm 0,11$	$(3,79 \pm 0,13)$
Wasser mL		$4,75 \pm 0,12$	$4,49 \pm 0,16$	$4,56 \pm 0,31$
	M	$4,76 \pm 0,16$	$4,51 \pm 0,24$	$3,98 \pm 0,18^*$
	W	$4,72 \pm 0,08$	$4,46 \pm 0,20$	$(5,71 \pm 0,25)^*$
Futter g/g KGW		$0,120 \pm 0,002$	$0,109 \pm 0,002^{**}$	$0,107 \pm 0,003^{**}$
	M	$0,120 \pm 0,003$	$0,107 \pm 0,003^{**}$	$0,104 \pm 0,003^{**}$
	W	$0,119 \pm 0,003$	$0,111 \pm 0,003$	$(0,115 \pm 0,006)$
Wasser mL/g KGW		$0,160 \pm 0,003$	$0,138 \pm 0,004^{***}$	$0,129 \pm 0,008^{**}$
	M	$0,152 \pm 0,004$	$0,121 \pm 0,004^{***}$	$0,114 \pm 0,005^{***}$
	W	$0,168 \pm 0,002$	$0,149 \pm 0,005^{**}$	$(0,173 \pm 0,005)$
nach 6-wöchiger Hochfetttdiät				
1 Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
Futter g		$2,86 \pm 0,06$	$2,85 \pm 0,04$	$2,83 \pm 0,05$
	M	$2,86 \pm 0,09$	$2,88 \pm 0,07$	$2,87 \pm 0,06$
	W	$2,87 \pm 0,06$	$2,82 \pm 0,06$	$2,77 \pm 0,11$
Wasser mL		$5,06 \pm 0,42$	$3,78 \pm 0,11$	$4,07 \pm 0,10$
	M	$4,58 \pm 0,38$	$3,74 \pm 0,21$	$3,64 \pm 0,08$
	W	$5,59 \pm 0,76$	$3,81 \pm 0,10$	$4,71 \pm 0,13^{**}$
Futter g/g KGW		$0,078 \pm 0,002$	$0,078 \pm 0,002$	$0,075 \pm 0,002$
	M	$0,069 \pm 0,002$	$0,071 \pm 0,002$	$0,070 \pm 0,002$
	W	$0,089 \pm 0,003$	$0,083 \pm 0,002$	$0,083 \pm 0,004$
Wasser mL/g KGW		$0,145 \pm 0,014$	$0,107 \pm 0,005$	$0,109 \pm 0,004$
	M	$0,112 \pm 0,010$	$0,098 \pm 0,009$	$0,089 \pm 0,003$
	W	$0,180 \pm 0,026$	$0,114 \pm 0,005$	$0,140 \pm 0,004$

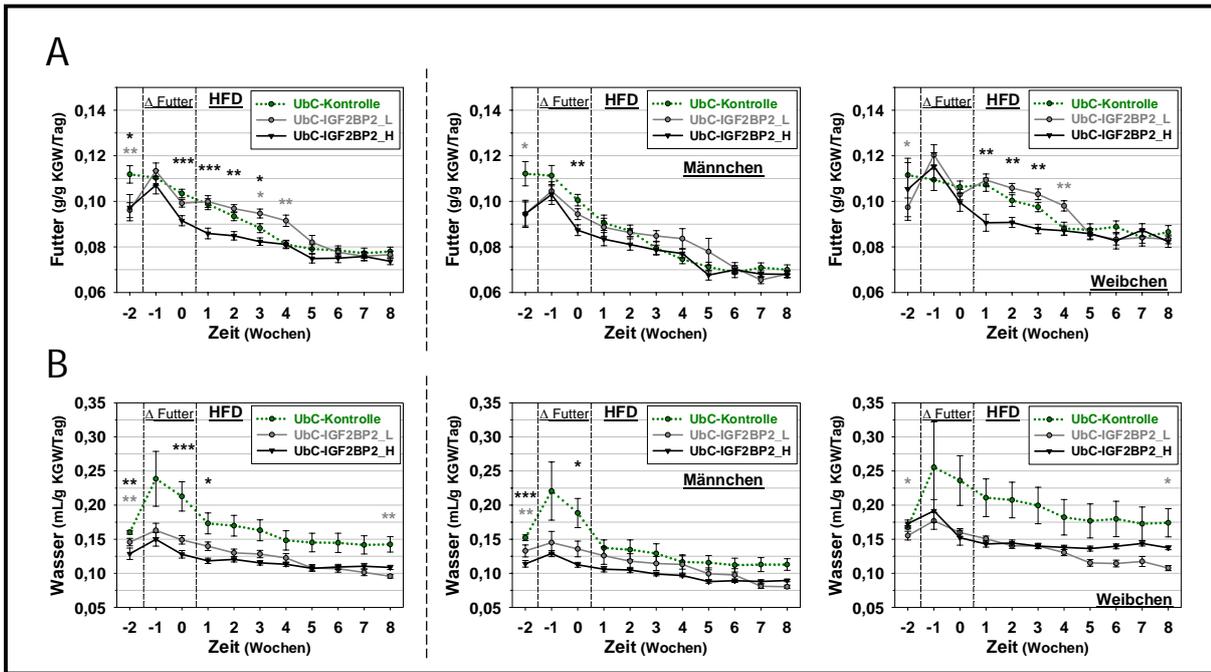


Abb. A7: Tägliche Nahrungsaufnahme der UbC-Mäuse während der HFD

Dargestellt sind die tägliche auf das Körpergewicht normierte Menge an aufgenommenem (A) Futter und (B) Wasser von Tieren vor Beginn (-2), über den Zeitraum der Futterumstellung (-1 - 0 = Δ Futter) sowie bis zum Ende der Diät (1 - 8 = HFD). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf den UbC-Kontrollstamm. KGW - Körpergewicht; Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: Standard (-2): $n_M = 3 - 7$, $n_W = 1 - 9$; HFD (-1 - 8): $n_M = 10 - 15$, $n_W = 5 - 16$

Tabelle A7:

Tägliche Energiezufuhr der UbC-Stämme

Berechnet wurden sowohl die absoluten als auch relativen Werte bezogen auf das Körpergewicht (KGW) der einzelnen Tiere.

** - $p < 0,01$

Die Signifikanzen beziehen sich auf den UbC-Kontrollstamm.

M - Männchen

W - Weibchen

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm:

Standarddiät:

$n_M = 3 - 7$, $n_W = (1) - 9$

Hochfetttdiät:

$n_M = 12 - 15$, $n_W = 9 - 16$

Täglich aufgenommene Energie				
Standarddiät				
1 Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
kJ		43,55 ± 1,15	40,88 ± 0,99	42,98 ± 0,79
	M	44,78 ± 1,28	43,17 ± 1,06	41,94 ± 0,51
	W	39,89 ± 1,41	38,13 ± 1,31	(45,05 ± 1,58)
kJ/g KGW		1,42 ± 0,02	1,30 ± 0,03 **	1,27 ± 0,04 **
	M	1,43 ± 0,04	1,27 ± 0,03 **	1,24 ± 0,04 **
	W	1,42 ± 0,03	1,32 ± 0,04	(1,37 ± 0,08)
nach 6-wöchiger Hochfetttdiät				
1 Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
kJ		60,39 ± 1,20	60,09 ± 0,94	59,71 ± 1,15
	M	60,30 ± 1,96	60,73 ± 1,44	60,50 ± 1,18
	W	60,49 ± 1,34	59,56 ± 1,22	58,54 ± 2,24
kJ/g KGW		1,66 ± 0,04	1,64 ± 0,04	1,58 ± 0,04
	M	1,45 ± 0,05	1,50 ± 0,05	1,48 ± 0,04
	W	1,87 ± 0,05	1,76 ± 0,05	1,74 ± 0,08

Tabelle A8: Menge und Energiegehalt des Kots der UbC-Mäuse

Aufgelistet sind sowohl die absoluten als auch relativen Messdaten bezogen auf die Kotmenge bzw. das Körpergewicht (KGW) der einzelnen Tiere. Das negative Vorzeichen der Werte verdeutlicht die exotherme Verbrennungsreaktion des Kots, bei der die freiwerdende Energie an die Umgebung abgegeben wird. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den gleichbehandelten UbC-Kontrollstamm. M - Männchen, W - Weibchen; Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: Kotmenge: $n_M = 6$, $n_W = 7$; Standarddiät: $n_M = (1) - 2$, $n_W = 2 - 3$ (je $n = 4$); HFD: $n_M = 3$, $n_W = 3$

Täglich ausgeschiedene Menge an Kot					
		Standarddiät			
		Kontrolle	IGF2BP2_H		
g		0,96 ± 0,03		0,93 ± 0,03	
	M	0,97 ± 0,03		0,93 ± 0,06	
	W	0,93 ± 0,08		0,92 ± 0,01	
mg/g KGW		31,52 ± 0,79		29,80 ± 0,75	
	M	28,34 ± 0,72		27,30 ± 1,02	
	W	34,25 ± 0,99		31,94 ± 0,57	
Täglich ausgeschiedene Energie					
		Standarddiät		nach 6-wöchiger Hochfettdiät	
		Kontrolle	IGF2BP2_H	Kontrolle	IGF2BP2_H
kJ/g Kot		-16,03 ± 0,50	-17,83 ± 0,31 *	-22,91 ± 0,68	-26,12 ± 0,56 **
	M	-15,39 ± 0,59	(-16,82)	-23,63 ± 1,20	-25,70 ± 0,33
	W	-16,67 ± 0,47	-18,16 ± 0,13	-22,19 ± 0,29	-26,53 ± 1,02
kJ		-15,23 ± 0,40	-16,48 ± 0,25	-21,79 ± 0,74	-24,21 ± 0,50 *
	M	-14,89 ± 0,57	(-15,68)	-22,87 ± 1,16	-23,96 ± 0,31
	W	-15,57 ± 0,44	-16,75 ± 0,12	-20,72 ± 0,27	-24,46 ± 0,94 *
kJ/g KGW		-0,503 ± 0,036	-0,549 ± 0,026	-0,597 ± 0,022	-0,654 ± 0,033
	M	-0,436 ± 0,017	(-0,459)	-0,556 ± 0,028	-0,582 ± 0,007
	W	-0,570 ± 0,016	-0,579 ± 0,004	-0,639 ± 0,008	-0,727 ± 0,028

Tabelle A9: Energiebilanz der transgenen UbC-Mäuse

Aufgelistet sind sowohl die absoluten als auch relativ berechneten Werte bezogen auf das Körpergewicht (KGW) der einzelnen Tiere. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den UbC-Kontrollstamm. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: Standarddiät: $n_M = 3 - 7$, $n_W = (1) - 9$; Hochfettdiät: $n_M = 10 - 15$, $n_W = 5 - 16$; M - Männchen, W - Weibchen

Täglicher Energieumsatz					
		Standarddiät		nach 6-wöchiger Hochfettdiät	
		Kontrolle	IGF2BP2_H	Kontrolle	IGF2BP2_H
kJ		28,19 ± 1,04	26,59 ± 0,68	38,60 ± 1,20	35,50 ± 1,15 **
	M	29,55 ± 1,18	25,46 ± 0,44	37,43 ± 1,96	36,54 ± 1,18
	W	24,66 ± 1,13	(28,57 ± 1,18)	39,77 ± 1,34	34,07 ± 2,24 *
kJ/g KGW		0,220 ± 0,006	0,173 ± 0,009 ***	1,058 ± 0,043	0,929 ± 0,041 *
	M	0,222 ± 0,009	0,165 ± 0,009 ***	0,895 ± 0,048	0,895 ± 0,038
	W	0,219 ± 0,008	(0,196 ± 0,018)	1,235 ± 0,055	1,018 ± 0,075 *

Tabelle A10:

Parameter für die Berechnung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses der 1-jährigen UbC-Stämme

* - $p < 0,05$

** - $p < 0,01$

*** - $p < 0,001$

Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die UbC-Kontrolltiere.

KGW - Körpergewicht
KOF - Körperoberfläche
E - Energie

M - Männchen
W - Weibchen

'---' - nicht analysiert

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm:

Standarddiät:
 $n_M = 13 - 23$, $n_W = 15 - 29$

Hochfettdiät:
 $n_M = 9 - 15$, $n_W = 8 - 14$

Oberflächen-Volumen-Verhältnis (OF/Vol)				
Standarddiät				
1 Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
OF (KGW) g		29,58 ± 0,51	31,37 ± 0,69 *	33,66 ± 0,46 ***
	M	32,18 ± 0,61	34,13 ± 0,67 *	35,67 ± 0,41 ***
	W	27,42 ± 0,51	28,61 ± 0,65	31,17 ± 0,52 ***
Vol (KOF) cm ²		94,96 ± 0,84	99,01 ± 1,08 **	103,86 ± 0,89 ***
	M	99,98 ± 0,80	103,57 ± 1,02 *	107,79 ± 0,65 ***
	W	91,15 ± 0,81	95,06 ± 1,03 **	98,83 ± 0,98 ***
OF/Vol kg/m ²		3,108 ± 0,028	3,152 ± 0,040	3,248 ± 0,021 ***
	M	3,250 ± 0,034	3,322 ± 0,039	3,335 ± 0,015 **
	W	3,001 ± 0,029	3,005 ± 0,035	3,137 ± 0,026 **
E _{Futter - Kot} kJ/Tag		28,19 ± 1,04	---	26,59 ± 0,68
	M	29,55 ± 1,45	---	25,46 ± 0,11
	W	24,66 ± 1,13	---	28,57 ± 1,18
E/Vol kJ/cm ²		0,282 ± 0,002	---	0,260 ± 0,004 ***
	M	0,296 ± 0,002	---	0,236 ± 0,001 ***
	W	0,271 ± 0,002	---	0,290 ± 0,003 ***
Hochfettdiät				
1 Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
OF (KGW) g		39,17 ± 1,35	40,34 ± 1,40	39,09 ± 1,40
	M	43,43 ± 1,63	45,03 ± 1,80	42,54 ± 1,59
	W	34,61 ± 1,37	36,99 ± 1,46	33,91 ± 0,98
Vol (KOF) cm ²		107,5 ± 1,8	110,0 ± 2,1	110,8 ± 2,3
	M	113,6 ± 2,0	116,5 ± 2,9	117,1 ± 2,6
	W	100,9 ± 1,9	105,8 ± 2,3	103,7 ± 1,8
OF/Vol kg/m ²		3,614 ± 0,067	3,608 ± 0,063	3,492 ± 0,072
	M	3,802 ± 0,083	3,811 ± 0,080	3,693 ± 0,084
	W	3,412 ± 0,075	3,477 ± 0,070	3,267 ± 0,047
E _{Futter - Kot} kJ/Tag		38,55 ± 1,20	---	35,57 ± 1,14**
	M	37,43 ± 1,92	---	36,54 ± 1,15
	W	39,77 ± 1,34	---	34,07 ± 2,24 *
E/Vol kJ/cm ²		0,362 ± 0,008	---	0,321 ± 0,005 ***
	M	0,331 ± 0,006	---	0,313 ± 0,007
	W	0,396 ± 0,007	---	0,329 ± 0,006 ***

Tabelle A11:

Körpertemperatur der UbC-Mäuse

*** - $p < 0,001$

Die Signifikanz bezieht sich auf die UbC-Kontrollen. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 6 - 11$, $n_W = 7 - 12$

Körpertemperatur (KT)			
1 Jahr			
		Kontrolle	IGF2BP2_H
rektale KT °C		37,46 ± 0,04	37,39 ± 0,05
	M	37,24 ± 0,04	37,01 ± 0,05 ***
	W	37,66 ± 0,05	37,73 ± 0,06

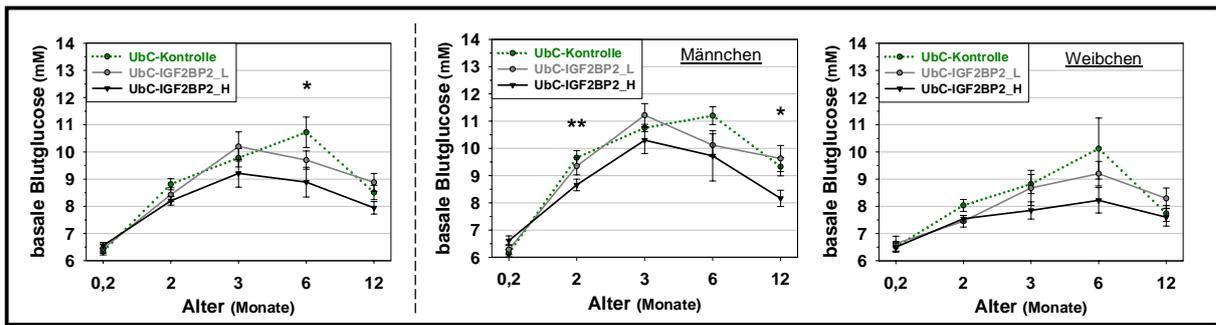


Abb. A8: Entwicklung der basalen Blutglucosewerte der UbC-Mäuse mit zunehmendem Alter

Gezeigt sind die Blutglucosewerte der unbehandelten Tiere im Alter von 5 Tagen (~0,2 M, M-Monate), 7 Wochen (~2 M) sowie ¼, ½ und 1 Jahr (3, 6 und 12 M). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$. Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf den UbC-Kontrollstamm.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter: $n_M = 4 - 26$ ($\emptyset 10 - 12$), $n_W = 4 - 26$ ($\emptyset 9 - 13$)

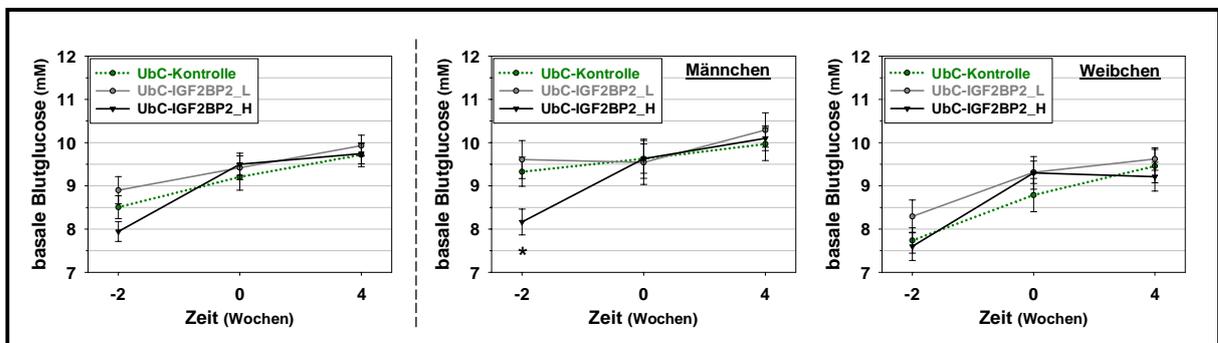


Abb. A9: Veränderungen der basalen Blutglucosewerte der UbC-Mäuse während der HFD

Gezeigt sind die Blutglucosewerte der 1 Jahr alten Tiere im unbehandelten Zustand (-2), 2 Wochen nach Futterumstellung (0) und 4 Wochen nach HFD (4). * - $p < 0,05$. Die Signifikanz ist farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und bezieht sich auf die UbC-Kontrolltiere. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 12 - 15$, $n_W = 8 - 16$

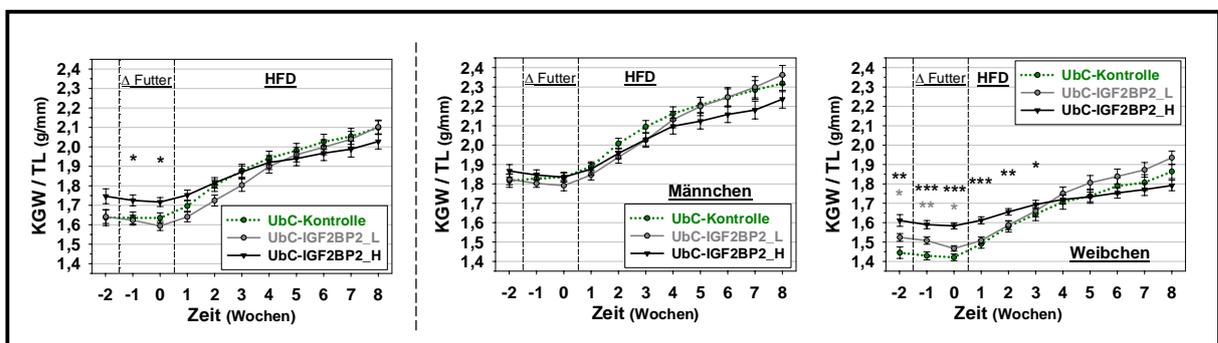


Abb. A10: Körpergewichtsveränderungen der 1-jährigen UbC-Mäuse während der HFD

Dargestellt ist das relative Körpergewicht (KGW) bezogen auf die Tibiallänge (TL) ausgehend von den unbehandelten Tieren vor Beginn (-2), über den Zeitraum der Futterumstellung (-1 - 0 = Δ Futter) sowie bis zum Ende der Diät (1 - 8 = HFD). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf die Kontrolltiere. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 11 - 15$, $n_W = 8 - 16$

Tabelle A12: Veränderungen des Körpergewichtes der UbC-Mäuse während der Hochfett-diät (HFD)

Aufgelistet sind das absolute Körpergewicht (KGW) zu Beginn und am Ende der Diät sowie die aus der Diätbehandlung resultierenden absoluten und prozentualen Veränderungen des Gewichtes (Δ KGW).

* - $p < 0,05$;
 ** - $p < 0,01$;
 *** - $p < 0,001$

Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die UbC-Kontrollen.

M - Männchen
 W - Weibchen

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm:

$n_M = 11 - 15$, $n_W = 8 - 16$

HFD: Zunahme des Körpergewichtes				
1 Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
KGW _(Start HFD)		30,07 ± 0,79	31,52 ± 0,77	33,67 ± 0,60 **
	M	33,88 ± 0,62	34,74 ± 0,94	35,02 ± 0,65
	W	26,49 ± 0,61	28,76 ± 0,46 **	31,58 ± 0,74 ***
KGW _(Ende HFD)		39,07 ± 0,66	40,38 ± 0,67	39,39 ± 0,66
	M	43,27 ± 0,81	45,26 ± 0,79	42,60 ± 0,74
	W	34,58 ± 0,67	36,54 ± 0,68	34,58 ± 0,52
Δ KGW _(Ende-Start)		8,60 ± 0,50	8,71 ± 0,43	5,63 ± 0,47 ***
	M	9,39 ± 0,79	9,90 ± 0,65	7,06 ± 0,60 *
	W	7,76 ± 0,58	7,78 ± 0,53	3,47 ± 0,57 ***
Δ KGW _(Ende-Start)		28,50 ± 1,62	27,27 ± 1,28	16,46 ± 1,32 ***
	M	28,02 ± 2,42	28,02 ± 1,87	19,78 ± 1,61 **
	W	29,01 ± 2,14	26,67 ± 1,75	11,48 ± 1,95 ***

Tabelle A13:
 Basale Blutglucosewerte der 1-jährigen Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten der Diät

-2: vor Diätbeginn

0: 2 Wochen nach der Futterumstellung

4: 4 Wochen nach Diätbeginn

* - $p < 0,05$ Die Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollen.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Zeitpunkt:

$n_M = 12 - 15$, $n_W = 8 - 16$

Basale Blutglucosewerte (mM)				
Hochfett-diät				
Stamm		-2	0	4
UbC-Kontrolle		8,5 ± 0,26	9,2 ± 0,31	9,7 ± 0,28
UbC-IGF2BP2_L		8,9 ± 0,32	9,4 ± 0,27	9,9 ± 0,24
UbC-IGF2BP2_H		7,9 ± 0,23	9,5 ± 0,26	9,7 ± 0,24
UbC-Kontrolle	M	9,3 ± 0,34	9,6 ± 0,45	10,0 ± 0,38
UbC-IGF2BP2_L		9,6 ± 0,44	9,5 ± 0,51	10,3 ± 0,40
UbC-IGF2BP2_H		8,2 ± 0,30 *	9,6 ± 0,34	10,1 ± 0,28
UbC-Kontrolle	W	7,7 ± 0,29	8,8 ± 0,38	9,5 ± 0,39
UbC-IGF2BP2_L		8,3 ± 0,38	9,3 ± 0,26	9,6 ± 0,26
UbC-IGF2BP2_H		7,6 ± 0,33	9,3 ± 0,38	9,2 ± 0,33

Tabelle A14:
 Prozentualer Anteil an glykierem Hämoglobin (HbA1c) in den UbC-Mäusen

* - $p < 0,05$ Die Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollen.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm:

Standarddiät:

½ Jahr: $n_M = 3 - 4$, $n_W = 3 - 4$

1 Jahr: $n_M = 6 - 9$, $n_W = 6 - 12$

Hochfett-diät:

$n_M = 10 - 15$, $n_W = 7 - 14$

HbA1c (%)				
		Standarddiät		Hochfett-diät
Stamm		½ Jahr	1 Jahr	1 Jahr
UbC-Kontrolle		3,11 ± 0,33	4,65 ± 0,34	6,24 ± 0,59
UbC-IGF2BP2_L		3,75 ± 0,69	4,13 ± 0,36	5,57 ± 0,63
UbC-IGF2BP2_H		2,99 ± 0,31	3,57 ± 0,36 *	7,81 ± 0,55
UbC-Kontrolle	M	3,74 ± 0,14	4,67 ± 0,48	6,96 ± 0,89
UbC-IGF2BP2_L		3,55 ± 0,17	4,52 ± 0,59	5,63 ± 0,80
UbC-IGF2BP2_H		3,01 ± 0,47	4,12 ± 0,41	7,73 ± 0,70
UbC-Kontrolle	W	2,48 ± 0,39	4,64 ± 0,48	5,48 ± 0,71
UbC-IGF2BP2_L		4,01 ± 1,57	3,93 ± 0,43	5,53 ± 0,91
UbC-IGF2BP2_H		2,98 ± 0,41	3,03 ± 0,50	7,93 ± 0,91

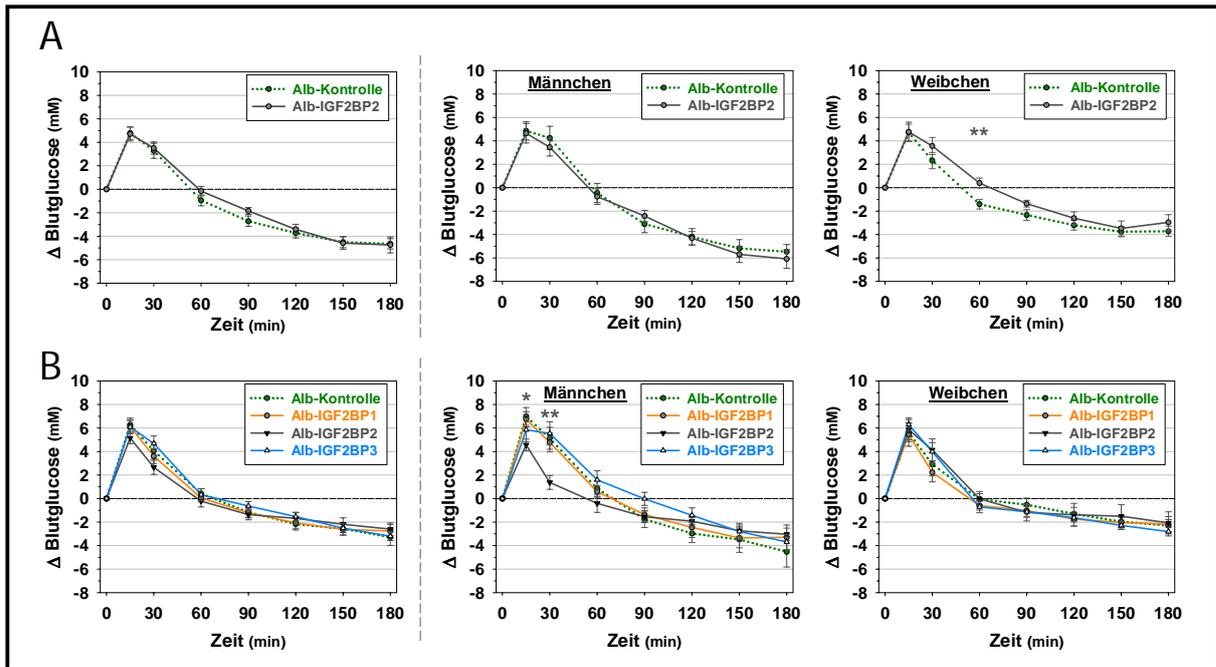


Abb. A11: Oraler Glucosetoleranztest (OGTT) der leberspezifischen Alb-Stämme

Dargestellt sind die relativen Veränderungen der Blutglucosekonzentration über einen Zeitraum von 3 Stunden nach oraler Glucosegabe der (A) ½-jährigen und (B) 1-jährigen Mäuse. Der Nüchternwert diente bei der Berechnung der einzelnen Werte als Ausgangswert. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$. Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem IGF2BP-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf die Alb-Kontrollen. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter: $n_M = 5 - 17$, $n_W = 6 - 14$

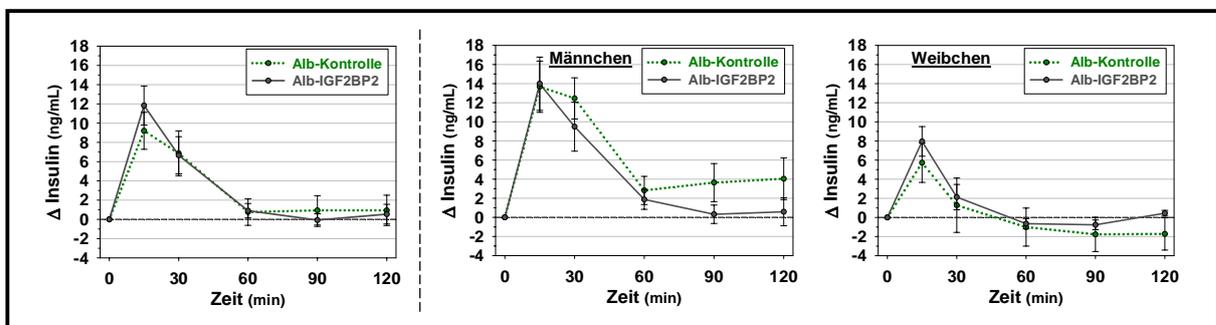


Abb. A12: Insulinkonzentrationen während des OGTT der 1-jährigen Alb-IGF2BP2-Mäuse

Gezeigt ist der Verlauf der relativen Insulinkonzentration im Blut über einen Zeitraum von 2 Stunden nach einer oralen Glucosegabe. Der Nüchternwert diente bei der Berechnung der einzelnen Werte als Ausgangswert. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 6 - 9$, $n_W = 3 - 9$

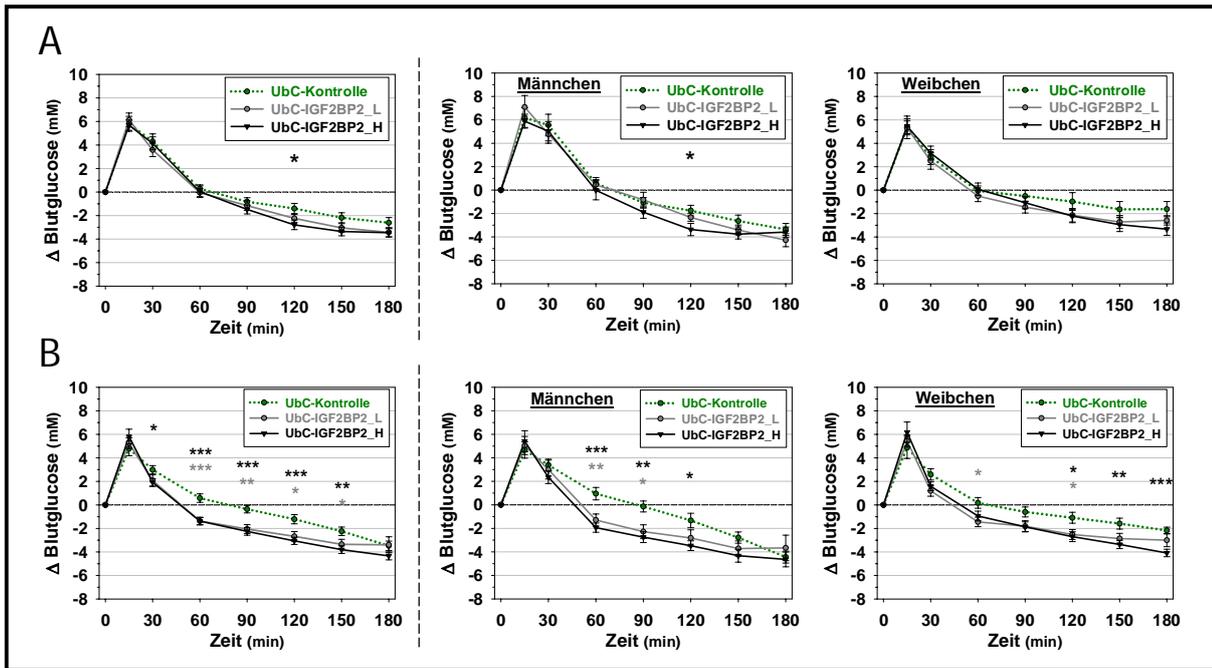


Abb. A13: Oraler Glucosetoleranztest (OGTT) der UbC-Stämme
 Dargestellt sind die relativen Veränderungen der Blutglucosekonzentration über einen Zeitraum von 3 Stunden nach oraler Glucosegabe der (A) ½-jährigen und (B) 1-jährigen Mäuse. Der Nüchternwert diente bei der Berechnung der einzelnen Werte als Ausgangswert. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf die UbC-Kontrolltiere. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter: $n_M = 9 - 16$, $n_W = 7 - 15$

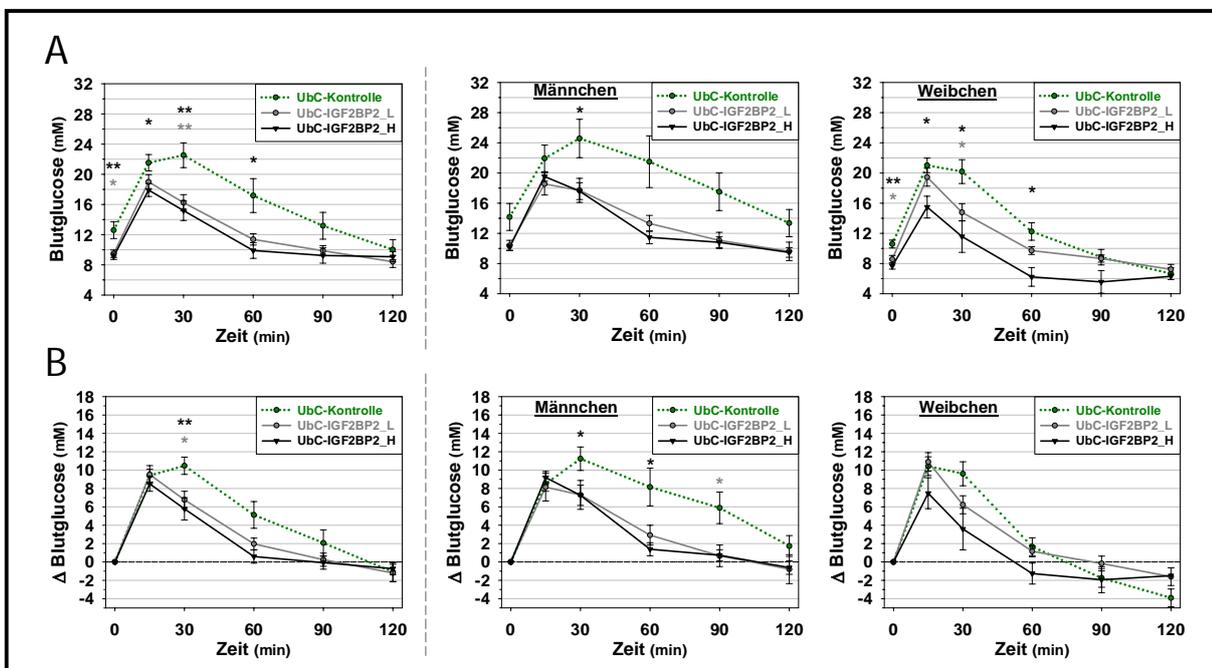


Abb. A14: Oraler Glucosetoleranztest (OGTT) der UbC-Stämme nach der HFD
 Dargestellt sind die (A) absoluten und (B) relativen Veränderungen der Blutglucosekonzentration über einen Zeitraum von 2 Stunden nach oraler Glucosegabe der 1-jährigen Mäuse. Der Nüchternwert diente bei der relativen Berechnung als Ausgangswert. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf die UbC-Kontrollen. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 6 - 10$, $n_W = 3 - 7$

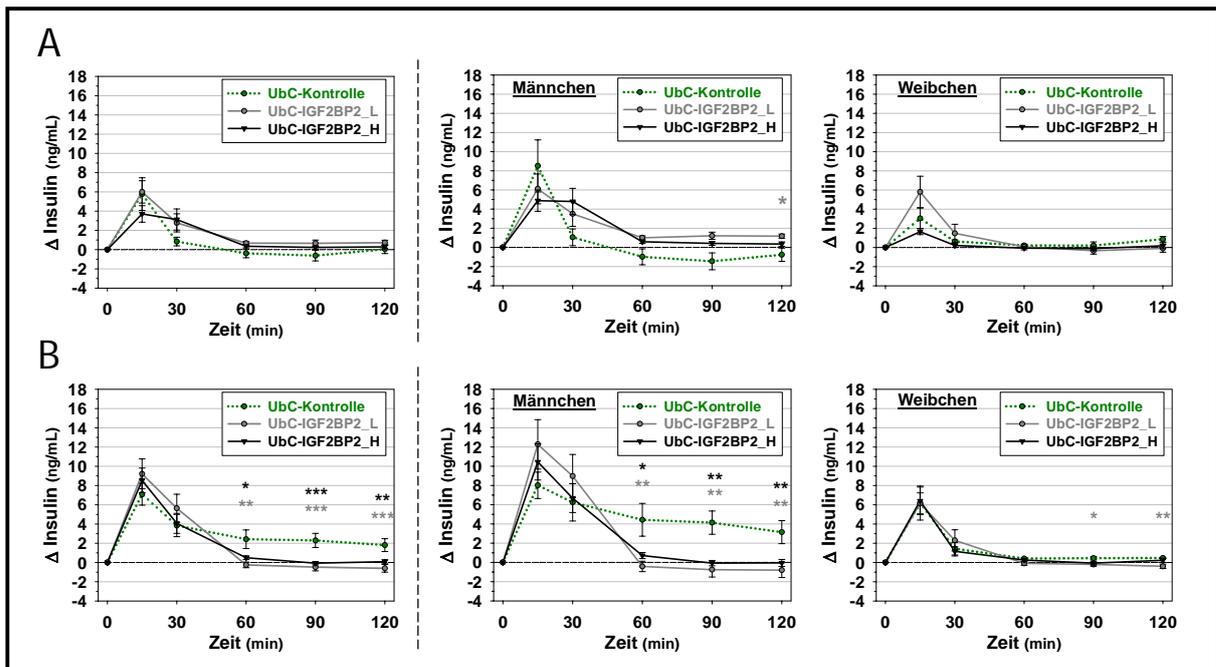


Abb. A15: Insulinkonzentrationen während des OGTT der UbC-Mäuse
Gezeigt sind die Veränderungen der relativen Insulinkonzentrationen im Blut über einen Zeitraum von 2 Stunden nach oraler Glucosegabe (A) der ½-jährigen und (B) der 1-jährigen Tiere. Der Nüchternwert diente bei der Berechnung der einzelnen Werte als Ausgangswert. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf die UbC-Kontrolltiere.
Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 5 - 10$, $n_W = 4 - 10$

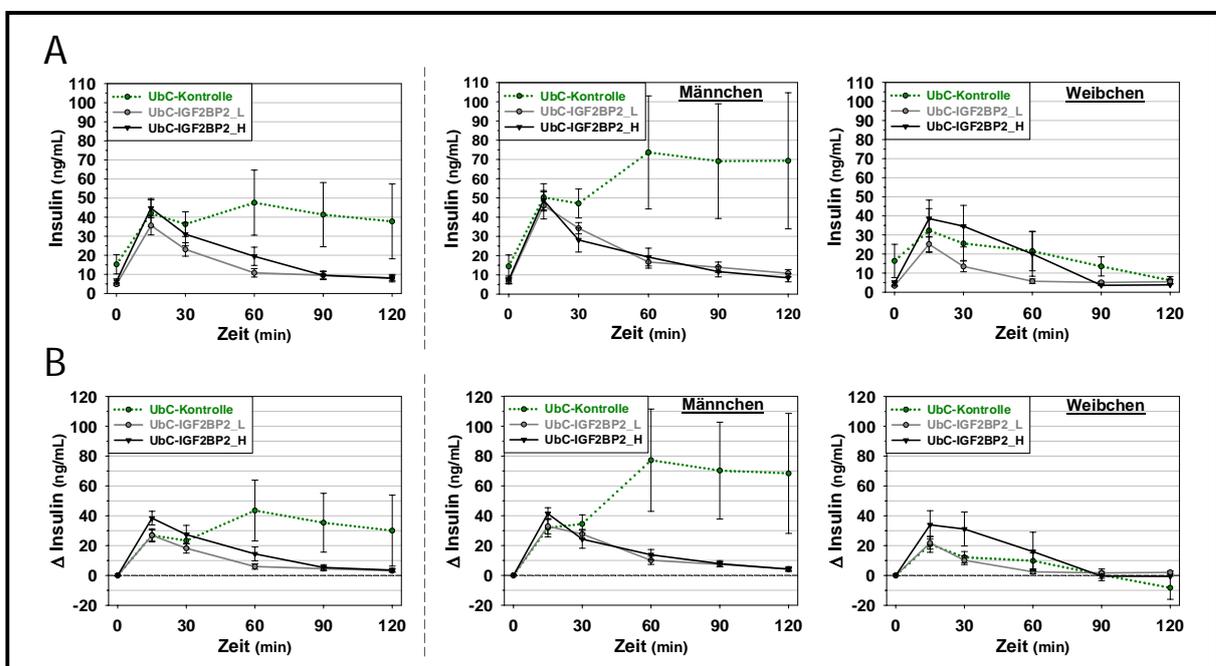


Abb. A16: Insulinkonzentrationen während des OGTT der UbC-Mäuse nach der HFD
Gezeigt sind die Veränderungen der (A) absoluten und (B) relativen Insulinkonzentrationen im Blut über einen Zeitraum von 2 Stunden nach oraler Glucosegabe der 1-jährigen Mäuse. Der Nüchternwert diente bei der relativen Berechnung als Ausgangswert.
Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 6 - 9$, $n_W = 3 - 7$

Tabelle A15:

HOMA-IR und HOMA-%B der transgenen UbC- und Alb-IGF2BP2-Mäuse * - p < 0,05 Die Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollen. M - Männchen W - Weibchen --- - nicht analysiert Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Alter:

Alb:

n_M = 8 - 10

n_W = 5 - 9

UbC: normal

n_M = 5 - 10

n_W = 4 - 10

UbC: Diät

n_M = 7 - 9

n_W = 5 - 7

Alb-IGF2BP2-Mäuse - Standarddiät					
		HOMA-IR		HOMA-%B	
Stamm		½ Jahr	1 Jahr	½ Jahr	1 Jahr
Alb-Kontrolle	M	---	49,8 ± 6,7	---	492,9 ± 70,7
Alb-IGF2BP2		---	110,4 ± 48,8	---	553,0 ± 196,7
Alb-Kontrolle	W	---	29,8 ± 12,7	---	481,6 ± 214,3
Alb-IGF2BP2		---	26,0 ± 4,4	---	339,7 ± 69,3
UbC-IGF2BP2-Mäuse - Standarddiät					
		HOMA-IR		HOMA-%B	
Stamm		½ Jahr	1 Jahr	½ Jahr	1 Jahr
UbC-Kontrolle	M	43,2 ± 12,6	47,7 ± 10,8	403,1 ± 145,0	314,8 ± 75,9
UbC-IGF2BP2_L		19,5 ± 3,1	46,6 ± 6,9	114,9 ± 12,8	345,5 ± 40,4
UbC-IGF2BP2_H		20,6 ± 4,1	32,7 ± 4,5	98,4 ± 15,2	215,0 ± 31,2
UbC-Kontrolle	W	13,3 ± 1,8	14,2 ± 1,6	141,9 ± 19,0	219,6 ± 32,3
UbC-IGF2BP2_L		10,1 ± 3,4	19,5 ± 2,0	185,1 ± 67,1	309,1 ± 40,5
UbC-IGF2BP2_H		13,9 ± 1,6	17,8 ± 1,7	164,3 ± 38,3	228,1 ± 39,1
UbC-IGF2BP2-Mäuse - Hochfettdiät					
		HOMA-IR		HOMA-%B	
Stamm		½ Jahr	1 Jahr	½ Jahr	1 Jahr
UbC-Kontrolle	M	---	309,6 ± 128,5	---	764,4 ± 297,5
UbC-IGF2BP2_L		---	232,7 ± 131,5	---	1437,9 ± 825,1
UbC-IGF2BP2_H		---	99,1 ± 27,5	---	631,9 ± 165,9
UbC-Kontrolle	W	---	250,7 ± 143,1	---	1164,9 ± 539,8
UbC-IGF2BP2_L		---	37,7 ± 6,4 *	---	394,9 ± 42,0
UbC-IGF2BP2_H		---	49,0 ± 14,6	---	590,4 ± 162,5

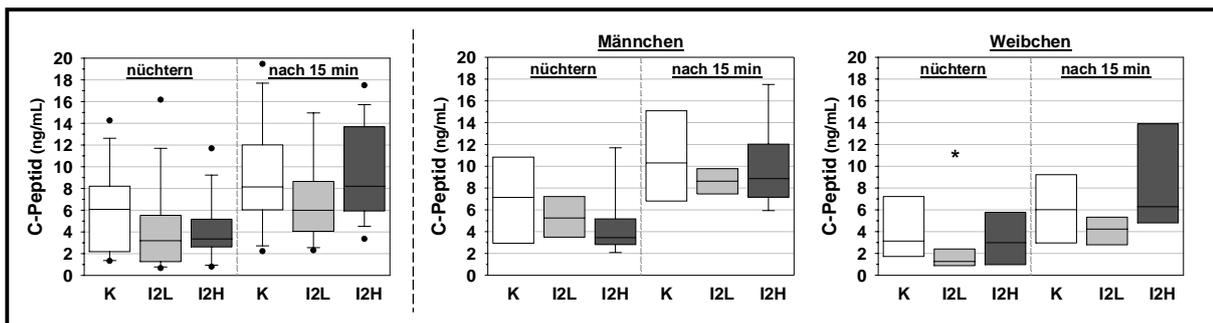


Abb. A17: C-Peptidkonzentration während des OGTT der UbC-Mäuse nach 8-wöchiger HFD

Abgebildet sind die absoluten Konzentrationen an C-Peptid unmittelbar nach der 6-stündigen Nahrungskarenz (nuchtern) sowie 15 Minuten nach der oralen Glucoseapplikation (nach 15 min) der 1-jährigen Tiere des IGF2BP2_L- (I2L) sowie des IGF2BP2_H-Stammes (I2H) verglichen mit den entsprechenden UbC-Kontrolltieren (K). * - p < 0,05 Die Signifikanz bezieht sich auf die Kontrolltiere. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: n_M = 7 - 9, n_W = 6 - 7

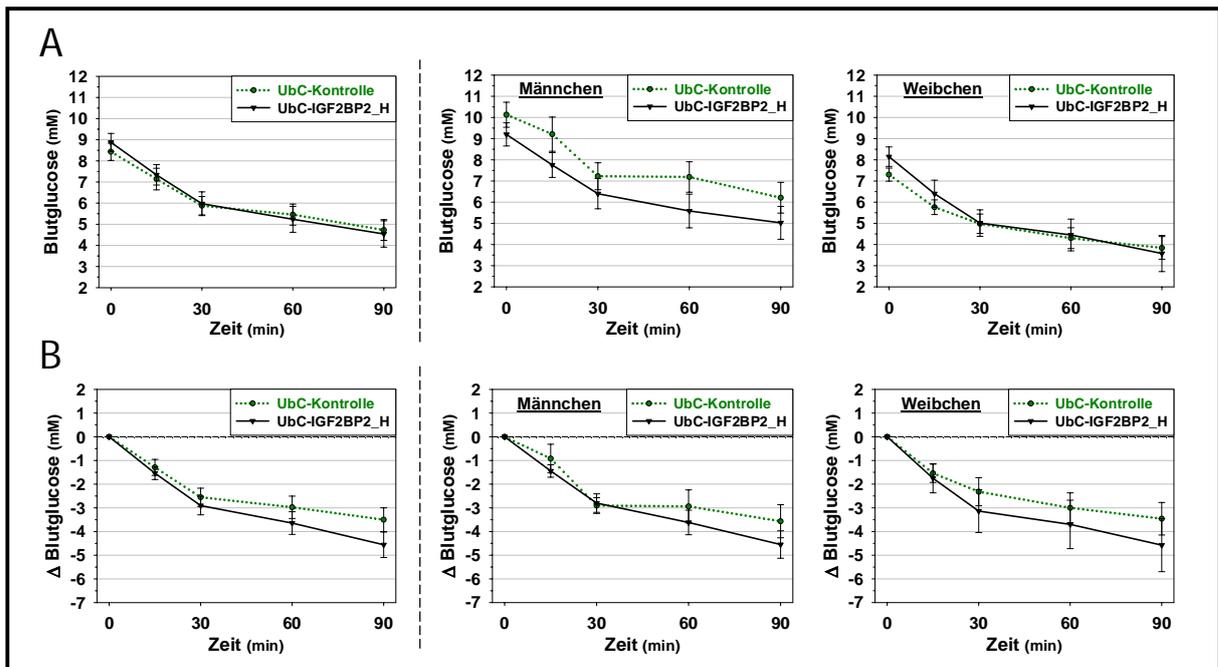


Abb. A18: Intrapertonealer Insulintoleranztest (IPITT) der 1-jährigen UbC-Mäuse

Dargestellt sind die (A) absoluten und (B) relativen Veränderungen der Blutglucosekonzentration über einen Zeitraum von 1 ½ Stunden nach i.p.-Insulingabe der 1-jährigen Mäuse. Der Nüchtern-Blutglucosewert diente bei der Berechnung der relativen Werte als Ausgangswert.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 5 - 10$, $n_W = 4 - 15$

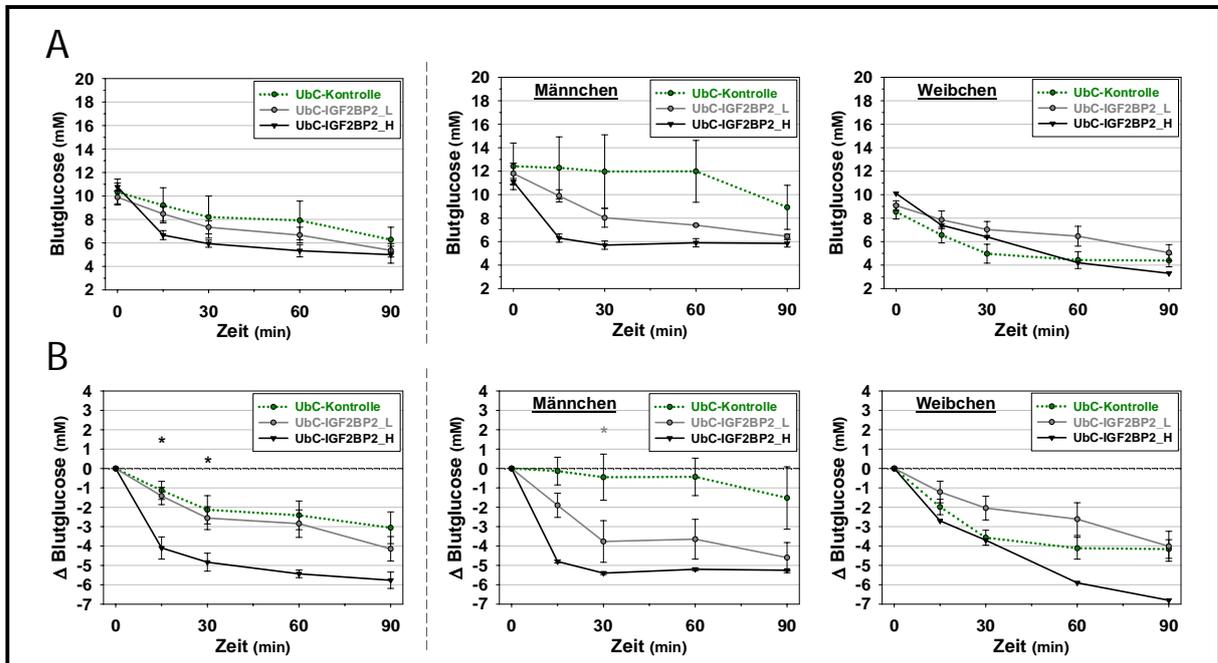


Abb. A19: Intrapertonealer Insulintoleranztest (IPITT) der 1-jährigen UbC-Mäuse nach der HFD

Dargestellt sind die (A) absoluten und (B) relativen Veränderungen der Blutglucosekonzentration über einen Zeitraum von 1 ½ Stunden nach i.p.-Insulingabe der 1-jährigen Mäuse. Der Nüchtern-Blutglucosewert diente bei der Berechnung der relativen Werte als Ausgangswert. * - $p < 0,05$ Die Signifikanzen sind farblich entsprechend dem zugehörigen IGF2BP2-Stamm hervorgehoben und beziehen sich stets auf den UbC-Kontrollstamm.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 2 - 6$, $n_W = 1 - 7$

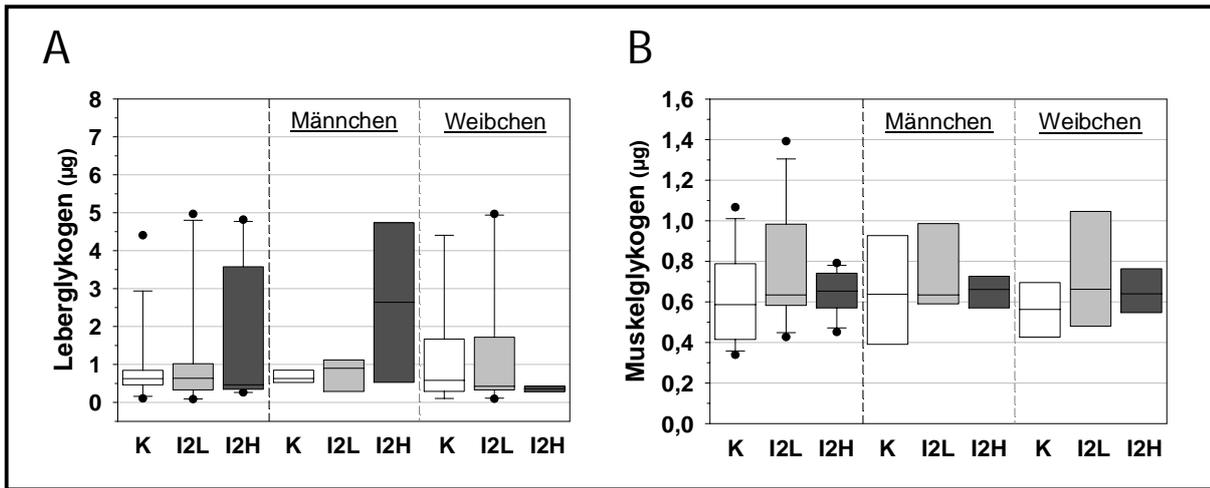


Abb. A20: Glykogengehalt in Leber und Skelettmuskel der UbC-Mäuse

Dargestellt ist die Glykogenmenge (A) im Lebergewebe und (B) im Skelettmuskel. Die untersuchten Tiere wurden vor der Entnahme der Leber für 6 Stunden gefastet und einem 3-stündigen OGTT unterzogen. Der Skelettmuskel wurde aus unbehandelten Tieren entnommen.

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: $n_M = 6 - 8$, $n_W = 6 - 10$

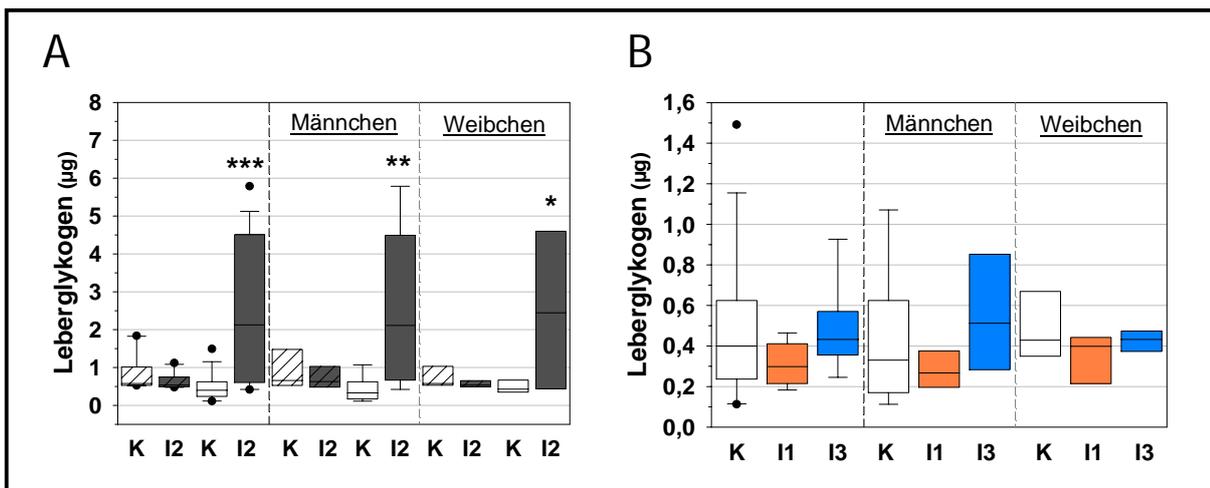


Abb. A21: Glykogengehalt in der Leber der Alb-Mäuse

Dargestellt ist die Glykogenmenge in der Leber von (A) Alb-IGF2BP2- sowie (B) Alb-IGF2BP1/3-Tieren (I - IGF2BP: I1, I2 u. I3). Die untersuchten Tiere wurden alle für 6 Stunden gefastet. Die schraffierten Boxen repräsentieren die Ergebnisse der nur gefasteten Tiere und die leeren Boxen die Daten der Tiere, welche nach der Fastenperiode zusätzlich einen 3-stündigen OGTT durchlaufen haben.

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ Die Signifikanzen beziehen sich auf die gleichbehandelten Kontrollmäuse. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Behandlung: $n_M = 4 - 9$, $n_W = 5 - 9$

Tabelle A16:

Klinisch-chemische Befunde im Serum und Gewebe der UbC-Stämme

* - $p < 0,05$

Die Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die UbC-Kontrollen.

BUN - Blut-Harnstoff-Stickstoff (*blood urea nitrogen*)

Lipase - Pankreaslipase

M - Männchen

W - Weibchen

'---' - nicht analysiert

$n_M = 5 - 8$, $n_W = 5 - 7$

Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm und Parameter:

Standarddiät:

$n_M = 5 - 6$, $n_W = 5 - 6$

Leber: $n_M = 8$, $n_W = 7 - 8$

Hochfettdiät:

$n_M = 4 - 6$, $n_W = 4 - 7$

Standarddiät				
Gehalt an Triacylglycerinen (TAG) im Gewebe				
1 Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
Leber mg/dL	M	21,75 ± 7,15	29,63 ± 6,58	14,75 ± 3,59
	W	44,71 ± 18,01	42,29 ± 13,33	39,43 ± 16,38
Muskel mg/dL	M	14,20 ± 1,04	---	14,80 ± 0,66
	W	18,80 ± 2,96	---	13,20 ± 1,04
verschiedene Parameter im Serum				
1 Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
TAG mg/dL	M	118,83 ± 17,53	---	92,83 ± 13,91
	W	59,67 ± 3,16	---	51,33 ± 4,51
BUN mg/dL	M	24,23 ± 0,83	---	24,73 ± 1,42
	W	20,82 ± 1,85	---	23,92 ± 2,59
Kreatinin mg/dL	M	0,267 ± 0,033	---	0,283 ± 0,044
	W	0,233 ± 0,065	---	0,233 ± 0,038
Lipase mU/mL	M	60,67 ± 4,87	---	52,40 ± 7,19
	W	62,00 ± 4,82	---	70,00 ± 6,90
TSH mU/L		1,75 ± 0,21	1,61 ± 0,20	1,74 ± 0,15
	M	1,99 ± 0,28	2,00 ± 0,25	1,92 ± 0,14
	W	1,50 ± 0,27	1,22 ± 0,21	1,56 ± 0,14
Adiponektin µg/mL		16,41 ± 1,25	15,07 ± 1,53	12,41 ± 0,82 *
	M	13,42 ± 0,59	12,68 ± 0,79	10,34 ± 0,80 *
	W	19,39 ± 1,72	17,46 ± 2,61	14,48 ± 0,77 *
Hochfettdiät				
verschiedene Parameter im Serum				
1 Jahr				
		Kontrolle	IGF2BP2_L	IGF2BP2_H
TAG mg/dL	M	125,08 ± 18,75	---	147,60 ± 14,18
	W	94,71 ± 16,66	---	116,00 ± 22,06
BUN mg/dL	M	48,05 ± 4,02	---	54,45 ± 8,89
	W	42,59 ± 2,64	---	42,83 ± 2,89
Kreatinin mg/dL	M	1,18 ± 0,21	---	1,04 ± 0,21
	W	0,87 ± 0,16	---	0,56 ± 0,05
Lipase mU/L	M	1,50 ± 0,48	---	1,91 ± 0,47
	W	2,49 ± 0,67	---	1,71 ± 0,52
TSH mU/L		1,85 ± 0,18	1,88 ± 0,21	2,02 ± 0,21
	M	1,80 ± 0,24	1,70 ± 0,28	1,87 ± 0,27
	W	1,91 ± 0,27	2,06 ± 0,30	2,27 ± 0,27
Adiponektin µg/mL		11,74 ± 1,05	12,05 ± 0,83	9,08 ± 0,77
	M	9,00 ± 0,41	10,37 ± 0,84	8,60 ± 0,85
	W	14,48 ± 1,31	13,72 ± 1,07	9,91 ± 1,42

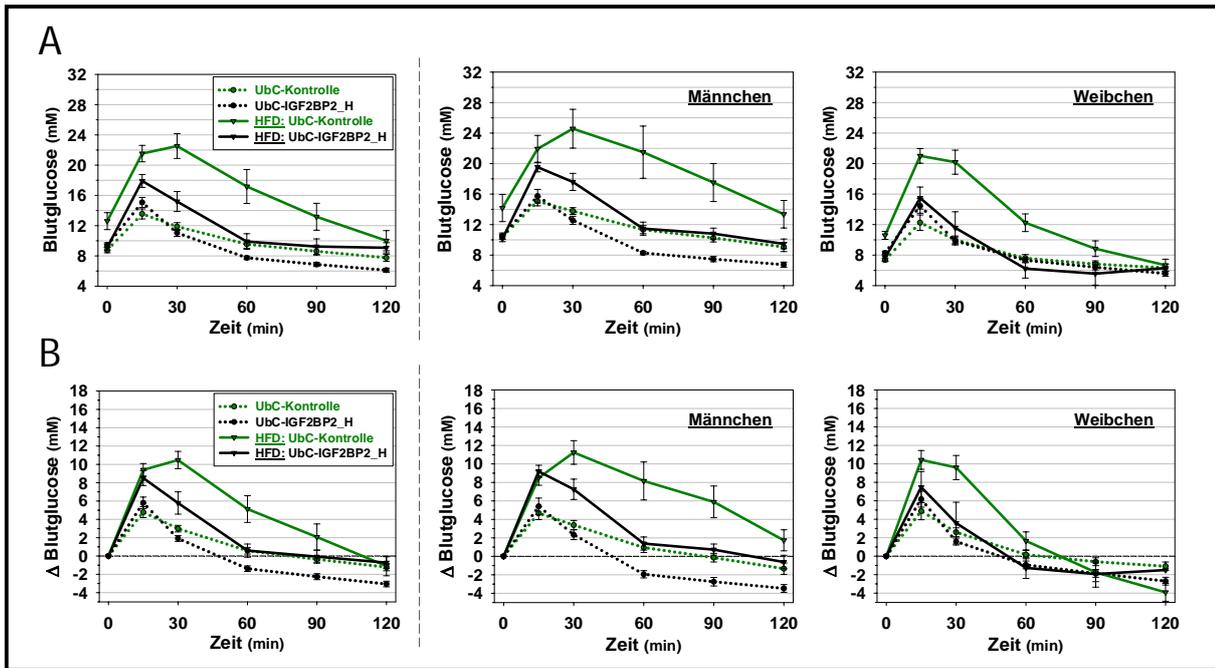


Abb. A22: Vergleich der Glucosekonzentrationen im OGTT der UbC-Stämme vor und nach der HFD. Dargestellt sind die (A) absoluten und (B) relativen Veränderungen der Blutglucosekonzentration über einen Zeitraum von 2 Stunden nach oraler Glucosegabe der 1-jährigen Mäuse. Der Nüchternwert diente bei der relativen Berechnung als Ausgangswert. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: vor Diät: $n_M = 9 - 16$, $n_W = 7 - 15$; nach Diät: $n_M = 6 - 10$, $n_W = 3 - 7$

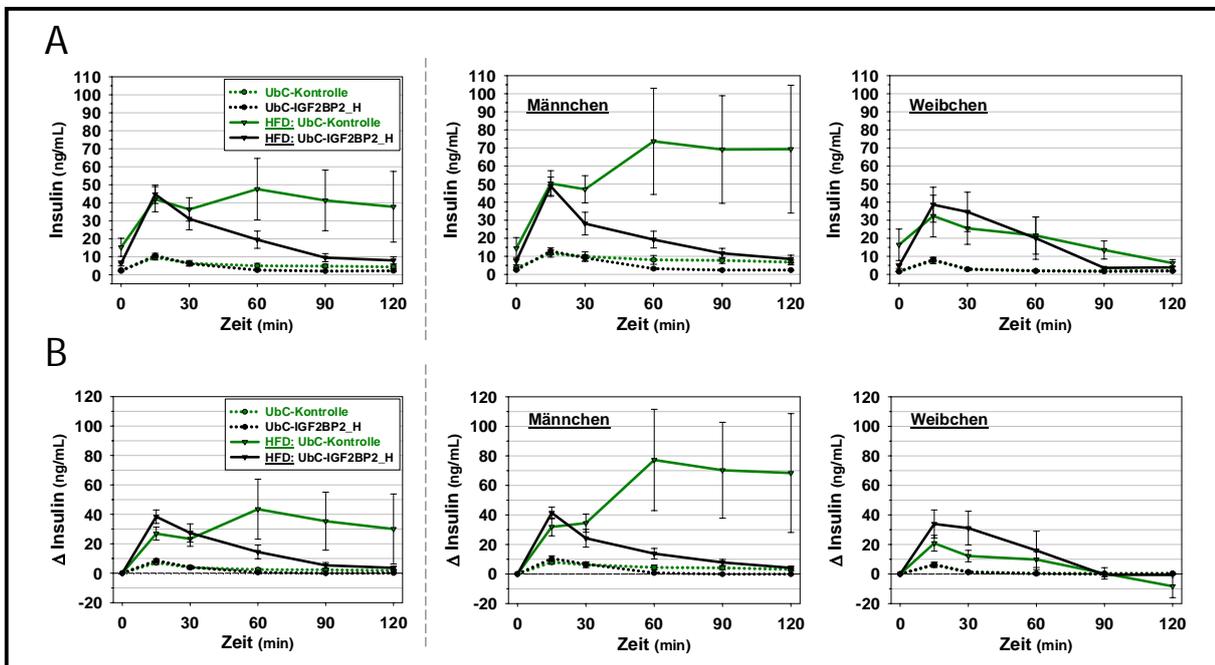


Abb. A23: Vergleich der Insulinkonzentrationen im OGTT der UbC-Stämme vor und nach der HFD. Gezeigt sind die Veränderungen der (A) absoluten und (B) relativen Insulinkonzentrationen im Blut über einen Zeitraum von 2 Stunden nach oraler Glucosegabe der 1-jährigen Mäuse. Der Nüchternwert diente bei der relativen Berechnung als Ausgangswert. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: vor Diät: $n_M = 5 - 10$, $n_W = 4 - 10$; nach Diät: $n_M = 6 - 9$, $n_W = 3 - 7$

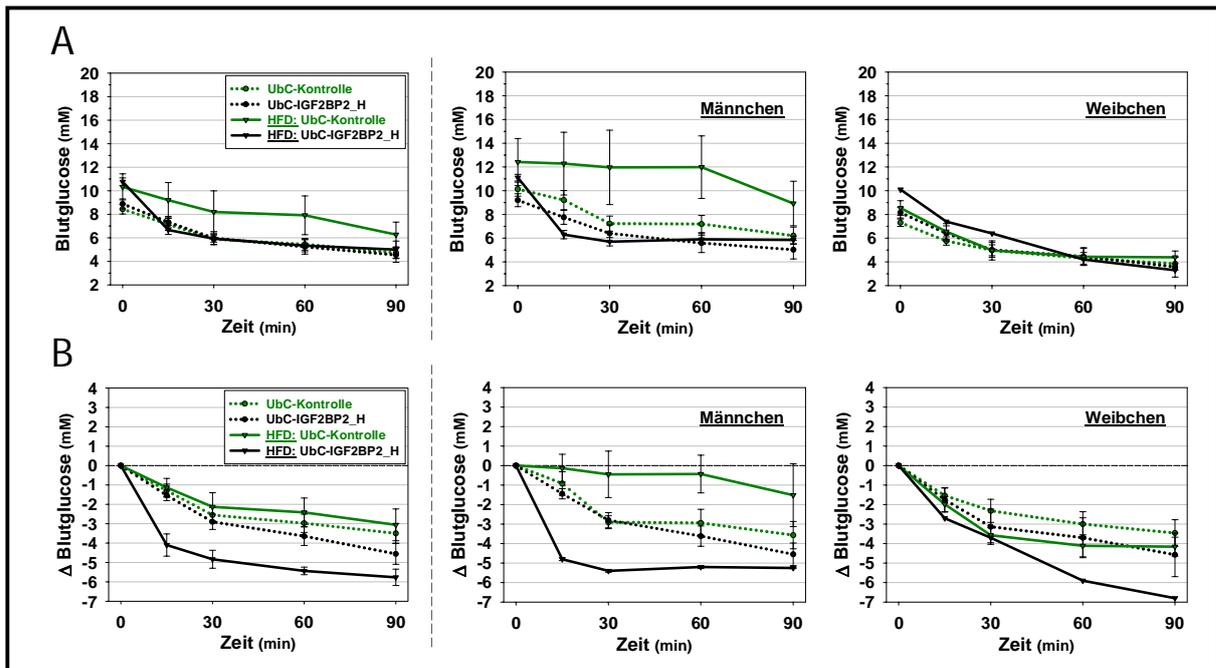


Abb. A24: Vergleich der Glucosekonzentrationen im IPITT der UbC-Stämme vor und nach der HFD. Dargestellt sind die (A) absoluten und (B) relativen Veränderungen der Blutglucosekonzentration über einen Zeitraum von 1 ½ Stunden nach i.p.-Insulingabe der 1-jährigen Mäuse. Der Nüchtern-Blutglucosewert diente bei der Berechnung der relativen Werte als Ausgangswert. Anzahl der untersuchten Tiere pro Stamm: vor Diät: $n_M = 5 - 10$, $n_W = 4 - 15$; nach Diät: $n_M = 2 - 6$, $n_W = 1 - 7$

Tabelle A17: Differenziell exprimierte mRNAs in Leber und Fett der UbC-Mäuse nach der HFD

Aufgelistet sind die sowohl in der Leber als auch im Fettgewebe der IGF2BP2-Mäuse nach der 8-wöchigen HFD differenziell exprimierten mRNAs, verglichen zu den Kontrolltieren. FC - *Fold Change*

Gensymbol	Name	FC Leber	FC Fett
Adora1	<i>adenosine A1 receptor</i>	0,5	0,4
Setdb2	<i>SET domain, bifurcated 2</i>	0,4	0,4
Mast1	<i>microtubule associated serine/threonine kinase 1</i>	9,1	4,7
Pcsk9	<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>	2,7	4,1
Igfbp2	<i>insulin-like growth factor binding protein 2</i>	3,3	4,5
Fam83g	<i>family with sequence similarity 83, member G</i>	5,4	5,1
Rdh9	<i>retinol dehydrogenase 9</i>	2,1	5,3
Nedd9	<i>neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9</i>	2,6	0,4
Wdr95	<i>WD40 repeat domain 95</i>	133,7	0,4
H2-DMb1	<i>histocompatibility 2, class II, locus Mb1</i>	3,8	0,4
Saa4	<i>serum amyloid A 4</i>	0,4	3,4
Cyp2j5	<i>cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 5</i>	0,5	6,3
Bhmt	<i>betaine-homocysteine methyltransferase</i>	0,4	7,5
Coro1a	<i>coronin, actin binding protein 1A</i>	2,8	0,4

8.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlich und inhaltlich entnommenen Angaben wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde weder in gleicher noch ähnlicher Form einer anderen Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegt.

Halle (Saale), den 31. März 2016

Britta Mühleck

8.6 Danksagung

Die vorliegende Dissertation habe ich im Institut für Molekulare Medizin in der Abteilung Molekulare Zellbiologie unter Leitung von Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier angefertigt. Mein Projekt war Teil des wissenschaftlichen Protein-Kompetenznetzwerkes ProNet-T³ und wurde weiterführend durch das Graduiertenkolleg 1591 gefördert. Zu Beginn der Arbeiten im Frühjahr 2011 testete ich zunächst die 29 verschiedenen Stämme auf Transgenität und etablierte die Zucht der tatsächlich transgenen Mausstämme. Die Beantragung und Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten begannen im September 2012 und erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie unter Anleitung von Frau Dr. Barbara Schreier.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während meiner Doktorandenzeit unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stefan Hüttelmaier danke ich dafür, dass er es mir ermöglichte ein so interessantes und anspruchsvolles Projekt bearbeiten zu dürfen sowie für sein Vertrauen und die stete Diskussionsbereitschaft bei der Interpretation der Daten.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Michael Gekle möchte ich mich für die Kooperationsbereitschaft und bereichernde Zusammenarbeit mit dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie bedanken sowie für die interessanten und anregenden Gesprächsrunden.

Frau Dr. med. vet. Barbara Schreier gilt mein ganz besonderer Dank für ihre vielfältige Unterstützung. Sie lehrte mich das selbstständige tierexperimentelle Arbeiten sowie das Durchführen verschiedener metabolischer Testmethoden (z.B. OGTT / IPITT). Ihre kompetente Betreuung, guten Ratschläge und Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch herzlich bei den Tierpflegerinnen Frau Mowwe und Frau Kunst bedanken, durch deren stete Hilfsbereitschaft und die tolle Zusammenarbeit die erfolgreiche Zucht und Dokumentation der vielen verschiedenen Stämme gewährleistet wurde.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer. nat. Bob-Dan Lechner für seine bereitwillige Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der kalorimetrischen Verbrennungsversuche.

Allen Mitarbeitern der AG Hüttelmaier, mit denen ich meine Doktorandenzeit teilen durfte, danke ich für das tolle und einzigartige Arbeitsklima!

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Marcel Köhn für seine kompetente praktische Betreuung, methodische Anleitung sowie viele Tipps und Tricks im Laboralltag bedanken. Ein spezieller Dank gilt auch Herrn Peter Zorn für seine tatkräftige Unterstützung im Labor und die gute Zusammenarbeit. Herrn Tommy Fuchs danke ich für seine Hilfsbereitschaft im Umgang mit den transgenen Mäusen sowie die tierexperimentelle Unterstützung, gemeinsam mit Frau Claudia Misiak. Den beiden Bioinformatikern der AG, Herrn Markus Glaß und Herrn Danny Misiak, möchte ich für die Auswertung der Transkriptomanalysen sowie diverse technische Hilfestellungen danken.

Für die wissenschaftliche als auch mentale Unterstützung sowie die vielen heiteren Stunden im Labor danke ich ganz besonders Frau Kristin Wächter und Herrn Hendrik Täuber. Ihr habt diese Zeit meines Lebens ungemein bereichert und dafür bin ich Euch sehr dankbar!

Meinem Lebenspartner Michael danke ich von Herzen für sein Verständnis und die mentale Stütze, die er mir während dieser ganzen Zeit war!

8.7 Lebenslauf

Name: Britta Mühleck
Akademischer Grad: Diplom-Biochemikerin
Geburtsdatum: 10. Januar 1987
Geburtsort: Halberstadt
Geschlecht: weiblich

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer und akademischer Werdegang

08/1993 – 07/1997 Grundschule an der Promenade in *Torgau*

08/1997 – 07/2005 Johann-Walter-Gymnasium in *Torgau*
Abschluss: Abitur

10/2005 – 09/2010 Diplomstudium der Biochemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
Schwerpunkt: Medizinische Biochemie
Akademischer Grad: Dipl.-Biochem.

Diplomarbeit: angefertigt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer
Institut für Anatomie und Zellbiologie, Medizinische Fakultät
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
„Untersuchung des Einflusses eines Typ 1 Diabetes mellitus auf die
Expression von Enzymen des Methioninstoffwechsels während der
Präimplantationsentwicklung im Kaninchen“

10/2010 – 12/2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im *Institut für Anatomie und Zellbiologie*

01/2011 – 12/2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier
Institut für Molekulare Medizin, Abt. Molekulare Zellbiologie
Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Halle (Saale)

Weiterbildungen

03/2011 Sachkundenachweis gemäß §11 des Tierschutzgesetzes

03/2013 Lehrgang „Tierschutz / Versuchstierkunde“: FELASA, Kategorie B
Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG)
Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Halle (Saale)

8.8 Publikationsliste

1. Bell, J., Wächter, K., Mühleck, B., Pazaitis, N., Köhn, M., Lederer, M., Hüttelmaier, S., 2013. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 2657-2675.
2. Gutschner, T., Hämmerle, M., Pazaitis, N., Bley, N., Fiskin, E., Uckelmann, H., Heim, A., Groß, M., Hofmann, N., Geffers, R., Skawran, B., Longerich, T., Breuhahn, K., Schirmacher, P., Mühleck, B., Hüttelmaier, S., Diederichs, S., 2014. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) is an important protumorigenic factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 59, 1900-1911.
3. Thieme, R., Schindler, M., Ramin, N., Fischer, S., Mühleck, B., Fischer, B., Navarrete Santos, A., 2012. Insulin growth factor adjustment in preimplantation rabbit blastocysts and uterine tissues in response to maternal type 1 diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 358, 96-103.